

**PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus* sp.
DENGAN METODE IMOBILISASI MENGGUNAKAN SILIKA GEL 60,
KITIN, DAN HIBRIDA SILIKA-KITIN**

(Tesis)

Oleh

**VIRGINIA NUH REZA AMANDA
NPM 2427011005**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2026**

**PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus* sp.
DENGAN METODE IMOBILISASI MENGGUNAKAN SILIKA GEL 60,
KITIN, DAN HIBRIDA SILIKA-KITIN**

Oleh

VIRGINIA NUH REZA AMANDA

Tesis

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
MAGISTER SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2026**

ABSTRAK

PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DARI *Aspergillus* sp. DENGAN METODE IMOBILISASI MENGGUNAKAN SILIKA GEL 60, KITIN, DAN HIBRIDA SILIKA-KITIN

Oleh

VIRGINIA NUH REZA AMANDA

Enzim banyak dimanfaatkan sebagai biokatalis industri, namun penggunaannya terbatas oleh kestabilan terhadap kondisi ekstrem. Penelitian ini bertujuan meningkatkan kestabilan dan memungkinkan pemakaian berulang enzim melalui imobilisasi menggunakan silika gel, kitin, dan hibrida silika-kitin. Prosedur penelitian dilakukan melalui tahapan berikut : produksi, isolasi, pemurnian dengan fraksinasi dan dialisis, imobilisasi, serta karakterisasi enzim. Aktivitas enzim dianalisis menggunakan metode Fuwa dan Mandels, sedangkan kadar protein ditentukan dengan metode Lowry.

Enzim hasil pemurnian mengalami peningkatan kemurnian 12 kali dibandingkan ekstrak kasar, dengan suhu optimum 50 °C dan aktivitas sisa 59,9 % setelah inkubasi 80 menit. Uji stabilitas enzim hasil pemurnian menunjukkan nilai $t_{(1/2)}$ sebesar 97,6 menit dan ΔG_i 103,616 kJ mol⁻¹. Enzim hasil imobilisasi dengan silika optimum pada suhu 60 °C, nilai $t_{(1/2)}$ sebesar 231,05 menit dan ΔG_i 109,294 kJ mol⁻¹. Enzim hasil imobilisasi dengan kitin optimum pada suhu 55 °C, nilai $t_{(1/2)}$ 150,68 menit, dan ΔG_i 106,446 kJ mol⁻¹. Enzim hasil imobilisasi dengan hibrida silika-kitin optimum pada suhu 55 °C, nilai $t_{(1/2)}$ 301,37 menit, dan ΔG_i 108,336 kJ mol⁻¹. Aktivitas sisa enzim hasil imobilisasi dengan silika, kitin, dan hibrida silika-kitin sebesar 78,3; 68,6; dan 81,1 % setelah inkubasi selama 80 menit.

Berdasarkan peningkatan nilai $t_{(1/2)}$, kestabilan enzim hasil imobilisasi menggunakan silika, kitin, dan hibrida silika-kitin meningkat masing-masing sebesar 2,37; 1,54; dan 3,09 kali. Enzim terimobilisasi pada hibrida silika-kitin dapat digunakan hingga 10 kali dengan aktivitas sisa 61,2 %, menunjukkan bahwa imobilisasi secara signifikan meningkatkan kestabilan termal dan potensi penggunaan ulang enzim α -amilase sebagai biokatalis yang lebih efisien.

Kata kunci: α -amilase, imobilisasi, silika gel, kitin, kestabilan termal, kinetika enzim

ABSTRACT

ENHANCEMENT OF α -AMYLASE STABILITY FROM *Aspergillus* sp. THROUGH IMMOBILIZATION USING SILICA GEL 60, CHITIN, AND SILICA-CHITIN HYBRID

By

VIRGINIA NUH REZA AMANDA

Enzymes are widely used as industrial biocatalysts; however, their application is limited by insufficient stability under extreme conditions. This study aimed to enhance enzyme stability and enable repeated use through immobilization using silica gel, chitin, and a silica–chitin hybrid. The research procedure consisted of enzyme production, isolation, purification by fractionation and dialysis, immobilization, and enzyme characterization. Enzyme activity was analyzed using the Fuwa and Mandels method, while protein content was determined by the Lowry method.

The purified enzyme exhibited a 12-fold increase in purity compared to the crude extract, with an optimum temperature of 50 °C and 59.9 % residual activity after 80 min of incubation. Thermal stability analysis of the purified enzyme showed a half-life ($t_{1/2}$) of 97.6 min and a ΔG_i value of 103.616 kJ mol⁻¹. The enzyme immobilized on silica gel showed an optimum temperature of 60 °C, a $t_{1/2}$ of 231.05 min, and a ΔG_i of 109.294 kJ mol⁻¹. The enzyme immobilized on chitin exhibited an optimum temperature of 55 °C, a $t_{1/2}$ of 150.68 min, and a ΔG_i of 106.446 kJ mol⁻¹. The silica–chitin hybrid–immobilized enzyme showed the best performance, with an optimum temperature of 55 °C, a $t_{1/2}$ of 301.37 min, and a ΔG_i of 108.336 kJ mol⁻¹. Residual activities of the immobilized enzymes on silica gel, chitin, and silica–chitin hybrid were 78.3, 68.6, and 81.1 %, respectively, after 80 min of incubation.

Based on the increase in half-life values, enzyme stability was enhanced by 2.37-, 1.54-, and 3.09-fold for silica gel, chitin, and silica-chitin hybrid immobilization, respectively. The enzyme immobilized on the silica-chitin hybrid retained 61.2% residual activity after 10 reuse cycles, indicating that immobilization significantly improves thermal stability and reuse potential of α -amylase as a more efficient biocatalyst.

Keywords: α -amylase, immobilization, silica gel, chitin, thermal stability, enzyme kinetics

Judul Tesis

: **PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM
 α -AMILASE DARI *Aspergillus* sp.
DENGAN METODE IMOBILISASI
MENGUNAKAN SILIKA GEL 60,
KITIN, DAN HIBRIDA SILIKA-KITIN**

Nama Mahasiswa

: **Virginia Nuh Reza Amanda**

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2427011005

Program Studi

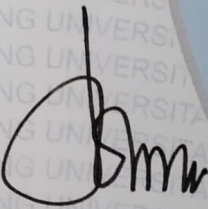
: Magister Kimia

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

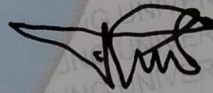
MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing



Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.

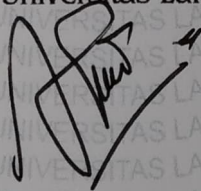
NIP 19560905 199203 1 001



Prof. Sutopo Hadi, M.Sc., Ph.D.

NIP 19710415 199512 1 001

2. Ketua Program Studi Magister Kimia
FMIPA Universitas Lampung



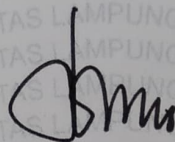
Prof. Dr. Dra. Ilim, M.S.

NIP 19650525 199003 2 002

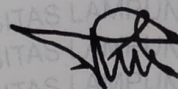
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

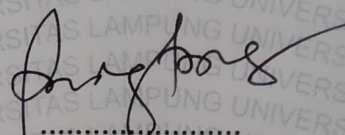
Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**



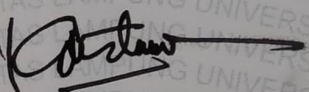
Sekretaris : **Prof. Sutopo Hadi, M.Sc., Ph.D.**



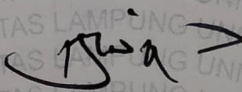
Anggota : **Prof. Dr. Rudy TM Situmeang, M.Sc.**



Dr. Agung Abadi Kiswandono, S.Si., M.Sc.



Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.

NIP 196401200501 1 002

3. Direktur Program Pascasarjana

Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.

NIP 19640326 198902 1 001

Tanggal Lulus Ujian Tesis : **29 Januari 2026**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Virginia Nuh Reza Amanda
Nomor Pokok Mahasiswa : 2427011005
Program Studi : Magister Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa tesis yang berjudul **“Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus* sp. dengan Metode Imobilisasi Menggunakan Silika Gel 60, Kitin, dan Hibrida Silika-Kitin”** adalah benar karya sendiri dan saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam tesis tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 29 Januari 2026
Mengetakan



Virginia Nuh Reza Amanda
NPM. 2427011005

RIWAYAT HIDUP



Virginia Nuh Reza Amanda lahir di Mengandung Sari, pada 27 April 2001. Penulis merupakan anak kedua dari Bapak Muhammad Nuh dan Ibu Titi Sulaimah. Penulis memiliki satu kakak perempuan, Yeni Nuhricha Sari, satu adik perempuan, Valentina Nuh Rosa Febriana, dan satu adik laki-laki, Afrizal Nuh Rizky Fernando. Penulis telah menyelesaikan pendidikan mulai dari Taman Kanak-kanak

di TK Aisiyah Bustanul Atfal, Mengandung Sari, pada tahun 2007, pendidikan sekolah dasar di SDN Kedung Ringin pada tahun 2013, pendidikan sekolah menengah pertama di SMP N 1 Pasir Sakti pada tahun 2016, pendidikan sekolah menengah atas di SMAN 1 Pasir Sakti pada tahun 2019, dan pendidikan S1 di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2023. Pada tahun 2024 penulis diterima sebagai Mahasiswi di Program Studi Magister Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis memiliki pengalaman akademik dan laboratorium di bidang biokimia. Penulis pernah menjadi Asisten Praktikum Biokimia untuk Mahasiswa Jurusan Biologi Universitas Terbuka. Selain itu, penulis juga berperan sebagai asisten dosen dengan tugas sebagai tutor mata kuliah Biokimia I dan Biokimia II, yang meliputi pendampingan proses pembelajaran, diskusi materi perkuliahan, serta membantu mahasiswa dalam memahami konsep-konsep dasar dan lanjutan biokimia. Penulis memiliki pengalaman sebagai operator instrumen spektrofotometer UV-Vis, termasuk dalam pengoperasian alat, pengukuran sampel, serta pengolahan dan analisis data hasil pengukuran. Pengalaman ini mendukung pemahaman penulis terhadap penerapan teknik spektroskopi dalam analisis dan penelitian biokimia.

Selain kegiatan akademik dan laboratorium, penulis juga ikut serta dalam penulisan karya ilmiah untuk publikasi, sehingga memiliki pengalaman dalam penyusunan naskah ilmiah, pengolahan data penelitian, serta penyesuaian penulisan sesuai dengan kaidah dan format jurnal ilmiah.

PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

Puji syukur kepada Allah SWT atas limpahan karunia-Nya. Kupersembahkan karya ini sebagai wujud bakti dan tanggung jawabku kepada:

Kedua orang tuaku tercinta,

Muhammad Nuh dan Titi Sulaimah yang telah percaya dan memberi kesempatan kepada penulis untuk dapat melanjutkan pendidikan kembali. Terima kasih atas kasih sayang, cinta, nasehat, doa, dan dukungan baik finansial maupun emosional. Papa dan Mama menjadi semangat dan alasan terbesar penulis untuk menyelesaikan tesis ini.

Kakakku, Yeni Nuhricha Sari, S.Kom. yang selalu menjadi pendengar untuk keluh-kesah dan memberi masukan serta motivasi selama menjalani perkuliahan. Terima kasih karena telah menjadi yang pertama dan contoh yang baik.

Adik-adikku, Valentina Nuh Rosa Febriana dan Afrizal Nuh Rizky Fernando yang selalu menghibur dengan canda-tawa, yang menjadi semangat tersendiri untukku.

Pembimbing penelitianku, Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S., M.S. yang telah memberikan kesempatan kepada penulis hingga dapat melanjutkan Pendidikan ke jenjang yang lebih tinggi dan Prof. Sutopo Hadi, M.Sc, Ph.D. yang telah membimbing penulis hingga dapat menyelesaikan perkuliahan ini tanpa hambatan.

Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia atas dedikasi dan ilmu yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di kampus.

Sahabat Penelitianku, yang telah memberikan warna selama penulis menjalani perkuliahan dan penelitian.

Serta
Almamaterku Tercinta

MOTTO

"Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya"

(Q.S. Al-Baqarah: 286)

"Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan"

(Q.S. Al-Insyirah: 6)

"Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah nasib suatu kaum sehingga mereka mengubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri."

(Q.S. Ar-Ra'd: 11)

"Dan Dia mendapatimu sebagai seorang yang bingung, lalu Dia memberikan petunjuk."

(Q.S. Ad-Duha: 7)

"Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman dan berilmu beberapa derajat"

(Q.S. Al-Mujādilah: 11)

SANWACANA

Segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus* sp. dengan Metode Imobilisasi Menggunakan Silika Gel 60, Kitin, dan Hibrida Silika-Kitin”**. Shalawat serta salam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW, beserta keluarga dan para sahabat serta umatnya di akhir zaman. Semoga di yaumul akhir kelak mendapatkan syafa’atnya. *Aamiin*.

Penulis menyadari bahwa dalam proses pengerjaan dan penulisan tesis ini tidak terlepas dari kesulitan dan rintangan yang penulis hadapi. Namun itu semua dapat terlewati berkat rahmat dan ridho Allah SWT serta bantuan, pengarahan, dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh sebab itu, pada kesempatan ini sebagai wujud rasa hormat, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. selaku Dosen Pembimbing I dan Dosen Pembimbing Akademik, atas kebaikan, bimbingan, arahan, masukan, dan seluruh ilmu pengetahuan yang diberikan selama proses perkuliahan sampai dengan penyelesaian tesis.
2. Bapak Prof. Sutopo Hadi, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing II, atas kebaikan, bimbingan, arahan, masukan, dan seluruh ilmu pengetahuan yang diberikan selama proses perkuliahan sampai dengan penyelesaian tesis.
3. Bapak Prof. Dr. Rudy TM Situmeang, M.Sc., Bapak Dr. Agung Abadi Kiswandono, S.Si., M.Sc., dan Bapak Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D., selaku Dosen Pembahas, atas kebaikan, bimbingan, arahan, masukan, dan seluruh ilmu pengetahuan yang diberikan selama proses perkuliahan sampai dengan penyelesaian tesis

4. Ibu Prof. Dr. Ilim, M.S., selaku Ketua Prodi Magister Kimia dan Ibu Prof. Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
5. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.
6. Bapak Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si., selaku Direktur Program Pascasarjana.
7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh dedikasi dan ilmu yang diberikan kepada penulis selama perkuliahan
8. Bapak dan Ibu Tenaga Kependidikan, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung serta Mba Della selaku PLP Laboratorium Biokimia yang memfasilitasi selama penelitian.
9. Teman-teman magister kimia Angkatan 2024, Dian, Annur, Mba Roicha, Yulis, Mba Atikah, dan Hanny yang telah kebersamaan penulis selama perkuliahan.
10. Teman-teman penelitian, Talfa, Anam, Dina, Titis, Sayyid, Alif, Harry, Desvica, Retno, Ulma yang selalu menjadi semangat penulis untuk melakukan penelitian. Dan tak lupa, Nindy Novita Sari, S.Pd., M.Si. teman, sahabat, sekaligus kakak bagi penulis, yang selalu mendengarkan dan memberi nasehat serta semangat kepada penulis.
11. Sahabat, teman, dan keluarga penulis Zahra, Happy, Rifdah, Shilvia, Munifah, Devy, Mba Rista, Mba Armi, Alinil, dan Ana yang selalu memberikan support dan menjadi pendengar untuk keluh-kesah penulis.
12. Serta seluruh pihak yang tidak dapat dituliskan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan tesis ini masih terdapat beberapa ketidaksempurnaan, akan tetapi penulis berharap semoga tesis ini dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan di masa depan.

Bandar Lampung, 29 Januari 2026
Penulis

Virginia Nuh Reza Amanda

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Enzim.....	6
2.2. Enzim Amilase	7
2.3. Enzim α -Amilase	9
2.4. Reaksi Hidrolisis Pati	10
2.5. <i>Aspergillus</i> sp.	12
2.6. Produksi Enzim dengan Metode Fermentasi	14
2.7. Isolasi Enzim dengan Sentrifugasi	14
2.8. Pemurnian Enzim	15
2.8.1. Fraksinasi	15
2.8.2. Dialisis	16
2.9. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase	17
2.9.1. Metode Fuwa	17
2.9.2. Metode Mandels	17
2.9.3. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry	18
2.10. Kinetika Reaksi Enzim	18
2.11. Kestabilan Enzim.....	19
2.11.1. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i)	20
2.11.2. Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i)	20
2.11.3. Waktu Paruh ($t_{1/2}$)	21
2.11.4. Kestabilan Termal.....	21
2.12. Imobilisasi Enzim	21
2.13. Silika Gel	23
2.14. Kitin	24
2.15. Material Hibrida	25

2.16. Glutaraldehida	26
2.17. Spektrofotometri UV-Vis	26
2.18. Spektrofotometri IR	27
III. METODE PENELITIAN	30
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	30
3.2. Alat dan Bahan	30
3.3. Prosedur Penelitian	31
3.3.1. Pembuatan Media Agar Miring	31
3.3.2. Pembiakan Isolat Baru <i>Aspergillus</i> sp.	32
3.3.3. Preparasi Produksi Enzim α -Amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.	32
3.3.3.1. Pembuatan larutan buffer fosfat	32
3.3.3.2. Pembuatan media inokulum dan fermentasi.....	33
3.3.4. Inokulasi <i>Aspergillus</i> sp.....	33
3.3.5. Produksi Enzim α -Amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.	34
3.3.6. Isolasi Enzim α -Amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.....	34
3.3.7. Pemurnian Enzim α -Amilase.....	35
3.3.7.1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	35
3.3.7.2. Dialisis	37
3.3.8. Penentuan Aktivitas Unit dengan Metode Fuwa	39
3.3.8.1. Pembuatan reagen Fuwa.....	39
3.3.8.2. Uji aktivitas metode Fuwa.....	39
3.3.9. Penentuan Aktivitas Unit dengan Metode Mandels	40
3.3.9.1. Pembuatan reagen Mandels	40
3.3.9.2. Pembuatan kurva standar glukosa	41
3.3.9.3. Uji aktivitas metode Mandels.....	41
3.3.10. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	42
3.3.10.1. Pembuatan pereaksi Lowry	42
3.3.10.2. Pembuatan kurva standar BSA.....	42
3.3.10.3. Penentuan kadar protein (Lowry, 1951)	43
3.3.11. Imobilisasi Enzim α -Amilase dengan Silika Gel 60.....	43
3.3.11.1. Penentuan pH buffer pengikatan enzim-silika gel 60	43
3.3.11.2. Imobilisasi enzim dengan silika gel 60.....	44
3.3.12. Imobilisasi Enzim α -Amilase dengan Kitin.....	44
3.3.12.1. Penentuan pH buffer pengikatan enzim-kitin.....	44
3.3.12.2. Imobilisasi enzim dengan kitin.....	45
3.3.13. Sintesis Hibrida Silika-Kitin.....	45
3.3.13.1. Pembuatan larutan	45
3.3.13.2. Pembuatan material hibrida silika-kitin.....	46
3.3.14. Analisis Spektroskopi IR	46
3.3.15. Imobilisasi Enzim α -Amilase dengan Hibrida Silika-Kitin.....	46
3.3.15.1. Penentuan pH buffer pengikatan enzim-matriks hibrida.....	47
3.3.15.2. Imobilisasi enzim dengan matriks hibrida.....	47
3.3.16. Karakterisasi Enzim α -Amilase Murni dan Hasil Imobilisasi ..	48
3.3.16.1. Penentuan pH optimum	48
3.3.16.2. Penentuan suhu optimum.....	48

3.3.16.3. Penentuan K_M dan V_{maks}	48
3.3.16.4. Penentuan kestabilan termal enzim	49
3.3.16.5. Pemakaian berulang enzim imobil	49
3.3.16.6. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi bebas akibat denaturasi (ΔG_i)	49
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	51
4.1. Produksi Enzim α -Amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.	51
4.2. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	51
4.3. Dialisis	53
4.4. Sintesis Hibrida Silika-Kitin	55
4.5. Analisis <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (FT-IR)	56
4.6. Penentuan pH Optimum Enzim Hasil Pemurnian	60
4.7. Penentuan pH Pengikatan Enzim α -Amilase dengan Matriks	61
4.8. Penentuan Suhu Optimum Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Terimobil	62
4.9. Penentuan Nilai K_M dan V_{maks} Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Imobilisasi	64
4.10. Penentuan Kestabilan Termal Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks Silika Gel 60, Kitin, dan Hibrida Silika-Kitin	65
4.11. Penentuan Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Imobilisasi pada Matriks Silika Gel 60, Kitin, dan Hibrida Silika-Kitin	67
4.12. Pemakaian Berulang Enzim α -Amilase Hasil Imobilisasi Menggunakan Silika Gel 60, Kitin, dan Hibrida Silika-Kitin	69
V. SIMPULAN DAN SARAN	71
5.1. Simpulan	71
5.2. Saran	72
DAFTAR PUSTAKA	73
LAMPIRAN	85

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Klasifikasi enzim berdasarkan reaksi yang dikatalisis (Berg <i>et al.</i> , 2007)	6
2. Metode imobilisasi enzim secara fisik dan kimia (Dwevedi, 2016)	22
3. Rangkuman hasil perhitungan massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (gram) yang ditambahkan untuk fraksinasi dengan berbagai persentase kejenuhan pada suhu $0\text{ }^\circ\text{C}$	38
4. Hasil pengukuran aktivitas enzim pada berbagai tahap	54
5. Nilai K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi	65
6. Nilai konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim α -amilase bebas dan enzim α -amilase hasil imobilisasi.....	68
7. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat pada beberapa tingkat fraksi dengan aktivitas enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.....	86
8. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat pada fraksi 0-15% dan 15-85% dengan aktivitas enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.....	86
9. Hubungan antara pH optimum terhadap aktivitas unit (U/mL) dan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase bebas	87
10. Hubungan antara pH pengikatan terhadap aktivitas unit (U/mL) dan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase/silika	87
11. Hubungan antara pH pengikatan terhadap aktivitas unit (U/mL) dan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase/kitin	87
12. Hubungan antara pH pengikatan terhadap aktivitas unit (U/mL) dan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase/hibrida	87
13. Hubungan antara suhu optimum terhadap aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase bebas dan hasil imobilisasi.....	88

14. Hubungan antara suhu optimum terhadap aktivitas sisa (%) enzim α -amilase bebas dan hasil imobilisasi.....	88
15. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas unit enzim α -amilase bebas, α -amilase/silika, α -amilase/kitin dan α -amilase/hibrida	89
16. Data grafik Lineweaver-Burk enzim α -amilase bebas, α -amilase/silika, α -amilase/kitin dan α -amilase/hibrida	89
17. Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase bebas, α -amilase/silika, α -amilase/kitin dan α -amilase/hibrida pada suhu 60 °C	90
18. Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas sisa (%) enzim α -amilase bebas, α -amilase/silika, α -amilase/kitin dan α -amilase/hibrida pada suhu 60 °C	90
19. Data grafik laju inaktivasi termal orde satu enzim α -amilase bebas, α -amilase/silika, α -amilase/kitin dan α -amilase/hibrida	91
20. Aktivitas unit pemakaian berulang enzim α -amilase bebas, α -amilase/silika, α -amilase/kitin dan α -amilase/hibrida	95
21. Aktivitas sisa pemakaian berulang enzim α -amilase bebas, α -amilase/silika, α -amilase/kitin dan α -amilase/hibrida	95
22. Penentuan panjang gelombang maksimum untuk metode Lowry	96
23. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	97
24. Penentuan panjang gelombang maksimum metode Mandels	98
25. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi	99
26. Penentuan panjang gelombang maksimum untuk metode Fuwa	101
27. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV- <i>Vis</i> dengan metode Fuwa (λ_{maks} : 600 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis	102
28. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV- <i>Vis</i> dengan metode Lowry (λ_{maks} : 750 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, dan hasil dialisis	102
29. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV- <i>Vis</i> dengan metode Mandels (λ_{maks} : 510 nm) untuk penentuan pH optimum enzim hasil pemurnian	102

30. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* dengan metode Mandels (λ_{maks} : 510 nm) untuk penentuan pH buffer pengikatan enzim α -amilase/silika, α -amilase/kitin, dan α -amilase/hibrida 103
31. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* dengan metode Mandels (λ_{maks} : 510 nm) untuk penentuan suhu optimum enzim α -amilase bebas, α -amilase/silika, α -amilase/kitin, dan α -amilase/hibrida 103
32. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* dengan metode Mandels (λ_{maks} : 510 nm) untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase bebas, α -amilase/silika, α -amilase/kitin, dan α -amilase/hibrida 104
33. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* dengan metode Mandels (λ_{maks} : 510 nm) untuk penentuan kestabilan termal enzim α -amilase bebas, α -amilase/silika, α -amilase/kitin, dan α -amilase/hibrida 105
34. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* dengan metode Mandels (λ_{maks} : 510 nm) untuk penentuan pemakaian berulang enzim α -amilase/silika, α -amilase/kitin, dan α -amilase/hibrida 106

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Model interaksi enzim dengan substrat (Atkins <i>et al.</i> , 2018)	7
2. Struktur 3D enzim α -amilase yang berasal dari <i>A. oryzae</i> (Gee <i>et al.</i> , 2021).....	9
3. Struktur (a) amilosa dan (b) amilopektin pada pati (Bergthaller and Hollmann, 2014)	11
4. Mekanisme katalisis reaksi hidrolisis pati oleh enzim α -amilase (Uitdehaag <i>et al.</i> , 1999)	12
5. Pemurnian enzim dengan metode dialisis (Berg <i>et al.</i> , 2007).....	16
6. Reaksi antara DNS dengan glukosa (Deshavath <i>et al.</i> , 2020).....	17
7. Grafik Lineweaver-Burk (Atkins <i>et al.</i> , 2018).....	19
8. Struktur kimia silika gel (Hamza <i>et al.</i> , 2017)	23
9. Struktur kimia kitin (Mei <i>et al.</i> , 2018)	24
10. Struktur senyawa glutaraldehida	26
11. Skema alat spektrofotometer UV-Vis (Suhartati, 2017)	27
12. Spektrum FTIR (a) kitin tidak di-bleaching (b) kitin hasil bleaching (Triunfo <i>et al.</i> , 2022)	28
13. Spektrum FTIR serbuk limbah kaca dan silika gel (Ni'mah <i>et al.</i> , 2022b)	29
14. Ilustrasi fermentasi metode <i>Submerged Fermentation</i> (SmF)	34
15. Skema fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat	35
16. Ilustrasi metode fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan amonium	37

17. Ilustrasi metode dialisis.....	37
18. Skema penelitian	50
19. Hubungan antara persentase kejenuhan amonium sulfat (%) terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.....	52
20. Hubungan antara persentase kejenuhan amonium sulfat (0-15) % dan (15-85) % terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim α -amilase dari <i>Aspergillus</i> sp.....	53
21. Perbedaan warna pada (a) silika gel 60, (b) kitin, dan (c) hibrida	55
22. Spektrum FTIR silika gel 60 (standar).....	57
23. Spektrum FTIR kitin (standar)	58
24. Spektrum FTIR hibrida silika-kitin.....	60
25. Hubungan pH dengan aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian.....	61
26. Hubungan pH pengikatan dengan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil imobilisasi	62
27. Hubungan antara suhu ($^{\circ}\text{C}$) dengan aktivitas sisa (%) α -amilase	63
28. Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil pemurnian dan enzim hasil imobilisasi	64
29. Stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan hasil imobilisasi pada matriks silika gel 60, kitin, dan hibrida silika-kitin	66
30. Grafik $\text{Ln}(E_i/E_o)$ enzim α -amilase bebas dan enzim α -amilase hasil imobilisasi menggunakan silika gel 60, kitin, dan hibrida silika-kitin.....	67
31. Grafik pemakaian berulang enzim hasil imobilisasi menggunakan silika gel 60, kitin, dan hibrida silika-kitin	70
32. Grafik penentuan panjang gelombang maksimum untuk metode Lowry	96
33. Kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA).....	97
34. Penentuan panjang gelombang maksimum metode Mandels	98
35. Kurva standar glukosa.....	99
36. Grafik panjang gelombang maksimum metode Fuwa	101

37. Hasil produksi enzim α -amilase	108
38. Tahapan pemurnian dengan (a) fraksinasi dan (b) dialisis.....	108
39. Hasil uji aktivitas enzim metode (a) Fuwa, (b) Lowry, dan (c) Mandels	109

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Aktivitas Enzim pada berbagai Persentase Kejenuhan Amonium Sulfat	86
2. Data Penentuan pH Optimum Enzim α -Amilase Bebas dan pH Pengikatan Enzim Hasil Imobilisasi	87
3. Aktivitas Unit dan Aktivitas Sisa Enzim α -Amilase berbagai Variasi Suhu	88
4. Data Penentuan Nilai K_M dan V_{maks}	89
5. Aktivitas Unit dan Aktivitas Sisa Enzim Penentuan Stabilitas Termal	90
6. Data Grafik Laju Inaktivasi Termal Enzim Orde Satu	91
7. Perhitungan Waktu Paruh ($t_{1/2}$)	92
8. Perhitungan Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i)	93
9. Data Pemakaian Berulang Enzim A-Amilase Bebas, α -Amilase/Silika, α -Amilase/Kitin dan α -Amilase/Hibrida.....	95
10. Data Penentuan Panjang Gelombang Maksimum untuk Metode Lowry	96
11. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	97
12. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Metode Mandels	98
13. Kurva Standar Glukosa	99
14. Persamaan untuk Menghitung Aktivitas Unit Metode Mandels	100
15. Data Penentuan Panjang Gelombang Maksimum untuk Metode Fuwa.....	101
16. Data Hasil Pengukuran Absorbansi Menggunakan Spektrofotometer UV- <i>Vis</i>	102
17. Hasil Produksi, Uji Aktivitas, dan Kadar Protein	108

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim merupakan biomolekul yang berperan sebagai katalis dalam reaksi-reaksi biokimia dan memiliki aplikasi luas di berbagai sektor (Al Angari *et al.*, 2023; El-Shishtawy *et al.*, 2023). Nilai pasar global enzim diperkirakan mencapai 13,11 miliar USD pada tahun 2023 dan diprediksi meningkat menjadi 20,31 miliar USD pada tahun 2030, dengan laju pertumbuhan tahunan gabungan (CAGR) sebesar 4,9 % selama periode 2024 hingga 2030. Pada skala industri, perusahaan-perusahaan besar umumnya memanfaatkan mikroorganisme seperti jamur, ragi, dan bakteri sebagai inang penghasil enzim (*Grand View Research*, 2024). Penggunaan enzim ini secara luas didukung oleh kondisi reaksi yang relatif ringan, spesifisitas tinggi terhadap substrat, serta sifatnya yang ramah lingkungan (Al Angari *et al.*, 2023; El-Shishtawy *et al.*, 2023).

Para peneliti menunjukkan ketertarikan dalam memanfaatkan enzim untuk berbagai sektor industri sebagai alternatif bahan kimia. Enzim yang diperoleh dari mikroorganisme lebih diprioritaskan karena memiliki karakteristik yang paling sesuai untuk aplikasi bioteknologi (Wahab *and* Ahmed, 2018). Karakteristik penting seperti kestabilan, efisiensi, biaya yang ekonomis, kemudahan dalam rekayasa genetik, serta daya adaptasi yang tinggi membuat enzim dari mikroba lebih diminati dalam berbagai aplikasi industri (Naik *et al.*, 2023). Dalam industri makanan, tekstil, deterjen, farmasi, kertas, dan kulit, α -amilase termasuk enzim amilolitik yang paling sering digunakan (Acet *et al.*, 2021; Almulaiky *et al.*, 2021; Gupta *et al.*, 2022).

α -Amilase merupakan enzim hidrolase yang berperan dalam mengkatalisis pemutusan ikatan α -1,4-glikosidik di bagian dalam molekul pati, menghasilkan senyawa seperti glukosa dan maltosa. α -amilase dapat diperoleh dari mikroorganisme, tumbuhan, maupun hewan (Sundarram *and* Murthy, 2014). α -amilase yang berasal dari mikroba memiliki banyak keuntungan karena menunjukkan aktivitas enzimatik yang tinggi dalam berbagai kondisi. Enzim amilolitik dapat diproduksi melalui bioproses dengan memanfaatkan jamur berfilamen atau dengan menggunakan limbah hasil samping dari industri pertanian seperti dedak gandum, dedak jagung, bungkil kedelai, ampas tebu, dan sejenisnya (Oliveira *et al.*, 2013; Ramos-Sánchez *et al.*, 2015). Genus *Aspergillus* termasuk jenis jamur berfilamen yang paling sering dimanfaatkan dalam pembuatan enzim amilolitik (Venkat 2007). Kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap berbagai kondisi lingkungan memungkinkan spesies ini bertahan pada rentang suhu yang luas, kadar air rendah, serta variasi pH tanah dan konsentrasi oksigen (Gallo *et al.*, 2016). Berbagai spesies dalam genus *Aspergillus* dapat ditemukan dan diisolasi dari beragam substrat serta inang, seperti tanah, tumbuhan yang mengalami pembusukan, produk makanan, dan berbagai bahan organik lainnya. Karena mampu beradaptasi dan tumbuh di berbagai kondisi lingkungan, jamur-jamur ini menjadi penghuni yang umum di banyak ekosistem (Houbraken *et al.*, 2020; Tsang *et al.*, 2018; Visagie *et al.*, 2024).

Aplikasi enzim pada skala industri masih menghadapi sejumlah keterbatasan, mengingat enzim rentan mengalami denaturasi akibat paparan terhadap kondisi lingkungan yang ekstrem. Untuk mengatasi hal tersebut, berbagai pendekatan terus dikembangkan guna menciptakan lingkungan yang mendukung stabilitas dan efektivitas aktivitas enzimatik (Abdulaal, 2018). Imobilisasi enzim merupakan strategi yang efektif untuk meningkatkan stabilitas enzim. Secara umum, imobilisasi enzim didefinisikan sebagai proses penjerapan atau pengikatan enzim pada suatu matriks pembawa, yang membatasi mobilitasnya tanpa mengurangi aktivitas katalitiknya. Penerapan sistem imobilisasi memberikan sejumlah keuntungan, antara lain peningkatan stabilitas struktural, perlindungan terhadap kondisi ekstrem, peningkatan efisiensi katalitik, ketahanan yang lebih tinggi terhadap denaturasi, serta dapat dipakai secara berulang. Keunggulan-keunggulan

tersebut mendukung aplikasi imobilisasi secara luas dalam berbagai bidang bioteknologi. Efektivitas proses imobilisasi sangat dipengaruhi oleh metode yang diterapkan serta jenis material pembawa yang digunakan (Chauhan *and* Upadhyay, 2021; Pandey *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2017).

Perkembangan terkait imobilisasi enzim α -amilase telah dilakukan oleh beberapa peneliti, di antaranya yaitu Gali *et al.* (2021) yang melakukan imobilisasi enzim α -amilase dengan nanofiber dan berhasil mempertahankan aktivitas enzim sebesar 90 % setelah 6 kali pemakaian. Tincu *et al.* (2023), telah berhasil melakukan imobilisasi enzim α -amilase menggunakan partikel hidrogel berbasis gellan yang dapat digunakan 11 kali dengan aktivitas yang dipertahankan sekitar 75 %. Penelitian Yandri *et al.* (2023), melakukan imobilisasi enzim α -amilase dari *Aspergillus fumigatus* menggunakan kitin diperoleh hasil bahwa matriks kitin dapat meningkatkan kestabilan enzim α -amilase sebesar 3,8 kali dengan aktivitas sisa sebesar 38 % setelah 6 kali pemakaian. Rizki *et al.* (2020) berhasil mengimobilisasi enzim lipase menggunakan silika gel dari abu sekam padi dengan aktivitas sisa sebesar 67.71 % setelah 6 kali pemakaian. Berdasarkan keberhasilan penelitian tersebut, dapat diketahui bahwa imobilisasi menggunakan silika maupun kitin mampu meningkatkan stabilitas enzim dengan mempertahankan aktivitas sisa yang relatif tinggi. Pengembangan matriks gabungan atau hibrida berbasis silika-kitin membuka peluang yang lebih besar karena mengkombinasikan keunggulan masing-masing matriks. Penggabungan kedua matriks tersebut diharapkan menjadi matriks imobilisasi yang lebih kuat, stabil, dan efisien dalam mempertahankan aktivitas enzim selama digunakan secara berulang.

Kajian mengenai pemanfaatan matriks hibrida untuk proses imobilisasi enzim serupa juga telah dilakukan oleh sejumlah peneliti seperti Yandri *et al.* (2022) mengimobilisasi enzim α -amilase menggunakan matriks hibrida zeolit-chitosan didapatkan hasil bahwa matriks zeolit-kitosan dapat meningkatkan kestabilan enzim α -amilase sebesar 4,65 kali dari enzim sebelum imobilisasi dengan aktivitas sisa sebesar 10,97 % setelah 5 kali pemakaian. Selain itu, Tiarsa *et al.* (2022), melakukan imobilisasi enzim α -amilase dari *A. fumigatus* menggunakan matriks

hibrida kitin-bentonit meningkatkan kestabilan enzim 3,8 kali dengan aktivitas sisa sebesar 38 % setelah 6 kali pemakaian.

Penelitian ini memiliki nilai kebaruan yang signifikan dalam bidang bioteknologi enzim, khususnya pada aplikasi imobilisasi untuk peningkatan kestabilan enzim α -amilase, karena hingga saat ini kajian yang secara spesifik memproduksi dan mengimobilisasi enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. dengan menggunakan kombinasi matriks silika gel 60 dan kitin masih sangat terbatas, bahkan belum banyak dilaporkan secara sistematis. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan isolasi, pemurnian, dan imobilisasi enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. menggunakan silika gel 60, kitin, serta hibrida silika-kitin dengan harapan dapat meningkatkan stabilitas serta memungkinkan pemakaian berulang enzim setelah diimobilisasi sebagaimana ditunjukkan pada penelitian sebelumnya.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. dengan aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim.
2. Memperoleh enzim α -amilase hasil imobilisasi yang dapat digunakan secara berulang dan memiliki kestabilan lebih tinggi dibandingkan enzim hasil pemurnian.
3. Mengetahui matriks imobilisasi paling baik antara silika gel 60, kitin, dan hibrida silika-kitin terhadap peningkatan kestabilan enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp.

1.3. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi mengenai kemampuan pemakaian berulang enzim α -amilase yang berasal dari *Aspergillus* sp. yang telah ditingkatkan kestabilannya dengan metode imobil pada silika, kitin, dan hibrida silika-kitin sebagai upaya efisiensi biaya enzim dalam industri kimia.

2. Memberikan informasi tentang nilai aktivitas, suhu optimum, K_M , V_{maks} , k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i enzim α -amilase dari *Aspergillus* sp. hasil pemurnian dan hasil imobilisasi sebagai salah satu literatur penelitian selanjutnya.
3. Menambah wawasan enzimologi melalui studi pengaruh tiga jenis material pengimobil, yaitu silika, kitin, dan hibrida silika-kitin, terhadap peningkatan kestabilan enzim.

II. TINJAUAN PUSTAKA

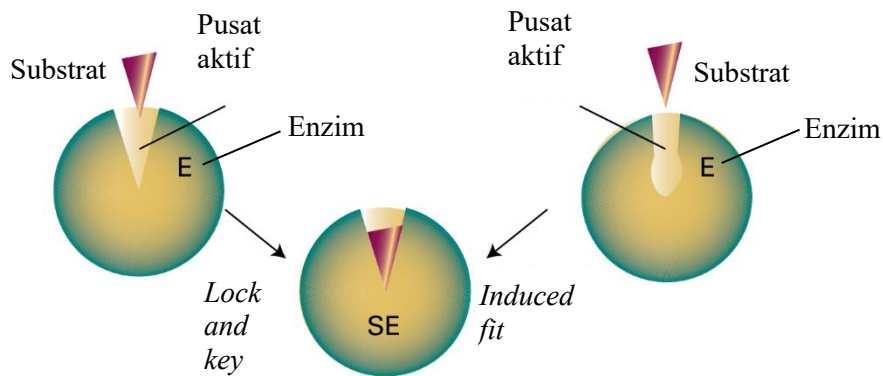
2.1. Enzim

Enzim merupakan biomolekul yang berperan sebagai katalis dalam reaksi-reaksi biokimia dan memiliki aplikasi luas di berbagai sektor (Al Angari *et al.*, 2023; El-Shishtawy *et al.*, 2023). Peran utama enzim adalah mempercepat laju reaksi biologis yang esensial bagi keberlangsungan hidup manusia dengan cara menurunkan energi aktivasi, tanpa menyebabkan perubahan yang berarti pada reaksi tersebut. Berdasarkan jenis reaksi kimia yang dikatalisis, enzim dikelompokkan ke dalam tujuh kelas utama, meliputi oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, ligase, dan translokase. Klasifikasi enzim berdasarkan reaksi yang dikatalisis dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi enzim berdasarkan reaksi yang dikatalisis (Berg *et al.*, 2007)

Kelas Enzim	Jenis Reaksi	Contoh
Oksidoreduktase	Oksidasi-reduksi	Laktat dehidrogenase
Transferase	Transfer gugus (<i>group transfer</i>)	Nukleosida monofosfat kinase
Hidrolase	Hidrolisis (transfer gugus fungsional ke air)	Kimotripsin
Liase	Penambahan atau penghilangan gugus untuk membentuk ikatan rangkap	Fumarase
Isomerase	Isomerisasi (transfer gugus intramolekul)	Triose fosfat isomerase
Ligase	Penggabungan dua substrat dengan bantuan hidrolisis ATP	Aminoasil-tRNA sintetase

Keberadaan enzim meliputi seluruh makhluk hidup, mulai dari mikroorganisme hingga tumbuhan dan hewan, sehingga memiliki potensi besar untuk dimanfaatkan dalam berbagai aplikasi industri. Sejumlah enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme telah diidentifikasi sebagai katalis efektif untuk sintesis berbagai produk dari beragam substrat, dengan proses yang berlangsung pada kondisi terkontrol (Singh *et al.*, 2019). Enzim memiliki situs aktif yang berperan dalam mengikat substrat serta mengkatalisis reaksinya menjadi produk. Mekanisme interaksi substrat dengan situs aktif dijelaskan melalui dua model. Model kunci-gembok (*lock-and-key*) menyatakan bahwa situs aktif dan substrat memiliki bentuk tiga dimensi yang saling sesuai sehingga dapat berikatan tanpa perubahan struktur yang berarti. Sebaliknya, bukti eksperimental lebih banyak mendukung model kecocokan terinduksi (*induced fit*), karena proses pengikatan substrat menyebabkan terjadinya perubahan konformasi pada situs aktif. Setelah perubahan tersebut, barulah substrat dapat menempati situs aktif dengan tepat (Atkins *et al.*, 2018). Ilustrasi model interaksi enzim dengan substrat dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Model interaksi enzim dengan substrat (Atkins *et al.*, 2018)

2.2. Enzim Amilase

Amilase terdiri dari tiga jenis, yaitu alfa, beta, dan gamma (α -amilase, EC 3.2.1.1; β -amilase, EC 3.2.1.2; dan γ -amilase, EC 3.2.1.3) yang masing-masing memiliki cara berbeda dalam memutuskan ikatan pada pati (Arora *et al.*, 2017; Samanta, 2022). α -Amilase merupakan enzim hidrolase yang berperan dalam mengkatalisis

pemutusan ikatan α -1,4-glikosidik di bagian dalam molekul pati, menghasilkan senyawa seperti glukosa dan maltosa. Enzim ini tergolong metalo-enzim kalsium, artinya aktivitasnya memerlukan keberadaan kofaktor logam. β -Amilase adalah enzim ekso-hidrolase yang memecah rantai polisakarida dari ujung non reduksi dengan menghidrolisis ikatan α -1,4-glukan, sehingga terbentuk unit maltosa secara berurutan. Karena tidak mampu memutus ikatan bercabang pada polisakarida seperti glikogen atau amilopektin, proses hidrolisisnya tidak sempurna dan meninggalkan sisa unit dekstrin. γ -Amilase dapat memutus ikatan α -1,6-glikosidik, serta memecah ikatan α -1,4-glikosidik terakhir pada ujung non reduksi amilosa dan amilopektin. Berbeda dari jenis amilase lainnya, enzim ini menghasilkan glukosa sebagai produk akhirnya (Sundarram *and* Murthy, 2014).

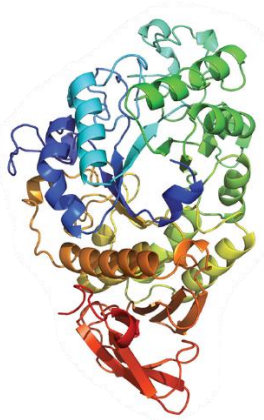
Amilase adalah enzim biokatalis yang berperan dalam mendegradasi molekul pati menjadi glukosa, maltosa, maltotriosa, serta dekstrin melalui pemutusan ikatan glikosidik dalam polimer pati (Arora *et al.*, 2017). Amilase merupakan salah satu enzim utama yang menyumbang sekitar 25-33 % dari pangsa pasar enzim secara global dan memiliki peran yang sangat signifikan dalam berbagai sektor industri, seperti produksi bioetanol, proses sakarifikasi pati, industri pangan, tekstil, pembuatan bir, serta industri pulp, dan kertas. Selain itu, amilase juga banyak dimanfaatkan dalam bidang farmasi, medis, kimia analitik, serta bioteknologi (Abdel-Mageed *et al.*, 2019; Al-Bedak *et al.*, 2022; Hesham *et al.*, 2019).

Amilase dapat diperoleh dari mikroorganisme, tumbuhan, maupun hewan (Sundarram *and* Murthy, 2014). Amilase yang berasal dari mikroba memiliki banyak keuntungan karena menunjukkan aktivitas enzimatik yang tinggi dalam berbagai kondisi. Enzim amilolitik dapat diproduksi melalui bioproses dengan memanfaatkan jamur berfilamen atau dengan menggunakan limbah hasil samping dari industri pertanian seperti dedak gandum, dedak jagung, bungkil kedelai, ampas tebu, dan sejenisnya (Oliveira *et al.*, 2013; Ramos-Sánchez *et al.*, 2015). Dari berbagai jenis jamur berfilamen, genus *Aspergillus* paling sering dimanfaatkan dalam pembuatan enzim amilolitik (Venkat, 2007).

2.3. Enzim α -Amilase

Enzim α -amilase (α -1,4-glukan-4-glukanohidrolase) berfungsi memecah molekul pati dengan memutus ikatan glikosidik α -1,4, sehingga menghasilkan maltosa, dekstrin, atau D-glukosa. Secara komersial, α -amilase mikroba dimanfaatkan sebagai biokatalis dalam berbagai bidang industri, antara lain deterjen, sirup, roti dan kue, produk olahan susu, pengolahan pati, pakan ternak, tekstil dan kulit, pulp dan kertas, permen, gula, bioetanol, farmasi, serta pengolahan limbah (Far *et al.*, 2020; Vogel and May, 2019).

Sebagai metaloenzim, α -amilase memerlukan ion kalsium sebagai kofaktor agar dapat berfungsi secara optimal (Sundarram and Murthy, 2014). Enzim ini termasuk endo-amilase yang mampu menghidrolisis pada bagian dalam rantai polisakarida dan memutus ikatan glikosidik α -D-(1,4) dengan pati sebagai substrat utamanya. Aktivitas α -amilase sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, terutama suhu dan pH, dan menunjukkan kinerja terbaik pada pH 7. Struktur tiga dimensinya mendukung pengikatan substrat dan memberikan spesifisitas yang tinggi (Offen *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2017; Sundarram and Murthy, 2014). Enzim ini memiliki berat molekul 57,6 kDa dan tersusun atas satu rantai oligosakarida yang terdiri dari 512 residu asam amino (Sahni and Goel, 2015). Struktur 3D enzim α -amilase dari *A. Oryzae* ditunjukkan pada Gambar 2.

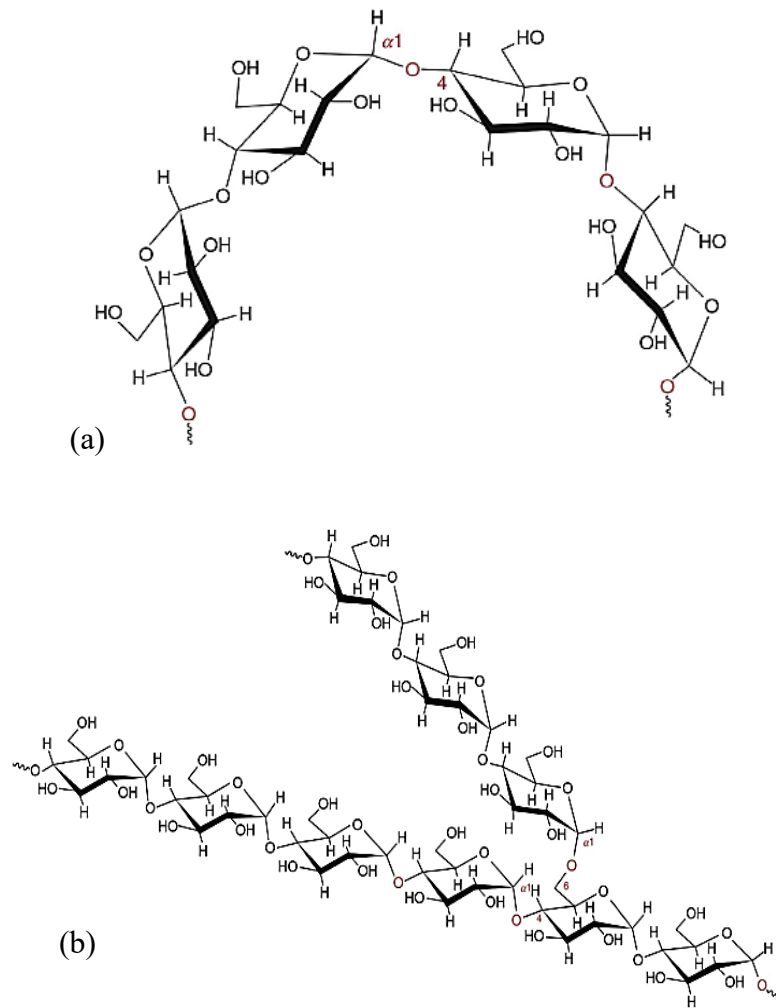


Gambar 2. Struktur 3D enzim α -amilase yang berasal dari *A. oryzae* (Gee *et al.*, 2021)

Dalam kelompok enzim karbohidrase, enzim amilolitik seperti α -amilase dan glukamilase memiliki peran yang signifikan dalam bidang industri. Enzim-enzim ini berfungsi menghidrolisis berbagai substrat, termasuk pululan, glikogen, pati, serta polisakarida kompleks lainnya (Jafari *et al.*, 2022). α -Amilase merupakan salah satu jenis amilase paling penting yang secara alami disintesis oleh hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Namun, α -amilase yang dihasilkan oleh bakteri menempati posisi istimewa dalam sektor industri dan perdagangan (Movahedpour *et al.*, 2022).

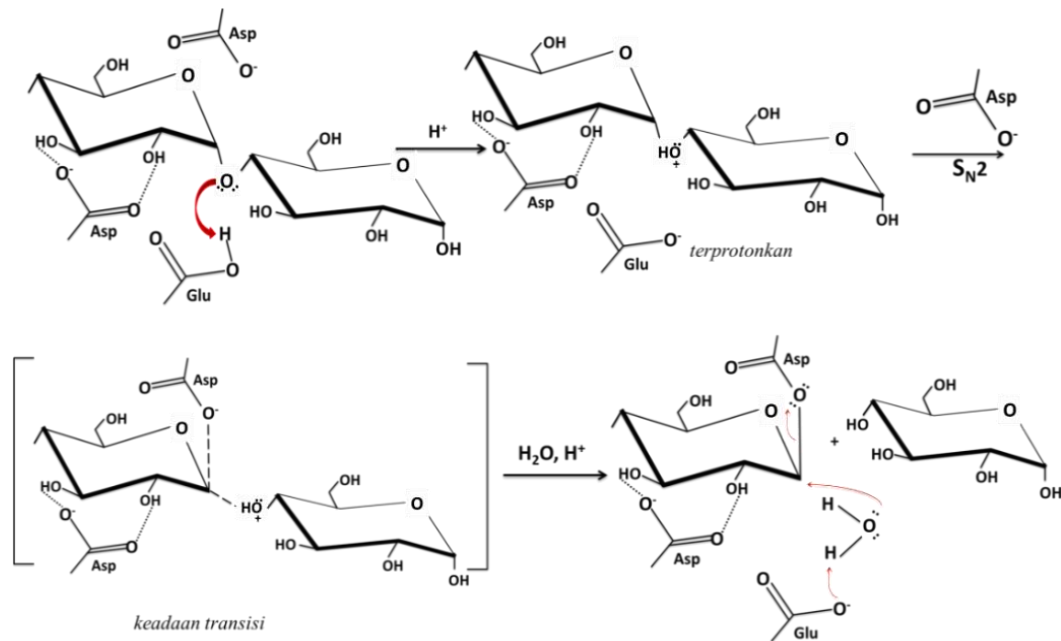
2.4. Reaksi Hidrolisis Pati

Pati dihasilkan oleh berbagai tanaman, antara lain umbi-umbian tropis seperti singkong, ubi, dan ubi jalar (Kumar *et al.*, 2024); biji-bijian serta serealialia seperti beras, jagung, gandum, barley, dan oat (Wang and Guo, 2020); juga buah-buahan seperti sukun, sirsak, tomat, nanas, dan pisang (Sorhaindo and Cuffy, 2023). Sebagai salah satu komponen biomassa yang paling melimpah di alam, sumber-sumber tersebut umumnya memiliki kandungan pati yang tinggi (Amir *et al.*, 2024). Dari segi struktur, pati terdiri atas dua jenis polimer glukosa, yakni amilosa, polimer linear dengan ± 99 % ikatan α -1,4-glukan, dan amilopektin, polimer bercabang dengan ± 95 % ikatan α -1,4-glukan serta ± 5 % ikatan α -1,6-glukan (Kong, 2020). Sumber utama pati berkualitas farmasi mencakup singkong, jagung, gandum, dan kentang (Cereda and Vilpoux, 2023). Dalam skala industri, pati dapat dimodifikasi melalui proses hidrolisis enzimatis maupun asam, yang umumnya menggunakan pati dari jagung, gandum, beras, singkong, atau kentang (Olawoye *et al.*, 2023). Hidrolisis enzimatis lebih banyak dipilih karena mampu mencegah perubahan warna atau rasa yang tidak diinginkan serta memberikan kendali lebih baik, terutama pada pemutusan ikatan glikosidik α -1,6 yang sulit dipecah dengan hidrolisis asam (Compart *et al.*, 2023). Struktur amilosa dan amilopektin ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur (a) amilosa dan (b) amilopektin pada pati (Bergthaller *and* Hollmann, 2014)

α -Amilase hanya memecah ikatan glikosidik 1,4 dan menghasilkan oligosakarida yang dapat menghambat kelanjutan proses hidrolisis. Namun, glukoamilase mampu mengkonversi oligosakarida tersebut menjadi glukosa melalui pemutusan ikatan glikosidik 1,4 dan 1,6 (Bednarska, 2015; Guo *et al.*, 2020). Selain itu, kadar pati berpengaruh terhadap aktivitas enzim, dan peningkatan konsentrasi enzim dapat mempercepat serta meningkatkan efektivitas proses hidrolisis (Witasari *et al.*, 2024). Mekanisme katalisis reaksi hidrolisis pati oleh enzim α -amilase dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Mekanisme katalisis reaksi hidrolisis pati oleh enzim α -amilase (Uitdehaag *et al.*, 1999)

Gambar 4 menunjukkan mekanisme katalisis reaksi hidrolisis substrat pati oleh enzim α -amilase. Proses ini terdiri dari empat tahap, yaitu: tahap protonasi, serangan nukleofilik, pembentukan keadaan transisi, dan terakhir yaitu hidrolisis. Dalam proses hidrolisis substrat, terdapat tiga residu asam amino yang menjadi bagian dari sisi aktif, yaitu satu residu asam glutamat dan dua residu asam aspartat (Kuriki *and* Imanaka, 1999). Fungsi residu asam glutamat bertindak sebagai katalisator asam, sementara satu dari kedua residu asam aspartat bertugas sebagai nukleofil dan residu asam aspartat lainnya berperan dalam pengikatan substrat (Uitdehaag *et al.*, 1999).

2.5. *Aspergillus* sp.

Aspergillus adalah genus jamur yang tersebar luas dan mampu tumbuh pada hampir semua jenis substrat. Jamur ini dapat ditemukan pada buah yang membusuk, sayuran, biji-bijian, roti, serta berbagai bahan pangan lainnya. Beberapa spesiesnya bersifat patogen, seperti penyebab penyakit aspergillosis, sementara sebagian lainnya bersifat saprofit dan banyak dijumpai pada bahan

pangan (Makfoeld, 1993). Spesies *Aspergillus* yang diketahui dapat menimbulkan penyakit antara lain *A. flavus*, *A. fumigatus*, dan *A. niger* (Susanto *et al.*, 2008).

Taksonomi dari *Aspergillus* sp. sebagai berikut:

Kingdom : Fungi
 Filum : Ascomycota
 Kelas : Eurotiomycetes
 Ordo : Eurotiales
 Famili : Trichomaceae
 Genus : *Aspergillus*
 Spesies : *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, dll.

Meskipun dapat diperoleh dari beragam lingkungan, habitat alami *Aspergillus* sp. adalah tanah (Drott *et al.*, 2017). Spesies *Aspergillus* umumnya dijumpai di wilayah beriklim tropis dan subtropis dengan garis lintang 25–35 derajat (Giusiano *et al.*, 2017; Klich, 2002). Kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap berbagai kondisi lingkungan memungkinkan spesies ini bertahan pada rentang suhu yang luas, kadar air rendah, serta variasi pH tanah dan konsentrasi oksigen (Gallo *et al.*, 2016). Interaksi *Aspergillus* dengan faktor biotik dan abiotik menentukan jenis serta fungsi metabolit sekundernya, seperti aflatoksin, gliotoksin, patulin, asam siklopiazonik, dan okratoksin, yang akan dihasilkan (Pfliegler *et al.*, 2020).

Jamur *Aspergillus* tersebar di berbagai lingkungan dan mampu menimbulkan beragam sindrom klinis yang bergantung pada kondisi kekebalan tubuh inang (Hébert-Seropian and Pelet, 2020; Koutserimpas *et al.*, 2021; Latgé and Chamilos, 2019). Dalam beberapa dekade terakhir, jumlah pasien dengan gangguan sistem imun mengalami peningkatan, yang berdampak pada naiknya angka infeksi jamur invasif. Aspergillosis invasif menjadi salah satu penyebab utama tingginya angka morbiditas dan mortalitas pada pasien dengan imunokompromi (Hébert-Seropian and Pelet, 2020). Infeksi aspergillosis pada saluran pernapasan, jaringan lunak, dan kulit akibat inhalasi spora, serta

keterlibatan saluran pencernaan yang jarang terjadi, telah dilaporkan secara luas (Hébert-Seropian *and* Pelet, 2020; Latgé *and* Chamilos, 2019).

2.6. Produksi Enzim dengan Metode Fermentasi

Mikroorganisme yang dimanfaatkan dalam pengolahan pati perlu memiliki kemampuan menghasilkan enzim dalam jumlah besar untuk memenuhi kebutuhan industri (Far *et al.*, 2020). Pada jamur, enzim disekresikan secara ekstraseluler, sehingga proses pemisahannya menjadi lebih mudah dan menjadikan jamur sebagai sumber amilase yang lebih efisien secara ekonomi dibandingkan sumber lain. Namun, tingkat keberhasilan produksi enzim ini sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor, antara lain jenis strain mikroba, kebutuhan nutrisi, metode budidaya, keberadaan ion logam, laju pertumbuhan sel, ketahanan terhadap suhu tinggi (*thermostability*), durasi inkubasi, pH, serta suhu lingkungan (Bamigboye *et al.*, 2022).

Dalam produksi alfa-amilase skala industri, terdapat dua metode yang umum digunakan, yaitu fermentasi terendam (*Submerged Fermentation*/SmF) dan fermentasi padat (*Solid State Fermentation*/SSF) (Far *et al.*, 2020). SmF menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk memproduksi enzim komersial berbasis mikroba. Melalui metode ini, berbagai metabolit penting dari jamur telah berhasil dihasilkan. Keunggulan utama SMF dibandingkan SSF terletak pada kemampuannya mengendalikan parameter proses, seperti suhu, pH, dan kadar oksigen terlarut, secara lebih tepat dan konsisten (Bamigboye *et al.*, 2022).

2.7. Isolasi Enzim dengan Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan metode pemisahan dua jenis materi yang tidak saling bercampur, di mana gaya gravitasi digantikan oleh gaya sentripetal. Secara umum, teknik ini diaplikasikan dalam produksi metabolit sekunder (Dassey *and* Theegala, 2013). Teknik ini memiliki peran yang sangat penting dan luas digunakan dalam berbagai bidang penelitian, termasuk biokimia, biologi sel dan molekuler, kedokteran, serta farmasi. Berbagai prosedur ilmiah, seperti isolasi

organel seluler maupun subseluler, sel, dan molekul lainnya, mengandalkan penerapan metode ini (Olatunde *et al.*, 2022). Selama proses sentrifugasi, timbul gaya gravitasi tinggi dan tekanan geser yang berpotensi merusak struktur sel, sehingga enzim intraseluler dapat terlepas atau terekstraksi keluar (Yin *et al.*, 2020).

Ekstrak kasar enzim diperoleh dari media fermentasi dengan memisahkan komponen padat dan cair menggunakan sentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 hingga 20 menit (Yandri *et al.*, 2022). Miselia dipisahkan dari kultur terendam menggunakan kertas saring, dan filtrat yang diperoleh dimanfaatkan sebagai sumber amilase kasar. Selanjutnya, filtrat tersebut dianalisis untuk mengukur konsentrasi protein serta mengevaluasi aktivitas enzim amilase (Bamigboye *et al.*, 2022).

2.8. Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim dilakukan untuk memisahkan enzim target dari berbagai zat pengotor yang tidak diinginkan. Beberapa metode yang sering digunakan pada tahap ini antara lain fraksinasi dan dialisis.

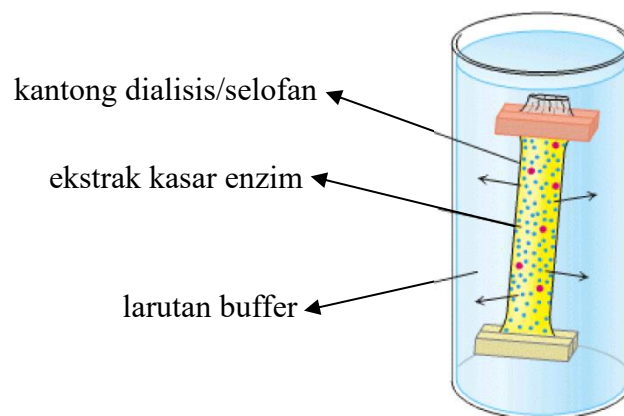
2.8.1. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses untuk memisahkan protein dari senyawa yang bukan protein berdasarkan kelarutannya (Holme *and* Peck, 1960). Amonium sulfat merupakan jenis garam yang paling umum digunakan dalam proses fraksinasi protein. Garam ini dipilih karena sebagian besar enzim memiliki ketahanan terhadapnya, kelarutannya tinggi dalam air, memiliki kemampuan pengendapan yang efektif, serta memberikan efek stabilisasi terhadap berbagai jenis enzim (Wirahadikusumah, 1989). Prinsip dasar pengendapan menggunakan amonium sulfat berkaitan dengan kelarutan protein, yang dipengaruhi oleh interaksi gugus polar protein dengan molekul air, interaksi ionik antara protein dan ion garam, serta gaya tolak-menolak antar protein bermuatan sejenis. Pada kondisi pH dan suhu tertentu, peningkatan konsentrasi garam hingga batas tertentu akan meningkatkan kelarutan protein (*salting in*). Sebaliknya, pada konsentrasi garam

yang lebih tinggi, kelarutan protein menurun (*salting out*) karena semakin banyak molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam, sehingga lapisan hidrasi yang menyelubungi protein berkurang. Kondisi ini menyebabkan protein saling berinteraksi, membentuk agregat, dan akhirnya mengendap (Scopes, 1993).

2.8.2. Dialisis

Enzim amilase kasar dapat dipisahkan dan dikonsentrasikan melalui presipitasi menggunakan amonium sulfat atau pelarut organik. Endapan yang diperoleh kemudian dapat didialisis dengan air atau buffer untuk mendapatkan konsentrasi yang lebih tinggi (Sundarram *and* Murthy, 2014). Dialisis digunakan untuk menghilangkan molekul kecil seperti garam atau larutan protein dari enzim yang didapatkan melalui tahapan pemurnian dengan garam amonium sulfat. Pemurnian enzim dengan metode dialisis dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Pemurnian enzim dengan metode dialisis (Berg *et al.*, 2007)

Prinsip dialisis adalah difusi zat terlarut melalui membran semipermeabel yang bertindak seperti saringan dengan ukuran pori tertentu. Molekul dengan jari-jari molekul yang lebih besar dari ukuran pori akan tertahan seluruhnya sedangkan yang berjari-jari lebih kecil akan lolos (Scopes, 1993). Pada penelitian Yandri *et al.* (2022), suspensi enzim dimasukkan ke dalam kantong dialisis berukuran 8000 Da, lalu direndam dalam larutan buffer fosfat (0,01 M; pH 6,5) pada suhu 4 °C selama semalaman. Kemurnian enzim α -amilase meningkat sepuluh kali lipat setelah dialisis. Hal ini didukung oleh penurunan total protein dan hasil (%) enzim yang menunjukkan bahwa enzim tersebut bebas dari pengotor.

2.9. Uji Aktivitas Enzim α -Amilase

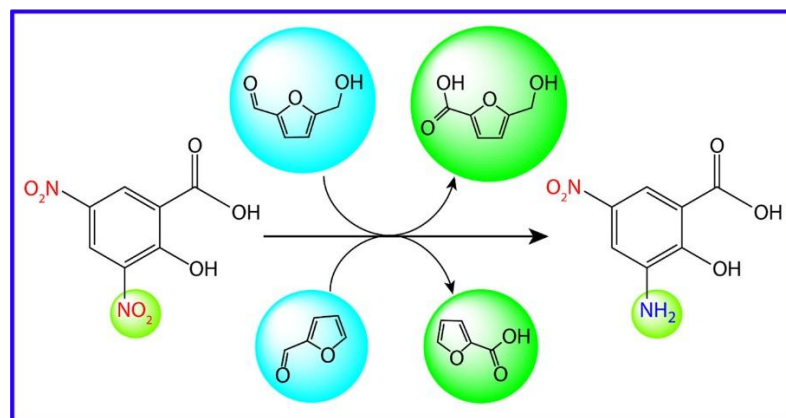
Uji aktivitas enzim α -amilase dilakukan dengan metode Fuwa dan Mandels yang masing-masing memiliki prinsip pengukuran spesifik terhadap aktivitas enzimatik. Selanjutnya, untuk mengetahui konsentrasi protein total yang terkandung dalam sampel, dilakukan pengujian menggunakan metode Lowry.

2.9.1. Metode Fuwa

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan metode Fuwa yaitu berdasarkan pengurangan jumlah substrat pati yang terhidrolisis dan menghasilkan warna biru setelah penambahan iodin. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ 600 nm. Uji Fuwa merupakan uji yang paling spesifik untuk mengidentifikasi aktivitas enzim amilase karena waktu reaksi yang cukup singkat yaitu 10 menit inkubasi dengan pati sebagai substrat (Fuwa, 1954).

2.9.2. Metode Mandels

Metode Mandels didasarkan pada pembentukan glukosa dari substrat pati oleh enzim amilase yang dideteksi dengan penambahan pereaksi *Dinitrosalisilic Acid* (DNS) ke dalam larutan uji serta proses pemanasan, sehingga akan dihasilkan larutan berwarna kuning hingga merah pekat. Semakin pekat warna larutan sampel dibandingkan larutan kontrol, maka semakin tinggi aktivitasnya (Mandels *et al.*, 1976). Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ 510 nm (Fessenden dan Fessenden, 1982). Reaksi antara reagen DNS dengan glukosa dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Reaksi antara DNS dengan glukosa (Deshavath *et al.*, 2020)

2.9.3. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Penentuan kadar protein menggunakan metode Lowry terjadi pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) yang akan membentuk kompleks dengan protein. Ion Cu^{2+} akan bereaksi dengan ikatan peptida pada protein dan membentuk senyawa kompleks. Senyawa kompleks Cu^{2+} yang terbentuk akan tereduksi menjadi Cu^+ pada kondisi alkalis. Kemudian Cu^+ akan terikat pada rantai samping triptofan, tirosin, atau sistein dari protein akan bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu. Secara perlahan reagen akan direduksi menjadi heteromolibdenum menghasilkan warna hijau kebiruan yang akan menyerap cahaya monokromatis pada λ 750 nm. Intensitas warna yang diperoleh tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya (Lowry, 1951).

2.10. Kinetika Reaksi Enzim

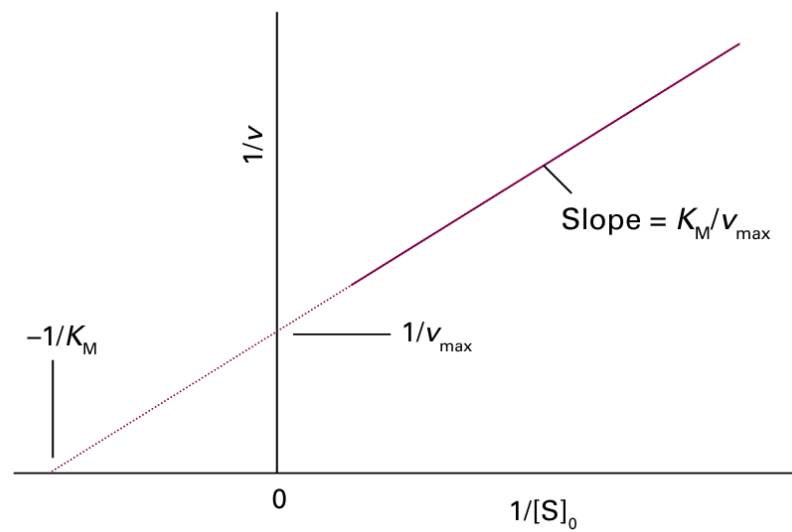
Parameter yang digunakan dalam kinetika reaksi enzim adalah konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}). Berdasarkan postulat Michaelis-Menten, suatu reaksi enzimatis terdiri dari beberapa fase yaitu pembentukan kompleks enzim substrat (ES), dengan E adalah enzim dan S adalah substrat, modifikasi dari substrat membentuk produk (P) yang masih berikatan dengan enzim (EP), dan pelepasan produk dari molekul enzim (Shahib, 2005). Semakin kecil harga K_M , maka interaksi antara enzim dan substrat semakin baik dan laju reaksi semakin cepat. Bila konsentrasi substrat cukup besar sehingga semua enzim terikat pada substrat dalam bentuk kompleks enzim-substrat, maka akan didapat laju reaksi maksimum, V_{maks} (Wirahadikusumah, 1989). Persamaan Michaelis-Menten dapat dilihat pada Persamaan 1.

$$v = \frac{k_b [E]_0}{1 + \frac{K_M}{[S]_0}} \quad (1)$$

Nilai K_M suatu enzim dapat dihitung dengan persamaan Lineweaver-Burk yang diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten yang kemudian dihasilkan suatu diagram Lineweaver-Burk yang ditunjukkan Gambar 7 (Page, 1997). Grafik Lineweaver-Burk merupakan hubungan antara $1/V$ dengan $1/[S]_0$. Berdasarkan

Persamaan 2, grafik ini membentuk garis lurus dengan kemiringan K_M/V_{maks} memotong sumbu-y di $1/V_{\text{maks}}$, dan memotong sumbu-x di $-1/K_M$ seperti pada Gambar 7. Persamaan Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\text{maks}}} + \left(\frac{K_M}{V_{\text{maks}}} \right) \cdot \frac{1}{[S]_0} \quad (2)$$



Gambar 7. Grafik Lineweaver-Burk (Atkins *et al.*, 2018)

Nilai K_M bisa ditentukan dari perbandingan kemiringan garis dengan titik potong sumbu-y, sedangkan nilai k_b diperoleh melalui titik potong sumbu-y menggunakan Persamaan 3.

$$V_{\text{maks}} = k_b [E]_0 \quad (3)$$

2.11. Kestabilan Enzim

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa), oleh pengaruh suhu dan kondisi-kondisi non fisiologis lainnya (Kazan *et al.*, 1997). Terdapat dua cara yang dapat digunakan untuk memperoleh enzim dengan stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan

mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami kurang atau tidak stabil. Peningkatan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan cara imobilisasi, liofilisasi dan zat aditif, modifikasi kimia, *protein engineering*, serta *medium engineering* (Bommarius and Paye, 2013; Polizzi *et al.*, 2007). Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi kestabilan enzim diantaranya :

2.11.1. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i)

Nilai k_i diperoleh dari kemiringan grafik yang mengikuti persamaan linear kinetika inaktivasi orde pertama seperti pada Persamaan 4.

$$\ln\left(\frac{E_i}{E_0}\right) = -k_i t \quad (4)$$

dengan E_i sebagai aktivitas awal enzim setelah mengalami inaktivasi akibat perlakuan pH (aktivitas sisa), E_0 sebagai aktivitas awal sebelum perlakuan pH, dan t menyatakan waktu dalam menit. Rendahnya nilai k_i menandakan bahwa proses inaktivasi enzim terjadi dengan kecepatan yang sangat kecil, sehingga enzim mampu mempertahankan struktur serta fungsinya dalam jangka waktu lebih lama meskipun berada pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan, yang berarti enzim tersebut memiliki kestabilan yang tinggi (Kazan *et al.*, 1997).

2.11.2. Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i)

Perubahan energi bebas akibat denaturasi (ΔG_i) ditentukan menggunakan persamaan termodinamika pada Persamaan 5.

$$\Delta G_i = -RT \ln\left(\frac{k_i \cdot h}{k_B \cdot T}\right) \quad (5)$$

Simbol k_i menyatakan konstanta laju inaktivasi, k_B merupakan konstanta Boltzmann, h adalah konstanta Planck, dan T menunjukkan suhu absolut. Nilai ΔG_i yang tinggi mengindikasikan bahwa enzim memerlukan energi yang lebih besar untuk mengalami proses denaturasi atau kehilangan aktivitasnya, sehingga menunjukkan bahwa enzim tersebut memiliki tingkat kestabilan yang lebih baik dan mampu mempertahankan struktur serta fungsinya meskipun berada pada kondisi yang dapat merusak, seperti perubahan pH atau suhu ekstrem (Kazan *et al.*, 1997).

2.11.3. Waktu Paruh ($t_{1/2}$)

Waktu paruh adalah lama waktu yang dibutuhkan hingga aktivitas enzim berkurang setengah dari kondisi awalnya. Nilai ini dihitung menggunakan Persamaan 6 :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} \quad (6)$$

dengan asumsi bahwa E_0 sama dengan dua kali E_i . Semakin tinggi nilai waktu paruh, semakin lama enzim mempertahankan aktivitasnya sebelum mengalami inaktivasi, yang berarti tingkat kestabilan enzim tersebut juga semakin besar (Kazan *et al.*, 1997; Yandri dan Suhartati, 2018).

2.11.4. Kestabilan Termal

Stabilitas termal suatu enzim dapat dievaluasi melalui pengukuran aktivitas enzim yang tersisa setelah mengalami paparan suhu tinggi selama periode waktu tertentu, yang selanjutnya dapat dihitung menggunakan Persamaan 7 berikut:

$$\text{Aktivitas sisa (\%)} = \frac{E_i}{E_0} \times 100 \% \quad (7)$$

Keterangan:

E_0 = aktivitas enzim yang tersisa pada waktu awal (t_0) atau sebelum mengalami proses inaktivasi;

E_i = aktivitas enzim yang tersisa setelah mengalami inaktivasi selama waktu t_i
(Yang *et al.*, 1996)

2.12. Imobilisasi Enzim

Enzim imobil merupakan enzim yang dipasang atau ditempatkan secara fisik pada suatu lokasi tertentu sehingga kemampuan katalitiknya tetap berfungsi dan memungkinkan enzim tersebut untuk digunakan berulang kali (Chibata, 1978). Enzim terimobilisasi memiliki kinerja lebih unggul dibandingkan enzim bebas, karena lebih stabil dan dapat terus menghasilkan gula yang dapat difermentasi dalam beberapa siklus pemakaian (Gali *et al.*, 2021). Dari berbagai metode yang

telah dikembangkan untuk imobilisasi protein, adsorpsi merupakan salah satu teknik yang paling signifikan dan banyak dimanfaatkan.

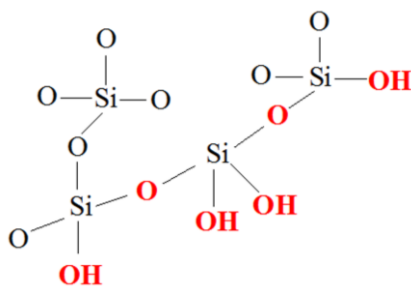
Proses adsorpsi memanfaatkan interaksi fisik antara enzim dan bahan penyangga (*carrier*), yang meliputi gaya Van der Waals, interaksi ionik, serta ikatan hidrogen. Ikatan ini bersifat relatif lemah, namun memiliki keuntungan karena umumnya tidak mengubah konformasi asli enzim. Dengan demikian, situs aktif enzim tetap terjaga sehingga aktivitas katalitiknya dapat dipertahankan (Hernandez *and* Fernandez-Lafuente, 2011; Hwang *and* Gu, 2013). Secara umum, *carrier* atau matriks untuk imobilisasi enzim melalui adsorpsi diklasifikasikan menjadi dua kelompok utama, yaitu matriks anorganik dan matriks organik. Matriks anorganik yang umum digunakan mencakup silika, titania, dan hidroksiapatit. Sementara itu, matriks organik dapat berasal dari sumber alami seperti kitin, kitosan, selulosa, dan alginat, maupun dari sumber sintesis seperti polimer. Keunggulan utama dari matriks ini adalah kemampuannya untuk dimodifikasi secara kimia guna menyesuaikan karakteristiknya dengan jenis enzim dan aplikasi yang diinginkan (Jesionowski *et al.*, 2014). Metode imobilisasi enzim secara fisik dan kimia ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Metode imobilisasi enzim secara fisik dan kimia (Dwevedi, 2016)

No	Metode Fisik	Metode Kimia
1.	Penjebakan : Pembentukan ikatan silang antara molekul enzim dengan matriks polimer (seperti poliakrilamida, alginat, dan sejenisnya) yang terdistribusi secara multidireksional.	Ikatan Kovalen : Enzim diimobilisasi pada matriks melalui pembentukan ikatan kovalen langsung dengan gugus fungsional reaktif yang terdapat pada matriks.
2.	Adsorpsi : Enzim berasosiasi dengan matriks pendukung melalui ikatan non-kovalen, yang dapat meliputi interaksi ionik, interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, serta gaya Van der Waals.	Ikatan Silang : Pembentukan ikatan kovalen antara enzim dengan matriks menggunakan pereaksi bifungsional maupun multi fungsional, seperti glutaraldehida, glioksal, diisosianat.
3.	Mikroenkapsulasi : Enzim diimobilisasi dengan cara menaunkannya pada membran semipermeabel	Ikatan Ion : Metode ini didasarkan pada interaksi ionik enzim dengan matriks, semakin tinggi kerapatan

2.13. Silika Gel

Matriks anorganik dianggap ideal untuk penggunaan di bidang industri karena memiliki sifat inert, harga yang ekonomis, tidak beracun, tidak larut dalam pelarut, memiliki kekuatan fisik yang baik, dapat digunakan kembali, stabil, mampu meningkatkan aktivitas dan spesifisitas enzim, serta efektif dalam mengurangi terjadinya inhibisi oleh produk (Ahmed *et al.*, 2018; Datta *et al.*, 2013; Ricardi *et al.*, 2018). Silika gel merupakan material silikon dioksida hasil sintesis dari natrium silikat yang memiliki struktur granular berpori dan luas permukaan tinggi. Bahan ini menunjukkan sifat mekanik yang kuat dan stabil, dengan ukuran pori rata-rata sekitar 2,4 nm. Dalam bentuk serbuk yang diperoleh melalui proses penghancuran, silika gel banyak dimanfaatkan sebagai katalis maupun sebagai pendukung katalis dalam berbagai proses reaksi kimia. Struktur silika gel ditandai oleh adanya gugus fungsional pada permukaannya, terutama gugus siloksan ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) dan silanol ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$), yang berperan penting dalam menentukan sifat kimia permukaan, daya adsorpsi, serta interaksi silika gel dengan berbagai senyawa (Banerjee *et al.*, 2001; Hamza *et al.*, 2017). Struktur silika gel ditampilkan pada Gambar 8.



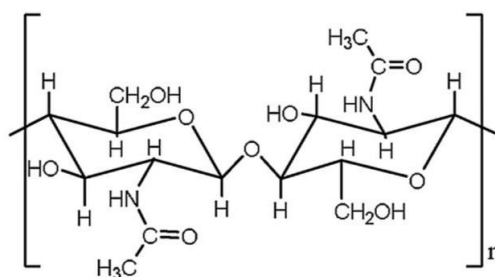
Gambar 8. Struktur kimia silika gel (Hamza *et al.*, 2017)

Silika gel 60 merupakan jenis silika gel yang banyak dimanfaatkan dalam teknik kromatografi, baik kromatografi lapis tipis maupun kolom. Silika gel 60 adalah bentuk silika amorf yang memiliki luas permukaan besar serta distribusi ukuran partikel yang relatif homogen. Angka 60 menunjukkan ukuran pori atau ukuran mesh partikelnya, yang umumnya dinyatakan dalam angstrom, atau pada beberapa kasus dalam satuan mikron. Silika gel 60 dapat digunakan untuk sintesis karbon mesopori dengan volume pori yang tinggi dan memiliki luas permukaan spesifik

(Galán *et al.*, 2013; Nahda *et al.*, 2025). Penelitian Nahda *et al.* (2025), sintesis karbon mesopori dengan silika gel 60 dapat meningkatkan keteraturan struktur karbon mesopori dan memperkuat pembentukan ikatan C=C. Wening dan Herdyastuti (2021) telah berhasil melakukan imobilisasi enzim papain menggunakan silika, yang ditunjukkan oleh peningkatan kestabilan dengan nilai pH papain bebas sebesar 5,0 dan setelah imobilisasi meningkat menjadi 6,0.

2.14. Kitin

Limbah pengolahan kerang dalam jumlah besar mengandung sekitar 20-40 % kitin, yang bisa diekstraksi baik melalui metode kimia konvensional maupun teknologi ekstraksi yang lebih ramah lingkungan. Kitin dan turunannya, yaitu kitosan, merupakan polisakarida alami yang memiliki sifat non-toksik, biokompatibel, dan mudah terurai secara hayati (Rai *et al.*, 2025). Struktur kitin dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Struktur kimia kitin (Mei *et al.*, 2018)

Kitin merupakan polimer yang terdiri dari lebih dari 20 unit N-asetilglukosamin yang saling terikat melalui ikatan β (1–4)-glikosidik, dan dapat ditemukan dalam beberapa bentuk struktural, yaitu α -, β -, dan γ -kitin (Soetemans *et al.*, 2020). Kitin telah diidentifikasi sebagai carrier organik yang efektif untuk imobilisasi enzim, yang mampu secara signifikan meningkatkan kinerja, efisiensi, dan stabilitas enzim yang diimobilisasi. Peningkatan ini memungkinkan pemakaian berulang enzim secara optimal, sehingga meningkatkan efisiensi biaya ketika diterapkan pada proses industri skala besar (Bhushani and Anandharamakrishnan, 2014).

Penelitian Yandri *et al.* (2023), menunjukkan bahwa kitin efektif sebagai matriks untuk imobilisasi α -amilase *A. fumigatus*, serta dapat meningkatkan stabilitas termal dan kinerja enzim. Enzim yang diimobilisasi mampu mempertahankan lebih dari 39 % aktivitas relatif setelah 80 menit pada suhu 60 °C, stabilitasnya meningkat hingga 1,5 kali dibanding enzim asli, dan dapat digunakan ulang sebanyak enam kali dengan mempertahankan lebih dari 46 % aktivitas awal, menunjukkan potensi kitin untuk aplikasi industri.

2.15. Material Hibrida

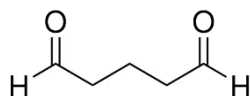
Material hibrida adalah material baru yang dibentuk dari gabungan senyawa organik dan anorganik. Material hibrida organik–anorganik dirancang untuk menggabungkan sifat khas masing-masing, misalnya kekuatan dan ketahanan panas dari material anorganik dapat dipadukan dengan sifat ringan dan lentur dari polimer organik. Pada material ini, bagian organik menempel pada struktur anorganik hanya melalui interaksi lemah, seperti gaya Van der Waals, ikatan hidrogen, atau gaya elektrostatik (Barrino, 2024; Gomez-Romero *et al.*, 2024).

Berdasarkan sifat interaksinya, material hibrida dibagi menjadi dua kelas. Pada Kelas I, senyawa organik dan anorganik tersusun dalam satu sistem, namun keterikatan keduanya hanya diperoleh melalui ikatan-ikatan lemah. Ikatan yang dimaksud dapat berupa ikatan hidrogen, gaya Van der Waals, ataupun ikatan ionik sederhana. Ikatan lemah inilah yang memberikan kohesi dan menjaga struktur keseluruhan, sehingga stabilitas material Kelas I sangat bergantung pada interaksi non-kovalen tersebut. Sebaliknya, pada Kelas II, komponen organik dan anorganik dihubungkan secara langsung melalui ikatan kimia yang kuat, baik berupa ikatan kovalen maupun ikatan iono-kovalen. Ikatan ini menjadikan struktur lebih kokoh, permanen, dan umumnya menghasilkan material dengan sifat mekanik maupun kimia yang lebih baik dibandingkan Kelas I. Dalam banyak material hibrida Kelas II, selain ikatan kuat juga terdapat ikatan lemah seperti pada Kelas I, sehingga keduanya berperan bersama menentukan stabilitas dan sifat akhir material (Judeinstein and Sanchez, 1996).

Pada penelitian Zdarta *et al.* (2017), material hibrida TiO₂–lignin disintesis dengan rasio massa 1:1 karena memberikan keseimbangan optimal antara kestabilan struktural dengan kemampuan pengikatan dan terbukti efektif sebagai penyangga untuk imobilisasi enzim selulase. Analisis FTIR menunjukkan adanya berbagai sinyal khas yang berasal dari gugus fungsional kedua prekursor yang telah dimodifikasi, sehingga menegaskan keberhasilan pembentukan material hibrida tersebut serta menunjukkan peningkatan potensi interaksi dan pengikatan enzim pada permukaannya (Zdarta *et al.*, 2017).

2.16. Glutaraldehida

Glutaraldehida adalah senyawa organik dengan rumus kimia (CH₂)₃(CHO)₂ yang terdiri dari rantai karbon lima yang berakhir ganda dengan gugus aldehida (CHO). Gambar 10 menunjukkan struktur kimia dari glutaraldehida.



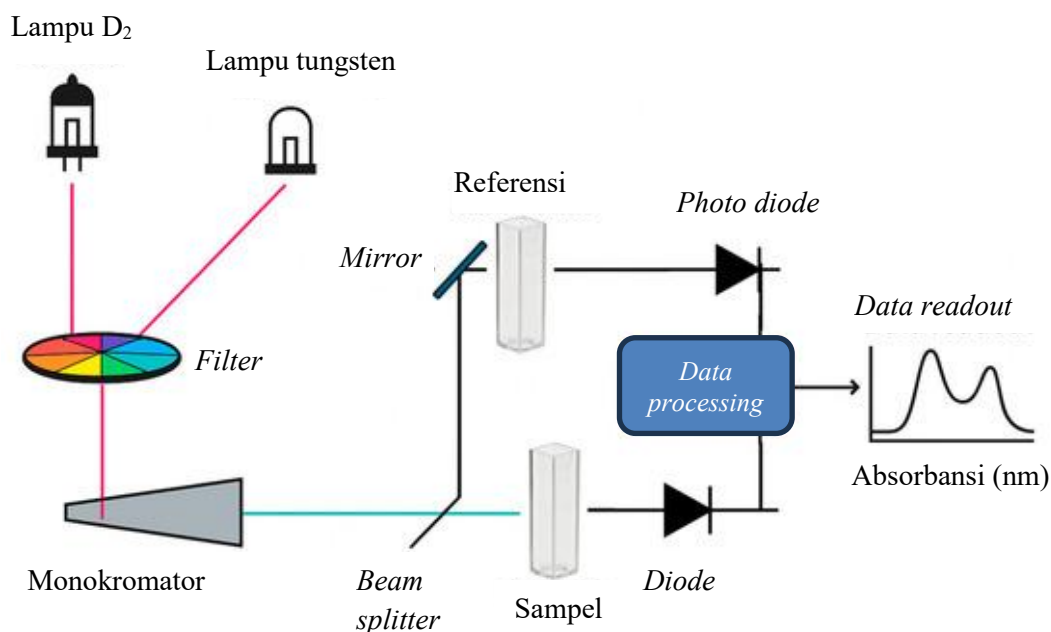
Gambar 10. Struktur senyawa glutaraldehida

Penautan silang (*cross-linking*) dengan reagen bifungsional, seperti glutaraldehida, mampu meningkatkan stabilitas enzim, meskipun jika tidak terkontrol dapat menyebabkan penurunan aktivitas (Tadesse *and* Liu, 2025). Proses *cross-linked* menghasilkan matriks stabil dan tidak larut, sehingga enzim terimobilisasi dengan baik namun tetap memungkinkan difusi substrat. Dibandingkan polimer linear, polimer terikat silang lebih kaku, tahan mekanik, dan stabil secara termal (Chen *et al.*, 2023).

2.17. Spektrofotometri UV-Vis

Spektroskopi UV-Vis merupakan metode analisis yang menggunakan radiasi ultraviolet dan cahaya tampak untuk mengukur penyerapan senyawa kimia. Prinsip kerjanya didasarkan pada transisi elektron dari keadaan dasar ke tingkat

energi lebih tinggi akibat penyerapan foton, sehingga menghasilkan spektrum khas yang merepresentasikan karakteristik elektronik suatu senyawa. Cahaya ultraviolet (UV) memiliki panjang gelombang 100–400 nm, sedangkan cahaya tampak (Vis) berada pada rentang 400–750 nm dengan gradasi warna dari tidak berwarna hingga ungu-merah (More *et al.*, 2025; Suhartati, 2017). Skema alat spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 11.



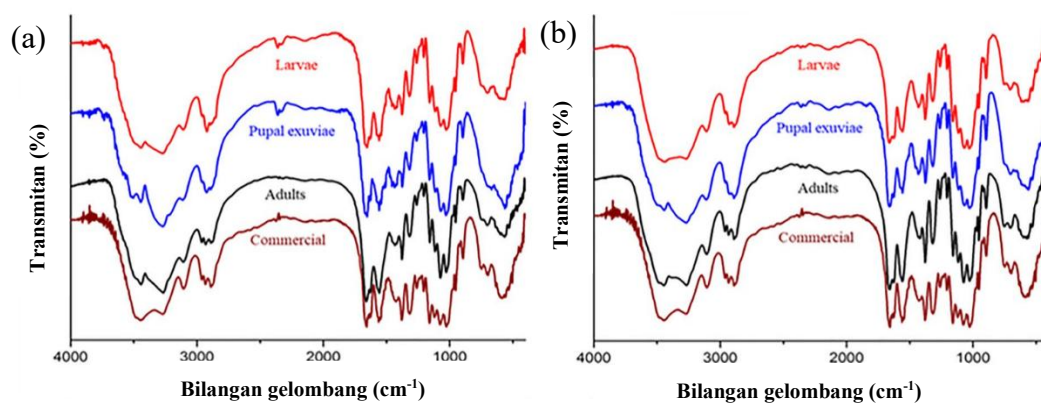
Gambar 11. Skema alat spektrofotometer UV-Vis (Suhartati, 2017)

Spektrofotometer UV-Vis terdiri atas dua jenis, yaitu *single beam* dan *double beam*. Instrumen *single beam* digunakan untuk analisis kuantitatif dengan cara mengukur absorbansi pada satu panjang gelombang tertentu. Sementara itu, instrumen *double beam* memiliki dua berkas cahaya yang dibentuk oleh cermin berbentuk V (*beam splitter*), di mana satu berkas melewati larutan blanko dan berkas lainnya secara bersamaan melewati larutan sampel (Skoog *et al.*, 1996).

2.18. Spektrofotometri IR

Fourier Transform Infrared (FTIR) adalah metode utama dalam spektroskopi inframerah (IR). Pada teknik ini, sinar inframerah dilewatkan melalui suatu sampel. Sebagian energi inframerah akan diserap oleh sampel, sementara sebagian

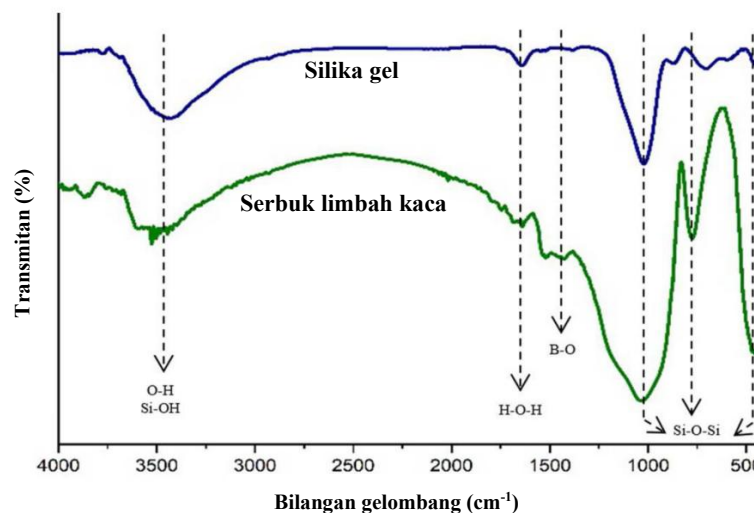
lainnya diteruskan. Hasil pengukuran berupa spektrum yang menunjukkan pola serapan dan transmisi molekul, yang berfungsi layaknya sidik jari molekul dari sampel tersebut. Spektrum FTIR menampilkan puncak serapan pada frekuensi tertentu yang berkaitan dengan getaran ikatan antar atom dalam suatu senyawa. Spektrum inframerah (IR) secara umum diklasifikasikan ke dalam tiga wilayah utama, yaitu daerah inframerah dekat (*near-IR*, 14.000–4000 cm^{-1}), inframerah tengah (*mid-IR*, 4000–400 cm^{-1}), dan inframerah jauh (*far-IR*, 400–10 cm^{-1}). Foton pada daerah inframerah memiliki energi yang memadai untuk menginduksi vibrasi pada gugus atom terhadap ikatan kimia yang menghubungkannya (Dutta, 2017). Spektrum FTIR kitin yang tidak *dibleaching* dan hasil *bleaching* ditampilkan pada Gambar 12.



Gambar 12. Spektrum FTIR (a) kitin tidak di-*bleaching* (b) kitin hasil *bleaching* (Triunfo *et al.*, 2022)

Spektrum FTIR dari kitin yang tidak *dibleaching* dan *dibleaching*, yang diperoleh dari larva, *eksuvia pupa*, dan *imago* mati *H. illucens*, ditampilkan pada Gambar 12. Analisis FTIR memperlihatkan bahwa seluruh sampel kitin dari *H. illucens* menampilkan pita serapan khas yang sesuai dengan spektrum kitin komersial asal krustasea. Pita utama amida muncul pada 1310–1320 cm^{-1} (regangan CN, amida III), 1550–1560 cm^{-1} (tekukan NH, amida II), dan 1650–1655 cm^{-1} (regangan CO, amida I). Pemisahan pita amida I pada sekitar 1620 dan 1650 cm^{-1} mengindikasikan bahwa kitin yang dihasilkan berada dalam bentuk α . Selain itu, pita lain yang teridentifikasi mencakup regangan NH simetris pada 3100–3110 cm^{-1} , regangan NH asimetris pada 3255–3270 cm^{-1} , serta regangan OH pada

3430–3450 cm^{-1} yang mencerminkan keberadaan gugus hidroksi dan ikatan hidrogen pada struktur polimer (Triunfo *et al.*, 2022). Spektrum FTIR serbuk limbah kaca dan silika gel dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Spektrum FTIR serbuk limbah kaca dan silika gel (Ni'mah *et al.*, 2022b)

Spektrum FTIR pada Gambar 13 menunjukkan bahwa baik serbuk limbah kaca maupun silika gel hasil sintesis menampilkan pita khas silika, yaitu serapan cincin siloksana (457–517 cm^{-1}), regangan simetris Si–O–Si (702–775 cm^{-1}), serta regangan asimetris Si–O–Si (1022–1032 cm^{-1}). Pada limbah kaca botol tidak terdeteksi pita 663 dan 959 cm^{-1} , yang merupakan ciri khas Si–O–Si dan Si–OH. Intensitas pita asam silikat lebih tinggi pada silika gel sintesis, menandakan kandungan silikat yang lebih besar sekaligus berkurangnya pengotor setelah proses sintesis. Selain itu, pita pada 1641–1661 cm^{-1} menunjukkan tekukan H–O–H, sedangkan pita melebar di 3426–3526 cm^{-1} berkaitan dengan air teradsorpsi. Pola ini konsisten dengan laporan penelitian sebelumnya (Ni'mah *et al.*, 2022b).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan sejak bulan Maret - Desember 2025, bertempat di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Analisis spektrofotometri UV-*Vis* dilakukan di Laboratorium Biokimia, FMIPA Universitas Lampung. Analisis spektroskopi FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik, Institut Teknologi Bandung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: spektrofotometer UV-*Vis* (Shimadzu 1780), spektrofotometer FTIR (Shimadzu IRSpirit), neraca analitik (Optica Analytica Balance 220), inkubator (Presistern P'selecta), *autoclave* (Gea LS-35L EDAM 63), *centrifuge* (Hermle Z207A dan Refrigerated Centrifuge Z327K), tabung sentrifuga (15 dan 50 mL), mikropipet 200-1.000 μ L (Eppendorf) dan tip mikropipet, *Laminar Air Flow/LAF* (Airtech HVS-1300), *waterbath* (Memmert W 350), *shaker incubator* (Labtech LSI EDAM 97), pengaduk magnetik pelat panas (CB162 Stuart) dan *stir bar, vortex* (PV-1 Grant-bio), oven (ARGO LAB TCN 115), pH meter (Basic Benchtop XS), jarum ose (lurus), pembakar spiritus, *freezer* (Labfreez Ultraflow), lemari es, botol semprot, spatula dan sendok *stainless steel*, kaca arloji, termometer, batang pengaduk, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi *stainless steel*, penjepit tabung reaksi, labu Erlenmeyer (50-1.000 mL), gelas kimia (200-2.000 mL), gelas ukur (10-500 mL),

labu ukur (25-1.000 mL), corong gelas, mortar dan alu, desikator, botol kaca gelap, botol film 30 mL, botol plastik (100-1.000 mL), dan wadah plastik.

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat jamur lokal *Aspergillus* sp. dari Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Universitas Lampung.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini, antara lain: silika gel 60 (Merck), kitin (Sigma-Aldrich), glutaraldehida 25 % (Sigma-Aldrich), pati kentang/*starch soluble ex potato extra pure* (Loba Chemie), pati singkong (Pak Tani), *Potato Dextrose Agar/PDA* (Himedia), KH_2PO_4 (Merck), MgSO_4 (Merck), CaCl_2 (Merck), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), CoCl_2 (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), pepton (Himedia), NaH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), KI (Merck), I_2 (Merck), HCl pekat (Merck), NaOH (Merck), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), Na/K-*tartrate* tetrahidrat (Merck), urea (Merck), *Folin Ciocalteu's phenol* (Merck), *Bovine Serum Albumin/BSA*, D-glukosa anhidrat (Merck), asam 2-hidroksi-3,5-dinitrosalisilat/DNS (Sigma-Aldrich), fenol (Merck), Na_2SO_3 (Merck), Na_2CO_3 (Merck), NaCl (Merck), asam asetat glasial (Merck), natrium asetat (Merck), akuades, kantong selofan, kertas saring, kapas, kasa, alkohol 70 %, spiritus, pemantik api, aluminium *foil*, kertas, tisu, karet, plastik *wrap*, dan es batu.

3.3. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dibagi ke dalam beberapa tahapan yang dilaksanakan secara teliti dan hati-hati, dengan tetap mengutamakan aspek keselamatan kerja.

3.3.1. Pembuatan Media Agar Miring

Sebanyak 3,9 gram PDA dan 0,1 gram pati singkong dilarutkan dalam 100 mL akuades, lalu dipanaskan sambil diaduk sesekali hingga larut sempurna. Media segera dituang 5 mL ke beberapa tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup sumbat kapas, aluminium *foil*, dan kertas. Selanjutnya, media disterilisasi pada suhu 121 °C tekanan 1 atm, selama 15 menit dalam *autoclave*. Kemudian, tabung reaksi

diletakkan pada bidang miring selama 24 jam pada kondisi aseptis sampai agar mengeras (Nwagu *and* Okolo, 2011).

3.3.2. Pembiakan Isolat Baru *Aspergillus* sp.

Pembiakan dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang telah disterilisasi oleh sinar UV. Setelah agar miring mengeras dan dipastikan bebas kontaminan, isolat *Aspergillus* sp. diambil satu tarikan ose, lalu ditusukkan ke dalam media agar miring. Isolat baru *Aspergillus* sp. kemudian dibiakkan dalam inkubator 5 hari. Isolat *Aspergillus* sp. tampak berwarna hitam (Ratnasri *et al.*, 2014).

3.3.3. Preparasi Produksi Enzim α -Amilase dari *Aspergillus* sp.

Langkah dalam melakukan preparasi produksi enzim terdiri dari:

3.3.3.1. Pembuatan larutan buffer fosfat

- 1) Larutan NaH_2PO_4 ($M_r = 120 \text{ g/mol}$) 0,05 M sebanyak 1.000 mL (Stok A)

Larutan dibuat dengan Persamaan 8 sebagai berikut:

$$M = \frac{\text{massa (g)}}{M_r \text{ (g/mol)}} \times \frac{1.000}{V_{\text{pelarut}} \text{ (mL)}} \quad (8)$$

$$0,05 = \frac{\text{massa (g)}}{120} \times \frac{1.000}{1.000}$$

Massa = 6 gram

Untuk membuat 1000 mL larutan NaH_2PO_4 0,05 M diperlukan 6,0 g NaH_2PO_4 yang dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 1000 mL hingga batas meniskus, lalu dihomogenkan.

- 2) Larutan Na_2HPO_4 ($M_r = 142 \text{ g/mol}$) 0,05 M sebanyak 500 mL (Stok B)

Larutan dibuat dengan Persamaan 8. Untuk membuat 500 mL larutan Na_2HPO_4 0,05 M diperlukan 3,57 g Na_2HPO_4 yang dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 500 mL hingga batas meniskus, lalu dihomogenkan.

- 3) Larutan buffer fosfat 0,05 M sebanyak 250 mL pH 6,5 (Tiarsa *et al.*, 2022)

Larutan NaH_2PO_4 (Stok A) dicampurkan dengan larutan Na_2HPO_4 (Stok B) dengan komposisi tertentu untuk mendapatkan pH 6,5 (Bollag *et al.*, 1996).

Volume Stok A dan Stok B yang dibutuhkan untuk mendapatkan larutan buffer fosfat sebanyak 250 mL.

$$[H^+] = K_a (NaH_2PO_4) \left(\frac{V_{(NaH_2PO_4)}}{V_{(Na_2HPO_4)}} \right) \quad (9)$$

dengan keterangan: $V_{(Na_2HPO_4)} = V_{total} - V_{(NaH_2PO_4)}$

$$[H^+] = K_a (NaH_2PO_4) \left(\frac{V_{(NaH_2PO_4)}}{V_{total} - V_{(NaH_2PO_4)}} \right)$$

$$10^{-6,5} = 6,3 \times 10^{-8} \left(\frac{V_{(NaH_2PO_4)}}{250 - V_{(NaH_2PO_4)}} \right)$$

$$V_{(NaH_2PO_4)} = 208,47 \text{ mL}$$

$$V_{(Na_2HPO_4)} = 41,53 \text{ mL}$$

Pembuatan buffer pH 6,5 dengan persamaan di atas perlu diverifikasi akurasi menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi (Bollag *et al.*, 1996).

3.3.3.2. Pembuatan media inokulum dan fermentasi

Media inokulum berfungsi sebagai tahap adaptasi awal untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan jamur pada medium cair tanpa menghasilkan enzim α -amilase. Sebaliknya, media fermentasi digunakan sebagai medium pertumbuhan sekaligus produksi enzim amilase. Pembuatan media inokulum dilakukan dengan menimbang bahan-bahan, yaitu 3,5 gram $(NH_4)_2SO_4$, 5 gram KH_2PO_4 , 0,75 gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0125 gram $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0035 gram $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,75 gram urea, 0,005 gram $CoCl_2$, 0,75 gram $CaCl_2$, 1,875 gram pati, dan 1,875 gram pepton. Selanjutnya, seluruh bahan dilarutkan dalam 250 mL buffer fosfat pH 6,0 menggunakan labu Erlenmeyer berkapasitas 500 mL, kemudian disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit (Yandri *et al.*, 2022).

3.3.4. Inokulasi *Aspergillus* sp.

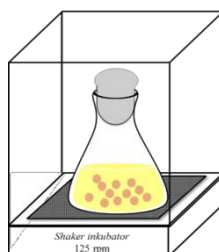
Sebanyak tiga ose *Aspergillus* sp. dipindahkan secara aseptik dari media agar miring ke dalam media inokulum cair untuk proses peremajaan kultur.

Selanjutnya, kultur tersebut diinkubasi dalam *shaker incubator* pada kecepatan

120 rpm selama 24 jam guna memastikan pertumbuhan awal yang optimal serta homogenitas sel dalam suspensi.

3.3.5. Produksi Enzim α -Amilase dari *Aspergillus* sp.

Produksi enzim dilakukan dengan memindahkan inokulum secara aseptis di dalam LAF ke dalam masing-masing media fermentasi sebanyak 2 % dari total volume media. Selanjutnya, media fermentasi diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 72 jam. Proses fermentasi menggunakan metode *Submerged Fermentation* (SmF) digambarkan pada Gambar 14.



Gambar 14. Ilustrasi fermentasi metode *Submerged Fermentation* (SmF)

3.3.6. Isolasi Enzim α -Amilase dari *Aspergillus* sp.

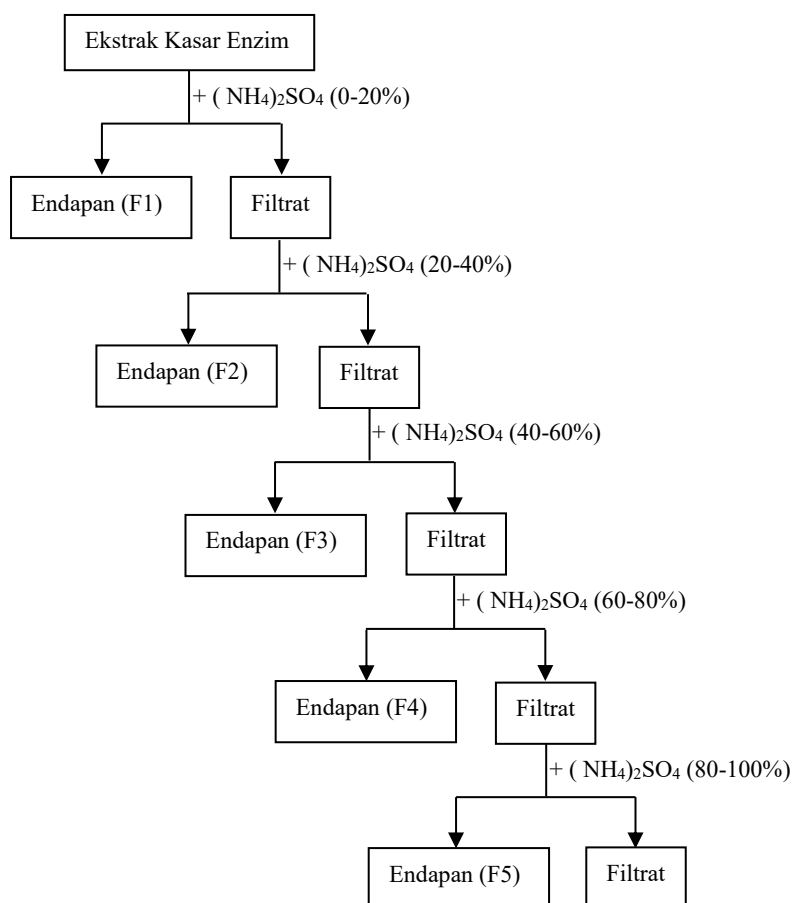
Isolasi enzim α -amilase dilakukan melalui metode sentrifugasi, yang bekerja berdasarkan prinsip pemisahan partikel sesuai kecepatan sedimentasinya akibat proses pemisahan dengan gaya sentrifugal. Proses sentrifugasi dijalankan pada suhu rendah untuk mencegah penurunan aktivitas enzim (Suhartono, 1989). Sampel dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga, kemudian dipisahkan antara filtrat dan endapan dengan sentrifuga pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu dingin (2–4 °C), lalu filtrat disaring menggunakan kertas saring dan ditampung dalam botol sampel. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim, yang selanjutnya diuji aktivitasnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Fuwa serta dianalisis kadar proteinnya menggunakan Metode Lowry.

3.3.7. Pemurnian Enzim α -Amilase

Enzim hasil isolasi kemudian dimurnikan melalui fraksinasi dengan penambahan garam amonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, yang berfungsi mengendapkan enzim dari campuran protein lain. Selanjutnya, enzim tersebut diproses dengan dialisis untuk menghilangkan sisa garam dan molekul kecil sehingga diperoleh enzim yang lebih murni.

3.3.7.1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Ekstrak kasar enzim hasil isolasi dimurnikan melalui fraksinasi dengan garam amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0–20, 20–40, 40–60, 60–80, dan 80–100 % untuk mengetahui pada fraksi mana enzim α -amilase mengendap. Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Skema fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat

Konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ umumnya dinyatakan dalam satuan persen kejenuhan (%). Persamaan sederhana untuk menghitung massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang dibutuhkan untuk pembuatan 1 L larutan X% dari larutan awal $X_0\%$ ditunjukkan dengan Persamaan 10 sebagai berikut:

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ (gram)} = \frac{515 (X - X_0)}{100 - 0,27X} \quad (10)$$

Misalnya, untuk fraksi (0-20)%, maka $X_0 = 0\%$ dan $X = 20\%$ (Bollag *et al.*, 1996; Scopes, 1993).

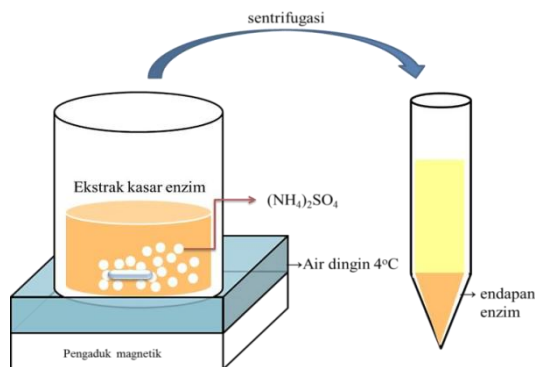
Penambahan amonium sulfat pada ekstrak kasar enzim dilakukan secara bertahap sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Endapan protein enzim yang terbentuk pada setiap tingkat kejenuhan amonium sulfat kemudian dipisahkan dari filtrat melalui proses sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Endapan yang diperoleh selanjutnya dilarutkan dalam buffer fosfat 0,025 M (pH 6,0), lalu dilakukan pengujian aktivitas menggunakan metode Fuwa serta analisis kadar protein dengan metode Lowry. Filtrat dari fraksi kejenuhan 0-20% kemudian diproses kembali dengan penambahan amonium sulfat hingga mencapai kejenuhan 20-40%, dan prosedur yang sama dilanjutkan secara bertahap sampai diperoleh fraksi kejenuhan 80-100%. Filtrat pada setiap tingkat kejenuhan akan mengalami penambahan volume dari garam yang terlarut sebelumnya, sehingga perlu dihitung kembali massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang diperlukan untuk mengendapkan enzim, melalui Persamaan 11.

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ (gram)} = \frac{\text{Volume filtrat (mL)}}{1000 \text{ mL}} \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ (g)} \quad (11)$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ (gram)} = \frac{100 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 121 \text{ g}$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ (gram)} = 12,1 \text{ g}$$

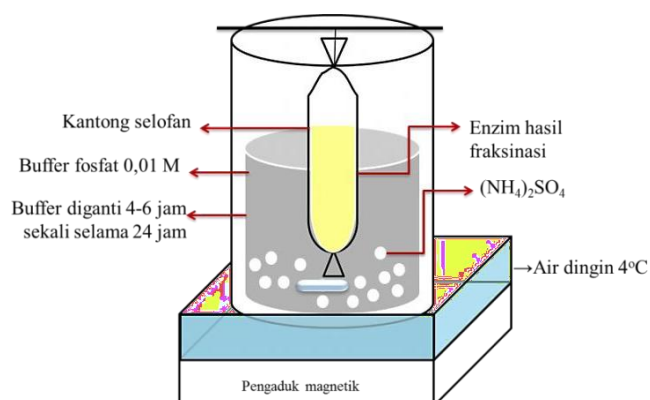
Bollag *et al.* (1996) menyajikan ringkasan hasil perhitungan mengenai jumlah massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g) yang perlu ditambahkan ke dalam 1 L larutan pada suhu 0 °C, sebagaimana ditampilkan pada Tabel 3. Ilustrasi metode fraksinasi amonium sulfat dapat ditampilkan pada Gambar 16.



Gambar 16. Ilustrasi metode fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat

3.3.7.2. Dialisis

Enzim hasil fraksinasi ditempatkan ke dalam kantong selofan kemudian didialisis selama 24 jam menggunakan buffer fosfat 0,01 M dengan pH 6,0. Selama dialisis, buffer diganti setiap 4–6 jam untuk menurunkan konsentrasi ion-ion yang terdapat di dalam selofan. Selama dialisis, enzim dijaga pada suhu rendah untuk mencegah denaturasi, sementara larutan diaduk dengan kecepatan konstan. Selofan sebaiknya tidak menyentuh dasar gelas agar tidak terganggu oleh batang pengaduk magnetik. Untuk memastikan tidak ada ion garam tersisa, dilakukan uji dengan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 di luar selofan. Terbentuknya endapan putih BaSO_4 menandakan sulfat telah tereliminasi. Setelah dialisis, aktivitas enzim diuji dengan metode Fuwa, sedangkan kadar protein ditentukan dengan metode Lowry. Ilustrasi metode dialisis dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Ilustrasi metode dialisis

Tabel 3. Rangkuman hasil perhitungan massa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (gram) yang ditambahkan untuk fraksinasi dengan berbagai persentase kejenuhan pada suhu 0 °C

		Konsentrasi Akhir Amonium Sulfat																			
Konsentrasi Awal Amonium Sulfat	%	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	0	27	56	84	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
	5		27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
	10			28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
	15				28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
	20					29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
	25						29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
	30							30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
	35								30	61	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
	40									31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
	45										31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
	50											32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
	55												33	66	101	138	175	215	256	298	343
	60													33	67	103	140	179	219	261	305
	65														34	69	105	143	183	224	266
	70															34	70	107	146	186	228
	75																35	72	110	149	190
	80																	36	73	112	152
	85																		37	75	114
	90																			37	76
	95																				38

Sumber: (Bollag *et al.*, 1996)

3.3.8. Penentuan Aktivitas Unit dengan Metode Fuwa

Prosedur penentuan aktivitas enzim dalam satuan unit berdasarkan metode Fuwa (1954) dilakukan melalui tahapan sebagai berikut:

3.3.8.1. Pembuatan reagen Fuwa

1) Pereaksi Iodin

Sebanyak 2,0 gram KI dimasukkan ke dalam labu ukur berkapasitas 100 mL, kemudian dilarutkan dengan sejumlah kecil akuades. Setelah itu, ke dalam larutan KI ditambahkan 0,2 gram I₂. Selanjutnya, akuades ditambahkan hingga mencapai tanda batas pada labu ukur. Larutan dikocok hingga homogen sampai I₂ terlarut sempurna, yang ditandai dengan terbentuknya larutan berwarna jingga kemerahan.

2) Larutan substrat pati 0,1 %

Sebanyak 0,05 gram pati terlarut (*soluble starch*) dimasukkan ke dalam 50 mL akuades, kemudian dipanaskan sambil diaduk secara berkala hingga diperoleh larutan homogen.

3) Larutan HCl 1 N

Larutan HCl pekat 12 N diencerkan hingga diperoleh larutan HCl 1 N dengan volume akhir 100 mL. Proses pengenceran dilakukan di dalam lemari asam dengan menggunakan Persamaan 12 sebagai acuan.

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2 \quad (12)$$

$$12 \times V_1 = 1 \times 100$$

$$V_1 = 8,33 \text{ mL}$$

Pembuatan larutan HCl 1 N sebanyak 100 mL dilakukan dengan cara mengencerkan 8,33 mL larutan HCl 12 N menggunakan akuades hingga mencapai tanda batas pada labu ukur 100 mL, kemudian larutan dihomogenkan secara merata.

3.3.8.2. Uji aktivitas metode Fuwa

Tabung sampel dan tabung kontrol terlebih dahulu dipersiapkan. Pada tabung sampel, ditambahkan 0,25 mL larutan enzim ke dalam 0,25 mL larutan pati 0,1%. Sementara itu, pada tabung kontrol, 0,25 mL larutan enzim dicampurkan

dengan 0,25 mL HCl 1 N. Kedua tabung tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit. Setelah proses inkubasi, ke dalam tabung sampel ditambahkan 0,25 mL HCl 1 N, sedangkan pada tabung kontrol ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1%. Selanjutnya, masing-masing tabung diberi tambahan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4,0 mL akuades, kemudian dihomogenkan.

Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) yang telah ditentukan sebelumnya, yaitu sekitar 600 nm (Fuwa, 1954). Persamaan dasar perhitungan aktivitas enzim ditunjukkan pada Persamaan 13.

$$AU = \frac{A_{kontrol} - A_{sampel}}{A_{kontrol}} \times \frac{1}{V_{enzim}} \times FP \quad (13)$$

Keterangan:

$A_{kontrol}$ = absorbansi kontrol

A_{sampel} = absorbansi sampel

FP = faktor pengenceran enzim

V = volume enzim = 0,25 mL

3.3.9. Penentuan Aktivitas Unit dengan Metode Mandels

Langkah-langkah yang dilakukan pada penentuan aktivitas unit dengan metode Mandels adalah sebagai berikut:

3.3.9.1. Pembuatan reagen Mandels

1) Pereaksi DNS sebanyak 100 mL dibuat dengan tahapan sebagai berikut:

- DNS sebanyak 1 g dilarutkan dengan 20 mL akuades.
- NaOH sebanyak 1 g dan Fenol sebanyak 0,2 g dilarutkan dengan 20 mL akuades.
- Na₂SO₃ sebanyak 0,05 g dilarutkan dengan 10 mL akuades.
- Na/K – *tartrate* sebanyak 0,4 g dilarutkan dengan 10 mL akuades.
- Seluruh zat di atas dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan akuades hingga batas meniskus.

2) Larutan substrat pati 0,1 %

Sebanyak 0,05 g pati larut (*soluble starch*) ditambahkan ke dalam 50 mL akuades, kemudian dipanaskan sambil diaduk secara berkala hingga larut sempurna. Pada tahap karakterisasi enzim terimobilisasi, substrat dilarutkan dalam buffer fosfat atau asetat 0,1 M dengan pH sesuai kondisi pengikatan masing-masing matriks. Konsentrasi substrat pati yang digunakan ditetapkan berdasarkan nilai K_M masing-masing sistem sebagai konsentrasi optimum.

3) Larutan deret standar glukosa

- Larutan stok 1 mg/mL

Glukosa sebanyak 0,10 g dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu dilarutkan dengan akuades hingga batas meniskus dan dihomogenkan.

- Larutan deret standar glukosa (0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50 mg/mL)

3.3.9.2. Pembuatan kurva standar glukosa

Blanko yang digunakan terdiri atas campuran pereaksi DNS dan akuades dengan perbandingan 1:2 (v/v). Blanko tersebut diaplikasikan pada setiap uji Mandels sebagai acuan. Larutan standar glukosa dengan konsentrasi bertingkat dimasukkan ke dalam kuvet sampel secara berurutan, kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) yang telah ditentukan sebelumnya, yaitu sekitar 510 nm (Mandels *et al.*, 1976). Hubungan antara absorbansi dan konsentrasi glukosa selanjutnya diplot dalam bentuk grafik linier. Nilai *intercept* dan *slope* dari kurva standar glukosa tersebut digunakan sebagai dasar untuk menghitung konsentrasi glukosa pada sampel uji.

3.3.9.3. Uji aktivitas metode Mandels

Uji aktivitas dimulai dengan persiapan tabung untuk sampel dan kontrol. Pada tabung sampel, sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1 %. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 60 °C selama 30 menit. Pada tabung kontrol, pati ditambahkan setelah inkubasi. Kemudian, kedua tabung sama-sama ditambahkan 1 mL pereaksi DNS, lalu dididihkan selama 10 menit. Selanjutnya, sampel

didinginkan pada suhu ruang, lalu ditambahkan 1,5 mL akuades. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-*Vis* pada λ_{maks} 510 nm. Kadar glukosa sampel ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa. Sesuai prinsip terbentuknya produk dari metode Mandels, maka seharusnya $A_{\text{kontrol}} < A_{\text{sampel}}$ (Mandels *et al.*, 1976).

Aktivitas unit dihitung melalui Persamaan 14 sebagai berikut:

$$AU = \frac{(A_{\text{sampel}} - A_{\text{kontrol}}) - b}{a} \times \frac{1}{V_{\text{enzim}}} \times \frac{1}{t_{\text{inkubasi}}} \times \frac{1.000 \times FP}{Mr_{\text{produk}}} \quad (14)$$

Keterangan:

- FP = faktor pengenceran enzim
 V = volume enzim = 0,25 mL
 t = waktu inkubasi = 30 menit
 Mr produk = massa relatif molekul glukosa = 180 g/mol
 b dan a = *intercept* dan *slope* kurva standar glukosa

3.3.10. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Langkah-langkah yang dilakukan pada penentuan kadar protein dengan metode Lowry (1951) adalah sebagai berikut:

3.3.10.1. Pembuatan pereaksi Lowry

- 1) Pereaksi A: 2,0 g Na_2CO_3 dilarutkan ke 100 mL NaOH 0,1 N.
- 2) Pereaksi B: campuran larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 % dengan larutan Na/K *tartrate* 1 % (1:1).
- 3) Pereaksi C: 2,0 mL pereaksi B + 100 mL pereaksi A.
- 4) Pereaksi D: campuran reagen *Folin Ciocalteu's phenol* dengan akuades (1:1).
- 5) Larutan deret standar Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

3.3.10.2. Pembuatan kurva standar BSA

Blanko yang digunakan pada pengukuran adalah akuades. Larutan standar BSA dengan konsentrasi bertingkat (20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm) direaksikan terlebih dahulu dengan pereaksi Lowry, kemudian dimasukkan secara berurutan

ke dalam kuvet sampel untuk diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) yang telah ditentukan. Hasil menunjukkan bahwa λ_{maks} berada pada kisaran 750 nm (Lowry, 1951). Data hubungan antara absorbansi dan konsentrasi BSA selanjutnya diplotkan dalam bentuk kurva kalibrasi linier. Nilai *slope* dan *intercept* dari kurva standar BSA tersebut digunakan sebagai dasar perhitungan konsentrasi protein pada sampel uji.

3.3.10.3. Penentuan kadar protein (Lowry, 1951)

Tabung sampel dan kontrol disiapkan secara terpisah. Pada tabung sampel, sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambahkan ke dalam 0,9 mL akuades. Sementara itu, pada tabung kontrol, volume enzim yang sama digantikan dengan 0,1 mL akuades. Selanjutnya, ke masing-masing tabung ditambahkan 5 mL pereaksi C, kemudian dikocok homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah inkubasi, ke dalam setiap tabung ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, dikocok kembali, dan dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit. Pengukuran absorbansi larutan dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sesuai metode Lowry (1951).

3.3.11. Imobilisasi Enzim α -Amilase dengan Silika Gel 60

Imobilisasi enzim menggunakan matriks silika gel 60 dilakukan dengan metode adsorpsi fisik (Yandri *et al.*, 2018) dengan prosedur sebagai berikut:

3.3.11.1. Penentuan pH buffer pengikatan enzim-silika gel 60

Sebanyak 0,20 g silika gel 60 dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga dan distabilkan menggunakan larutan buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; dan 7,5 hingga kondisi pH yang diinginkan tercapai. Selanjutnya, matriks dipisahkan dari supernatan melalui sentrifuga selama 15 menit. Pada matriks yang diperoleh kemudian ditambahkan masing-masing 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 0,5 mL buffer fosfat 0,1 M sesuai variasi pH yang digunakan. Untuk mengoptimalkan proses pengikatan, campuran diinkubasi pada suhu 4 °C selama 30 menit, kemudian kembali disentrifuga selama 15 menit.

Supernatan yang mengandung enzim dipisahkan dari matriks dan dijadikan sebagai kontrol. Aktivitas enzim yang terikat pada matriks ditentukan menggunakan metode Mandels. Variasi pH buffer yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi pada matriks ditetapkan sebagai pH optimum untuk proses pengikatan enzim–matriks.

3.3.11.2. Imobilisasi enzim dengan silika gel 60

Sebanyak 0,50 g silika gel 60 distabilkan menggunakan buffer pada pH pengikatan melalui proses pergantian buffer sebanyak 3–4 kali, disertai sentrifuga selama 15 menit hingga tercapai pH yang sesuai, dengan pemantauan menggunakan pH meter. Selanjutnya, ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 0,5 mL buffer pengikatan. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 4 °C selama 30 menit, kemudian disentrifuga kembali selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh diambil sebanyak 0,25 mL untuk dijadikan kontrol pada uji Mandels. Sementara itu, pada matriks yang mengandung enzim ditambahkan 1 mL substrat pati dan diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah inkubasi, enzim terimobilisasi dipisahkan dari matriks melalui sentrifuga selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh diambil sebanyak 0,5 mL untuk dijadikan sampel uji Mandels, kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi DNS sesuai prosedur metode Mandels.

3.3.12. Imobilisasi Enzim α -Amilase dengan Kitin

Proses imobilisasi enzim dilakukan menggunakan metode adsorpsi fisik (Yandri *et al.*, 2018) dengan tahapan prosedural sebagai berikut :

3.3.12.1. Penentuan pH buffer pengikatan enzim-kitin

Sebanyak 0,20 g kitin dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga, kemudian distabilkan menggunakan larutan buffer fosfat/asetat 0,1 M dengan variasi pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; dan 7,5) hingga kondisi pH yang diinginkan tercapai. Buffer asetat digunakan pada pH 4,0 dan 4,5. Selanjutnya, matriks dipisahkan dari supernatan melalui proses sentrifuga selama 15 menit, kemudian ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis serta 0,5 mL buffer fosfat/asetat 0,1 M

sesuai variasi pH yang digunakan. Untuk mengoptimalkan interaksi pengikatan, campuran diinkubasi pada suhu 4 °C selama 30 menit, kemudian disentrifuga kembali selama 15 menit. Supernatan yang mengandung enzim dipisahkan dari matriks dan digunakan sebagai kontrol. Aktivitas enzim pada kompleks matriks–enzim selanjutnya ditentukan menggunakan metode Mandels. Variasi pH buffer yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi pada matriks ditetapkan sebagai pH optimum untuk proses pengikatan enzim–matriks.

3.3.12.2. Imobilisasi enzim dengan kitin

Sebanyak 0,50 g kitin distabilkan menggunakan buffer pada pH pengikatan melalui proses pertukaran buffer sebanyak 3–4 kali, disertai sentrifuga selama 15 menit hingga kondisi pH yang diinginkan tercapai. Stabilitas pH sampel kemudian diverifikasi menggunakan pH meter. Selanjutnya, ke dalam sampel ditambahkan masing-masing 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 0,5 mL buffer pengikatan, kemudian diinkubasi pada suhu 4 °C selama 30 menit. Setelah inkubasi, sampel disentrifuga selama 15 menit, dan sebanyak 0,25 mL supernatan diambil untuk dijadikan kontrol pada uji Mandels. Sisa matriks-enzim kemudian ditambahkan 1 mL substrat pati dan diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Tahap berikutnya, enzim terimobilisasi dipisahkan kembali dari matriks melalui sentrifuga selama 15 menit. Akhirnya, ke dalam sampel ditambahkan 1 mL pereaksi DNS sesuai prosedur metode Mandels.

3.3.13. Sintesis Hibrida Silika-Kitin

Proses pembuatan matriks hibrida silika-kitin dilakukan dengan mengikuti beberapa tahapan yang disusun secara berurutan, seperti dijelaskan berikut ini:

3.3.13.1. Pembuatan larutan

- 1) Larutan CH₃COOH (Mr = 60,05 g/mol) 0,1 M sebanyak 500 mL
CH₃COOH glasial 17,5 M diencerkan menjadi 0,1 M melalui Persamaan 12.
Untuk membuat 100 mL larutan CH₃COOH 1,0 M diperlukan 5,7 mL
CH₃COOH glasial yang diencerkan dengan akuades ke dalam labu ukur 100 mL hingga batas meniskus, lalu dihomogenkan.

2) Larutan glutaraldehida 1 % sebanyak 10 mL

Glutaraldehida 25 % diencerkan menjadi 1 % melalui Persamaan 12. Untuk membuat 10 mL glutaraldehida 1 % diperlukan 0,4 mL glutaraldehida 25 % yang dilarutkan dengan 9,6 mL akuades dalam tabung reaksi, lalu dihomogenkan dengan *vortex*.

3.3.13.2. Pembuatan material hibrida silika-kitin

Sebanyak 8,0 g kitin didispersikan ke dalam 800 mL larutan asam asetat 1,0 M dan diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 24 jam pada suhu 30 °C. Selanjutnya, ditambahkan 8 mL glutaraldehida 1% (b/b) sebagai agen *crosslinking*. Kemudian, 8,0 g silika dimasukkan ke dalam campuran tersebut dan diaduk kembali dengan pengaduk magnetik yang dilengkapi pemanas pada suhu 60 °C selama 4 jam hingga terbentuk hibrida silika-kitin. Suspensi matriks hibrida selanjutnya dinetralkan dengan akuades melalui proses sentrifuga berulang hingga lima hari, sampai diperoleh filtrat dengan pH netral. Endapan matriks yang terbentuk dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C selama lima hari, kemudian didinginkan dalam desikator selama 15 menit. Sampel kering tersebut selanjutnya digerus menggunakan mortar dan alu hingga diperoleh serbuk halus (Wan *et al.*, 2010).

3.3.14. Analisis Spektroskopi IR

Sebanyak 0,5 g serbuk halus kitin (Sigma Aldrich™), silika (Merck) dan hibrida silika-kitin dilakukan analisis spektroskopi IR pada rentang bilangan gelombang 4.000-400 cm⁻¹.

3.3.15. Imobilisasi Enzim α -Amilase dengan Hibrida Silika-Kitin

Proses imobilisasi enzim pada material hibrida silika-kitin diterapkan melalui pendekatan adsorpsi-*crosslinking* (Yandri *et al.*, 2023) dengan tahapan prosedural sebagai berikut :

3.3.15.1. Penentuan pH buffer pengikatan enzim-matriks hibrida

Sebanyak 0,20 g hibrida silika-kitin dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan distabilkan menggunakan buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; dan 7,0 hingga mencapai kondisi pH yang diinginkan. Selanjutnya, matriks dipisahkan dari supernatan melalui proses sentrifuga selama 15 menit. Ke dalam matriks ditambahkan masing-masing 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 0,5 mL buffer fosfat 0,1 M sesuai variasi pH. Untuk mengoptimalkan proses pengikatan, campuran diinkubasi pada suhu 4 °C selama 30 menit, kemudian disentrifuga kembali selama 15 menit. Supernatan enzim yang diperoleh dipisahkan dan digunakan sebagai kontrol. Aktivitas enzim yang terikat pada matriks ditentukan menggunakan metode Mandels. Variasi pH buffer yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi pada matriks ditetapkan sebagai pH optimum untuk proses pengikatan enzim–matriks.

3.3.15.2. Imobilisasi enzim dengan matriks hibrida

Proses imobilisasi enzim pada material hibrida silika-kitin diterapkan melalui pendekatan adsorpsi–*crosslinking* (Yandri *et al.*, 2023). Sebanyak 0,50 g hibrida silika-kitin distabilkan menggunakan buffer pada pH pengikatan melalui proses penggantian buffer sebanyak 3–4 kali, masing-masing diikuti sentrifuga selama 15 menit hingga pH yang diinginkan tercapai. Nilai pH dikonfirmasi menggunakan pH meter. Selanjutnya, ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis bersama dengan 0,5 mL buffer pengikatan. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 4 °C selama 30 menit dan disentrifuga kembali selama 15 menit. Dari supernatan yang diperoleh, diambil sebanyak 0,25 mL untuk dijadikan kontrol pada uji Mandels. Matriks-enzim selanjutnya ditambahkan 0,1 mL substrat pati dan diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Setelah inkubasi, enzim terimobilisasi dipisahkan dari matriks melalui sentrifuga selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan diambil sebanyak 0,5 mL sebagai sampel untuk uji Mandels, kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi DNS sesuai prosedur metode Mandels.

3.3.16. Karakterisasi Enzim α -Amilase Murni dan Hasil Imobilisasi

Enzim murni yang digunakan merupakan enzim hasil proses dialisis, sedangkan enzim terimobilisasi diperoleh dari enzim hasil dialisis yang selanjutnya melalui tahap imobilisasi pada material hibrida silika-kitin.

3.3.16.1. Penentuan pH optimum

Sebanyak 0,25 mL enzim dicampurkan dengan 0,25 mL larutan pati 0,1% pada variasi pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; dan 7,0). Campuran reaksi kemudian diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Aktivitas enzim, baik pada sampel maupun kontrol, selanjutnya dianalisis menggunakan prosedur Mandels.

3.3.16.2. Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan melalui variasi suhu inkubasi pada uji Mandels, meliputi 50, 55, 60, 65, 70 dan 75 °C selama 30 menit. Suhu inkubasi yang menghasilkan aktivitas enzim paling tinggi ditetapkan sebagai suhu optimum enzim.

3.3.16.3. Penentuan K_M dan V_{maks}

Parameter kinetika enzim, yaitu konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}), ditetapkan melalui analisis pengaruh variasi konsentrasi substrat (pati) terhadap aktivitas enzim dalam bentuk murni maupun terimobilisasi. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan meliputi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; dan 1,2 % (Robinson, 2015). Proses inkubasi enzim dilakukan pada suhu optimum masing-masing selama 30 menit, kemudian aktivitas enzim diuji menggunakan metode Mandels. Selanjutnya, data hasil pengukuran berupa $1/v$ terhadap $1/[S]$ diplotkan pada grafik Lineweaver–Burk untuk memperoleh nilai K_M dan V_{maks} berdasarkan Persamaan 2. Nilai K_M yang diperoleh digunakan sebagai acuan konsentrasi substrat optimum pada tahap percobaan selanjutnya.

3.3.16.4. Penentuan kestabilan termal enzim

Kestabilan termal enzim dievaluasi berdasarkan aktivitas residu enzim setelah mengalami perlakuan inaktivasi pada suhu 60 °C dengan variasi waktu inkubasi berturut-turut 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 menit (Santos *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 1996). Pengujian aktivitas enzim α -amilase dilakukan menggunakan metode Mandels pada suhu optimum masing-masing. Data hasil pengujian tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai konstanta inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), serta perubahan energi bebas akibat denaturasi (ΔG_i).

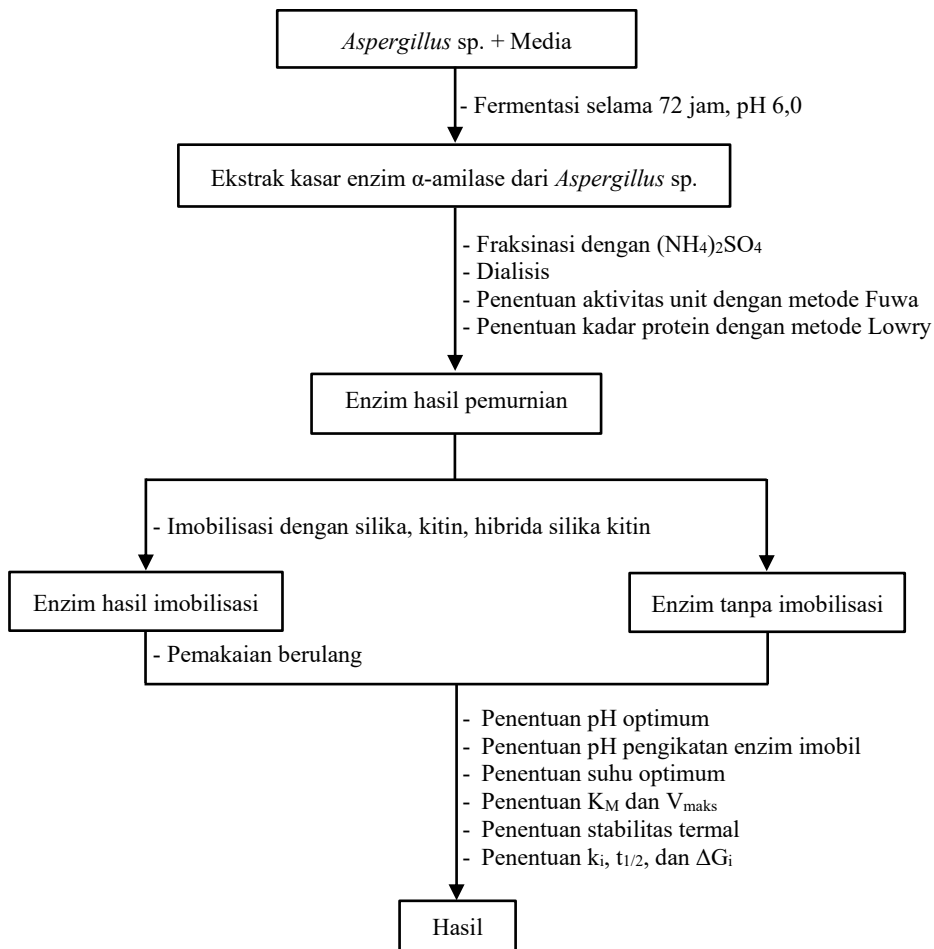
3.3.16.5. Pemakaian berulang enzim imobil

Enzim imobil yang telah bereaksi dengan substrat pada siklus pertama dipisahkan dan dicuci kembali menggunakan buffer awal melalui proses sentrifugasi. Dari supernatan yang diperoleh, diambil sebanyak 0,25 mL sebagai sampel kontrol. Selanjutnya, enzim imobil direaksikan kembali dengan 1,0 mL substrat segar menggunakan prosedur imobilisasi yang sama. Aktivitas enzim α -amilase kemudian dianalisis dengan metode Mandels pada suhu optimum masing-masing enzim. Seluruh rangkaian prosedur ini diulangi secara bertahap dalam beberapa siklus (Yandri *et al.*, 2023).

3.3.16.6. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi bebas akibat denaturasi (ΔG_i)

Penentuan nilai k_i didasarkan pada Persamaan 4, nilai $t_{1/2}$ ditentukan dengan menggunakan Persamaan 6, sedangkan nilai ΔG_i ditentukan melalui Persamaan 5.

Skema penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 18. Skema penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan hasil analisis dan pembahasan terhadap data penelitian yang telah diperoleh, maka dapat dirumuskan beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Enzim hasil pemurnian meningkat kemurniannya sebanyak 12 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan aktivitas spesifik ekstrak kasar dan enzim hasil pemurnian berturut-turut 106,25 dan 1297,5 U/mg.
2. Enzim α -amilase bebas optimum pada pH 4,5; suhu optimum 50 °C; $K_M = 5,77$ mg/mL substrat, $V_{maks} = 40,16 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ dan uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian pada suhu 60 °C selama 80 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 59,9 % dengan nilai $k_i = 0,0071 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 97,6$ menit, dan $\Delta G_i = 103,616 \text{ kJ mol}^{-1}$.
3. Enzim α -amilase/silika gel 60 optimum pada suhu 60 °C; enzim α -amilase/kitin dan α -amilase/hibrida silika-kitin optimum pada suhu 55 °C. Nilai K_M enzim α -amilase hasil imobilisasi dengan silika gel, kitin dan hibrida silika kitin berturut-turut yaitu 6,53; 6,52; dan 7,14 mg/mL substrat, serta nilai V_{maks} berturut-turut 17,42; 17,09; 16,56 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$.
4. Hasil uji stabilitas termal enzim imobilisasi dengan silika gel 60, kitin, dan hibrida silika-kitin pada suhu 60 °C selama 80 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 78,3; 68,6; dan 81,1 % dengan nilai k_i berturut-turut sebesar 0,0030; 0,0046; dan 0,0023 menit^{-1} .

5. Nilai ΔG_i enzim α -amilase hasil imobilisasi dengan silika gel 60, kitin, dan hibrida silika-kitin meningkat menjadi 109,294; 106,446; dan 108,336 kJ mol⁻¹, nilai $t_{1/2}$ berturut-turut 231,1; 150,7; dan 301,4 menit. Berdasarkan meningkatnya nilai $t(1/2)$ dapat disimpulkan bahwa enzim α -amilase hasil imobilisasi dengan silika gel 60, kitin, dan hibrida silika-kitin meningkat kestabilannya menjadi 2,37; 1,54; dan 3,09 kali dibandingkan enzim α -amilase bebas.
6. Enzim α -amilase hasil imobilisasi dengan silika gel 60, kitin, dan hibrida silika-kitin memiliki aktivitas sisa sebesar 36,3; 46,3; dan 61,2 % setelah sepuluh kali pengulangan.
7. Enzim hasil imobilisasi menggunakan matriks hibrida silika–kitin merupakan material yang lebih baik untuk imobilisasi α -amilase dari *Aspergillus* sp. dibandingkan dengan matriks silika gel 60 dan kitin, yang dibuktikan oleh meningkatnya waktu paruh enzim serta aktivitas sisa setelah 10 kali penggunaan berulang.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka disarankan untuk penelitian selanjutnya melakukan hal sebagai berikut:

1. Pemurnian enzim lebih lanjut, seperti kromatografi kolom dan elektroforesis.
2. Untuk meminimalkan kehilangan massa material hibrida silika-kitin selama tahap pembilasan hingga pH netral, penelitian selanjutnya disarankan menggunakan metode pemisahan yang lebih efektif, seperti sentrifugasi dengan kecepatan optimal dan penggunaan membran filtrasi yang sesuai.
3. Imobilisasi dengan matriks hibrida dari material berpori lainnya seperti Alumina maupun hidroksiapatit

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Mageed, H. M., Fouad, S. A., Teaima, M. H., Abdel-Aty, A. M., Fahmy, A. S., Shaker, D. S., and Mohamed, S. A. 2019. Optimization of nano spray drying parameters for production of α -amylase nanopowder for biotherapeutic applications using factorial design. *Dry. Technol.* **37**(16) : 2152–2160.
- Abdulaal, W. H. 2018. Purification and characterization of cysteine protease from miswak *Salvadora persica*. *BMC Biochem.* **19**(1) : 1–10.
- Acet, Ö., İnanan, T., Acet, B. Ö., Dikici, E., and Odabaşı, M. 2021. α -amylase immobilized composite cryogels: Some studies on kinetic and adsorption factors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **193**(8) : 2483–2496.
- Ahmed, S. A., Mostafa, F. A., and Ouis, M. A. 2018. Enhancement stability and catalytic activity of immobilized α -amylase using bioactive phospho-silicate glass as a novel inorganic support. *Int. J. Biol. Macromol.* **112** : 371–382.
- Al-Bedak, O. A. H., Sakr, R. S., and AL-Kolaibe, A. M. 2022. The microbial amylases: an overview with practical consequences and applications. *J. Microbiol. Exp.* **10**(4) : 130–134.
- Al Angari, Y. M., Almulaiky, Y. Q., Alotaibi, M. M., Hussein, M. A., and El-Shishtawy, R. M. 2023. Synthesis and characterization of aminoamidine-based polyacrylonitrile fibers for lipase immobilization with effective reusability and storage stability. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(3) : 1–14.
- Almulaiky, Y. Q., Khalil, N. M., El-Shishtawy, R. M., Altalhi, T., Algamal, Y., Aldhahri, M., Al-Harbi, S. A., Allehyani, E. S., Bilal, M., and Mohammed, M. M. 2021. Hydroxyapatite-decorated ZrO₂ for α -amylase immobilization: toward the enhancement of enzyme stability and reusability. *Int. J. Biol. Macromol.* **167** : 299–308.
- Alnadari, F., Xue, Y., Zhou, L., Hamed, Y. S., Taha, M., and Foda, M. F. 2020. Immobilization of β -glucosidase from *thermatoga maritima* on chitin-functionalized magnetic nanoparticle via a novel thermostable chitin-binding domain. *Sci. Rep.* **10**(1663) : 1–12.

- Amir, A., Djalal, T., Nassima, S., and Fouzi, T. A. 2024. Starch from Biomass—Sources, Extraction, and Application. In *Plant biomass derived materials: Sources, Extractions, and Applications* (pp. 63–115). Wiley Online Library.
- Arora, N., Kaur, S., and Kaur, S. 2017. Use of agro industrial residues for the production of amylase by *Penicillium sp.* for applications in food industry. *J. Biotechnol. Biomater.* **07**(02) : 2–5.
- Atkins, P., Paula, J. de, and Keeler, J. 2018. *Atkins' Physical Chemistry Eleventh Edition*. Oxford University Press. United Kingdom.
- Bamigboye, C. O., Okonji, R. E., Oluremi, I. O., and James, V. 2022. Stain removing, juice-clarifying, and starch-liquefying potentials of amylase from *Pleurotus tuberregium* in submerged fermentation system. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **20**(1) : 23.
- Banerjee, A. K., Laya Mimo, M. S., and Vera Vegas, W. J. 2001. Silica gel in organic synthesis. *Russ. Chem. Rev.* **70**(11) : 1114–1115.
- Barrino, F. 2024. Hybrid organic–inorganic materials prepared by sol–gel and sol–gel-coating method for biomedical use: Study and synthetic review of synthesis and properties. *Coatings.* **14**(4) : 425.
- Bednarska, K. A. 2015. *Kinetic modelling of enzymatic starch hydrolysis*. Wageningen University and Research. Belanda.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. 2007. *Biochemistry (loose-leaf)*. W.H. Freeman and Company. Macmillan.
- Bergthaller, W., and Hollmann, J. 2014. Starch. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier Inc.
- Bhushani, J. A., and Anandharamakrishnan, C. 2014. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends Food Sci. Technol.* **38**(1) : 21–33.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. 1996. *Protein methods* (Vol. 432). Wiley-Liss. New York.
- Bommarius, A. S., and Paye, M. F. 2013. Stabilizing biocatalysts. *Chem. Soc. Rev.* **42**(15) : 6534–6565.
- Cereda, M. P., and Vilpoux, O. F. 2023. *Starch Industries: Processes and Innovative Products in Food and Non-Food Uses*. Elsevier. United States.
- Chauhan, S., and Upadhyay, L. S. B. 2021. The quest for reusability: The facile and stable immobilization of papain on cysteine functionalized iron oxide nanoparticles activated glass surface. *Indian J. Biochem. Biophys.* **58**(2) : 141–147.

- Chen, N., Chang, B., Shi, N., Yan, W., Lu, F., and Liu, F. 2023. Cross-linked enzyme aggregates immobilization: preparation, characterization, and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **43**(3) : 369–383.
- Chibata, I. 1978. *Immobilized enzymes, research and development*. Halsted Press. Sydney.
- Compart, J., Singh, A., Fettke, J., and Apriyanto, A. 2023. Customizing starch properties: a review of starch modifications and their applications. *Polymers.* **15**(16) : 3491.
- Dassey, A. J., and Theegala, C. S. 2013. Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. *Bioresour. Technol.* **128** : 241–245.
- Datta, S., Christena, L. R., and Rajaram, Y. R. S. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech.* **3**(1) : 1–9.
- Drott, M. T., Lazzaro, B. P., Brown, D. L., Carbone, I., and Milgroom, M. G. 2017. Balancing selection for aflatoxin in *Aspergillus flavus* is maintained through interference competition with, and fungivory by insects. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **284**(1869) : 1–9.
- Dutta, A. 2017. Chapter 4 - Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, and R. K. Mishra (Eds.), *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization* (pp. 73–93). Elsevier.
- Dwevedi, A. 2016. Basics of enzyme immobilization. In *Enzyme immobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment* (pp. 21–44). Springer. Switzerland.
- El-Shishtawy, R. M., Al Angari, Y. M., Alotaibi, M. M., and Almulaiky, Y. Q. 2023. Acrylic fabric and nanomaterials to enhance α -amylase-based biocatalytic immobilized systems for industrial food applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **233** : 123539.
- Far, B. E., Ahmadi, Y., Khosroushahi, A. Y., and Dilmaghani, A. 2020. Microbial alpha-amylase production: Progress, challenges and perspectives. *Adv. Pharm. Bull.* **10**(3) : 350–358.
- Fessenden, R. J., dan Fessenden, J. S. 1982. *Kimia Organik Edisi Ke-3 Jilid 1*. Erlangga. Jakarta:
- Foulani, A. El, Tarhouchi, S., Hammoudan, I., Saddik, R., Yahya, A., Alzahrani, A., and Tighadouini, S. 2025. A novel hydrazide-modified silica gel as a promising material for adsorption of methyl orange from aqueous solutions : Experiments and theoretical insights. *Results Surf. Interfaces.* **18**(January) : 100455.

- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J. Biochem.* **41**(5) : 583–603.
- Galán, J., Rodríguez, A., Gómez, J. M., Allen, S. J., and Walker, G. M. 2013. Reactive dye adsorption onto a novel mesoporous carbon. *Chem. Eng. J.* **219** : 62–68.
- Gali, K. K., Soundararajan, N., Katiyar, V., and Sivaprakasam, S. 2021. Electrospun chitosan coated polylactic acid nanofiber: A novel immobilization matrix for α – Amylase and its application in hydrolysis of cassava fibrous waste. *J. Mater. Res. Technol.* **13** : 686–699.
- Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G., and Perrone, G. 2016. Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *Int. J. Food Microbiol.* **217** : 162–169.
- Gee, C. L., Holton, J. M., and McPherson, A. 2021. Structures of two novel crystal forms of *Aspergillus oryzae* alpha amylase (taka-amylase). *J. Biosci. Bioeng.* **131**(6) : 605–612.
- Giusiano, G. E., Piontelli, E., Fernández, M. S., Mangiaterra, M. L., Cattana, M. E., Kocsubé, S., and Varga, J. 2017. Biodiversity of species of *Aspergillus* section *Fumigati* in semi-desert soils in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **49**(3) : 247–254.
- Gomez-Romero, P., Pokhriyal, A., Rueda-García, D., Bengoa, L. N., and González-Gil, R. M. 2024. Hybrid materials: A metareview. *Chem. Mater.* **36**(1) : 8–27.
- Guo, L., Li, J., Gui, Y., Zhu, Y., Yu, B., Tan, C., Fang, Y., and Cui, B. 2020. Porous starches modified with double enzymes: Structure and adsorption properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **164** : 1758–1765.
- Gupta, N., Beliya, E., Paul, J. S., and Jadhav, S. K. 2022. Nanoarmoured α -amylase: A route leading to exceptional stability, catalysis and reusability for industrial applications. *Coord. Chem. Rev.* **464** : 214557.
- GVR. 2024. Enzymes market size, share and trends analysis report by product (carbohydrase, proteases, polymerases and nucleases), by type (industrial, specialty), by source (plants, animals), by region, and segment forecasts, 2024 - 2030. *Enzymes Market Size And Share, Industry Report, 2030.* **140** : 1–11.
- Hamza, T. A., Sherif, A. H., and Abdalla, E. A. 2017. A novel approach to reinforce provisional material using silica gel powder. *Stomatological Dis. Sci.* **1** : 3–7.

- Hébert-Seropian, S., and Pelet, S. 2020. *Aspergillus* osteomyelitis of the scapula: a case report. *JBJS Case Connect.* **10**(1) : e0343.
- Hernandez, K., and Fernandez-Lafuente, R. 2011. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme Microb. Technol.* **48**(2) : 107–122.
- Hesham, A. E.-L., Heba, G., Bahaa, A., Saleh, F., and Osama, A.-B. 2019. Molecular identification of naturally isolated *Candida tropicalis* AUN-H100 and optimization of their extracellular amylase production. *Int. J. Agric. Sci. Vet. Med.* **7**(4) : 28–34.
- Holme, D. J., and Peck, H. 1960. *Analytical Biochemistry*. Longman Scientific and Technical. England.
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensc, K., Samson, R. A., and Frisvad, J. C. 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud. Mycol.* **95** : 5–169.
- Hwang, E. T., and Gu, M. B. 2013. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Eng. Life Sci.* **13**(1) : 49–61.
- Jafari, F., Kiani-Ghaleh, F., Eftekhari, S., Razzaghshoar Razlighi, M., Nazari, N., Hajirajabi, M., Masoomi Sarvestani, F., and Sharafieh, G. 2022. Cloning, overexpression, and structural characterization of a novel archaeal thermostable neopullulanase from *Desulfurococcus mucosus* DSM 2162. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **52**(10) : 1190–1201.
- Jahanbakhshi, M., Ghaemi, A., and Helmi, M. 2024. Impregnation of silica gel with choline chloride - MEA as an eco - friendly adsorbent for - CO₂ capture. *Sci. Rep.* **14**(15208) : 1–16.
- Jesionowski, T., Zdarta, J., and Krajewska, B. 2014. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption.* **20**(5–6) : 801–821.
- Judeinstein, P., and Sanchez, C. 1996. Hybrid organic–inorganic materials: a land of multidisciplinary. *J. Mater. Chem.* **6**(4) : 511–525.
- Kazan, D., Ertan, H., and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**(2) : 191–197.
- Klich, M. A. 2002. Identification of Common *Aspergillus* spp, Ponson and Looijen, Wageningen. *The Netherlands*, **116**.

- Kong, X. 2020. Fine structure of amylose and amylopectin. In *Starch Structure, Functionality and Application in Foods* (pp. 29–39). Springer. Singapore.
- Koutserimpas, C., Chamakioti, I., Naoum, S., Raptis, K., Alpantaki, K., Kofteridis, D. P., and Samonis, G. 2021. Spondylodiscitis caused by *Aspergillus* species. *Diagnostics*. **11**(10) : 1899.
- Kumar, J. S., Sunitha, S., and Giri, N. A. 2024. A review of tropical root and tuber crops for livelihood security and nutrition. *Environ. Ecol.* **42** : 1793–1800.
- Kuo, P., Lin, Z., Wu, T., Hsu, C., Lin, H., and Wu, T. 2021. Effects of morphology and pore size of mesoporous silicas on the efficiency of an immobilized enzyme†. *RSC Adv.* **11** : 10010–10017.
- Kuriki, T., and Imanaka, T. 1999. The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J. Biosci. Bioeng.* **87**(5) : 557–565.
- Latgé, J.-P., and Chamilos, G. 2019. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin. Microbiol. Rev.* **33**(1) : 1–75.
- Lowry, O. H. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193** : 265–275.
- Magro, L. D., Silveira, V. C. C., Weber, E., Menezes, D., Valmir, E., Nicolodi, S., Hertz, P. F., Klein, M. P., and Rodrigues, R. C. 2018. International journal of biological macromolecules magnetic biocatalysts of pectinase and cellulase : synthesis and characterization of two preparations for application in grape juice clarification. *Int. J. Biol. Macromol.* **115** : 35–44.
- Makfoeld, D. 1993. *Mikotoksin pangan*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Mandels, M., Andreotti, R., and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **6** : 21–33.
- Mei, S., Han, P., Wu, H., Shi, J., Tang, L., and Jiang, Z. 2018. One-pot fabrication of chitin-shellac composite microspheres for efficient enzyme immobilization. *J. Biotechnol.* **266** : 1–8.
- More, S. S., Kadam, S. P., and Redasani, V. K. 2025. A Comprehensive Review of UV-visible spectroscopy. *Int. J. Pharm. Res. Appl.* **10**(3) : 114–134.
- Movahedpour, A., Asadi, M., Khatami, S. H., Taheri-Anganeh, M., Adelipour, M., Shabaninejad, Z., Ahmadi, N., Irajie, C., and Mousavi, P. 2022. A brief overview on the application and sources of α -amylase and expression hosts properties in order to production of recombinant α -amylase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **69**(2) : 650–659.

- Nahda, D. P. N., Sanjaya, R., and Rahmawati, F. 2025. Synthesis of mesoporous carbon from banana peels with silica gel 60 as the hard templates. *RSC Adv.* **15**(6) : 4536–4545.
- Naik, B., Kumar, V., Rizwanuddin, S., Chauhan, M., Gupta, A. K., Rustagi, S., Kumar, V., and Gupta, S. 2023. Agro-industrial waste: a cost-effective and eco-friendly substrate to produce amylase. *Food Prod. Process. Nutr.* **5**(30) : 1–12.
- Ni'mah, Y. L., Subandi, A. P. K., and Suprpto, S. 2022. The application of silica gel synthesized from chemical bottle waste for zinc (II) adsorption using response surface methodology (RSM). *Heliyon.* **8**(12) : 1–9.
- Ni'mah, Y. L., Suprpto, S., Subandi, A. P. K., Yuningsih, N. E., and Pertiwi, A. C. 2022. The optimization of silica gel synthesis from chemical bottle waste using response surface methodology. *Arab. J. Chem.* **15**(12) : 1–8.
- Nwagu, T. N., and Okolo, B. N. 2011. Growth profile and amylolytic activity of a thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from soil. *Asian J Biotechnol.* **3**(1) : 46–57.
- Offen, W. A., Viksoe-Nielsen, A., Borchert, T. V., Wilson, K. S., and Davies, G. J. 2015. Three-dimensional structure of a variant termamyl-like *Geobacillus stearothermophilus* α -amylase at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **71**(1) : 66–70.
- Okwuenu, P. C., Onosakponome, I., Oparaji, E. H., and Isoje, A. O. 2025. Characterization of chitin and chitosan from shells of water snail (*Pila ampullacea*) using fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). *Int. J. Biol. Macromol.* **333** : 149012.
- Olatunde, A., Obidola, M. S., and Tijjani, H. 2022. Chapter 3 - Centrifugation techniques. In C. Egbuna, K. C. Patrick-Iwuanyanwu, M. A. Shah, J. C. Ifemeje, and A. Rasul (Eds.), *Analytical Techniques in Biosciences* (pp. 43–58). Academic Press. Nigeria.
- Olawoye, B., Jolayemi, O. S., Origbemisoye, B. A., Oluwajuyitan, T. D., and Popoola-Akinola, O. 2023. Hydrolysis of starch. In *Starch: Advances in modifications, technologies and applications* (pp. 83–101). Springer. Switzerland.
- Oliveira, A. C. D., Vargas, J. V. C., Rodrigues, M. L. F., and Mariano, A. B. 2013. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. *Rev. Bras. Prod. Agroind.* **15**(1) : 19–26.
- Page, D. S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Surabaya.

- Pan, S., Ding, N., Ren, J., Gu, Z., Li, C., Hong, Y., Cheng, L., Holler, T. P., and Li, Z. 2017. Maltooligosaccharide-forming amylase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnol. Adv.* **35**(5) : 619–632.
- Pandey, G., Munguambe, D. M., Tharmavaram, M., Rawtani, D., and Agrawal, Y. K. 2017. Halloysite nanotubes - An efficient ‘nano-support’ for the immobilization of α -amylase. *Appl. Clay Sci.* **136** : 184–191.
- Pfliegler, W. P., Pócsi, I., Győri, Z., and Pusztahelyi, T. 2020. The *Aspergilli* and their mycotoxins: Metabolic interactions with plants and the soil biota. *Front. Microbiol.* **10** : 2921.
- Polizzi, K. M., Bommarius, A. S., Broering, J. M., and Chaparro-Riggers, J. F. 2007. Stability of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**(2) : 220–225.
- Rai, S., Pokhrel, P., Udash, P., Chemjong, M., Bhattarai, N., Thuanthong, A., Nalinanon, S., and Nirmal, N. 2025. Chitin and chitosan from shellfish waste and their applications in agriculture and biotechnology industries. *Crit. Rev. Biotechnol.* **0**(0) : 1–19.
- Ramanauskait, A., Mulercikas, P., Greer, H. F., Mujtaba, M., Labidi, J., and Kaya, M. 2026. Understanding the correlation between source and chiral , physicochemical properties of chitin nanocrystals ; insights from beetle (*Cetonia aurata*) skeletal segments. *Int. J. Biol. Macromol.* **284**(1) : 138042.
- Ramos-Sánchez, L. B., Cujilema-Quitio, M. C., Julian-Ricardo, M. C., Cordova, J., and Fickers, P. 2015. Fungal lipase production by solid-state fermentation. *J. Bioprocess. Biotech.* **05**(02) : 1–9.
- Ratnasri, P. V., Lakshmi, B. K. M., Devi, K. A., and Hemalatha, K. P. J. 2014. Isolation, characterization of *Aspergillus fumigatus* and optimization of cultural conditions for amylase production. *Int. J. Res. Eng. Technol.* **3**(2) : 457–463.
- Ricardi, N. C., de Menezes, E. W., Benvenuto, E. V., da Natividade Schöffner, J., Hackenhaar, C. R., Hertz, P. F., and Costa, T. M. H. 2018. Highly stable novel silica/chitosan support for β -galactosidase immobilization for application in dairy technology. *Food Chem.* **246** : 343–350.
- Rizki, K., Pranowo, D., and Raharjo, T. J. 2020. Immobilization of lipase in silica gel from rice husk ash and its activity assay to hydrolyze palm oil. *BIO Web Conf.* **28**(03005) : 1–4.
- Robinson, P. K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* **59** : 1–41.

- Rodrigues, É. F., Ficanha, A. M. M., Dallago, R. M., Treichel, H., Reinehr, C. O., Machado, T. P., Nunes, G. B., and Colla, L. M. 2017. Production and purification of amylolytic enzymes for saccharification of microalgal biomass. *Bioresour. Technol.* **225** : 134–141.
- Sahni, T. K., and Goel, A. 2015. Microbial enzymes with special reference to α -amylase. *Bio Evol.* **2** : 19–25.
- Samanta, S. 2022. Structural and catalytical features of different amylases and their potential applications. *Jordan J. Biol. Sci.* **15**(2) : 311–337.
- Santos, A. S., Souza, M., Medeiros, E., Rosa, N., and Philippsen, H. K. 2015. Thermal-stability of enzyme activity and its application in the hydrolysis of starchy residue from *Mandioca* processing. *Science.* **4**(10) : 126–128.
- Scopes, R. K. 1993. *Protein purification: principles and practice*. Springer Science and Business Media. New York.
- Seangarun, C., Seesanong, S., Boonchom, B., Laohavisuti, N., Rungrojchaipon, P., Boonmee, W., Punthipayanon, S., and Thongkam, M. 2025. Extraction of chitin, chitosan, and calcium acetate from mussel shells for sustainable waste management. *Int. J. Mol. Sci.* **26**(15) : 7107.
- Singh, R. S., Singh, T., and Pandey, A. 2019. Microbial Enzymes—An Overview. In *Advances in Enzyme Technology, First Edition* (Issue February, pp. 1–40). Elsevier. India.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., and Crouch, S. R. 1996. *Fundamentals of analytical chemistry* (Vol. 33). Saunders College Pub. Fort Worth. Iran.
- Soetemans, L., Uyttebroek, M., and Bastiaens, L. 2020. Characteristics of chitin extracted from black soldier fly in different life stages. *Int. J. Biol. Macromol.* **165** : 3206–3214.
- Sorhaindo, C., and Cuffy, V. 2023. Entangled threads: Creolization of plants and landscape. In *Creole Cultures, Vol. 1: Safeguarding Creole Intangible Cultural Heritage* (pp. 123–143). Springer. Macmillan.
- Steinweg, J. M., Dukes, J. S., Paul, E. A., and Wallenstein, M. D. 2013. Microbial responses to multi-factor climate change : effects on soil enzymes. *Front. Microbiol.* **4**(June) : 1–11.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-dasar spektrofotometri uv-vis dan spektrometri massa untuk penentuan struktur senyawa organik*. AURA. Lampung.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan bioteknologi*. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.

- Sundarram, A., and Murthy, T. P. K. (2014). α -amylase production and applications : A review. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **2**(4) : 166–175.
- Susanto, I., Ismir, I. S., Syarifuddin, P., dan Sungkar, S. 2008. *Buku Ajar Parasitologi Kedokteran, edisi ke 4*. FKUI. Jakarta.
- Tadesse, M., and Liu, Y. 2025. Recent advances in enzyme immobilization: the role of artificial intelligence, novel nanomaterials, and dynamic carrier systems. *Catalysts*. **15**(6) : 571.
- Tesfaye, E. L., Kumar, P., Jutur, P. P., Tefera, A. T., Jiru, T. M., and Gaur, N. A. 2025. The role of amylase in bioethanol production : advances in amylase-producing strains using CRISPR / Cas9 Technology. *Fuel Commun.*, **23**(May) : 100142.
- Tiarsa, E. R., Yandri, Y., Suhartati, T., Satria, H., Irawan, B., and Hadi, S. 2022. The stability improvement of *Aspergillus fumigatus* α -amylase by immobilization onto chitin-bentonite hybrid. *Biochem. Res. Int.* **2022** : 1–9.
- Tincu, C. E., Bouhadiba, B., Atanase, L. I., Stan, C. S., Ochiuz, L., and Popa, M. 2023. An accessible method to improve the stability and reusability of porcine pancreatic α -amylase via immobilization in gellan-based hydrogel particles obtained by ionic cross-linking with Mg^{2+} ions. *Molecules*. **28**(12) : 24.
- Triunfo, M., Tafi, E., Guarnieri, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Hahn, T., Zibek, S., Gagliardini, A., Panariello, L., Coltelli, M. B., De Bonis, A., and Falabella, P. 2022. Characterization of chitin and chitosan derived from *Hermetia illucens*, a further step in a circular economy process. *Sci. Rep.* **12**(1) : 1–17.
- Tsang, C. C., Tang, J. Y. M., Lau, S. K. P., and Woo, P. C. Y. 2018. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **16** : 197–210.
- Uğurlu, E., and Duysak, Ö. 2024. Chitin and chitosan from *Sepia officinalis* : Extraction and Characterization Study. *Menba J. Fish. Fac.* **10**(3) : 1–13.
- Uitdehaag, J., Mosi, R., Kalk, K. H., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., Withers, S. G., and Dijkstra, B. W. 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nat. Struct. Biol.* **6**(5) : 432–436.
- Venkat, R. P. 2007. Taguchi approach for optimization of acid-stable amylase production by an isolated *Aspergillus* sp.. *Res. J. Biotechnol.* **2**(4) : 41–47.
- Visagie, C. M., Yilmaz, N., Kocsubé, S., Frisvad, J. C., Hubka, V., Samson, R. A., and Houbraken, J. 2024. A review of recently introduced *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and other *Eurotiales* species. *Stud. Mycol.* **107**(1) : 1–66.

- Vogel, A., and May, O. 2019. *Industrial enzyme applications*. John Wiley and Sons. Germany.
- Wahab, W. A. A., and Ahmed, S. A. 2018. Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA 2017. *Int. J. Biol. Macromol.* **115** : 447–458.
- Wan, K., Peng, X. H., and Du, P. J. 2010. Chitin/TiO₂ composite for photocatalytic degradation of phenol. *Adv. Mater. Res.* **132** : 105–110.
- Wang, S., and Guo, P. 2020. Botanical sources of starch. In *Starch structure, functionality and application in foods* (pp. 9–27). Springer. Singapore.
- Wening, K. W., dan Herdyastuti, N. 2021. Review: imobilisasi enzim papain dengan silika mesopori dan karagenan sebagai bahan pendukung. *Unesa j. Chem.* **10**(3) : 268–279.
- Wirahadikusumah, M. 1989. *Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB, Bandung.
- Witasari, L. D., Nisrina, S., Yani, A. I. T., Heryadi, A. A., and Pranoto, Y. 2024. Characterization of porous starch produced from arrowroot (*Maranta arundinacea L.*) by enzymatic hydrolysis with α -amylase and glucoamylase. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **7**(January) : 1–9.
- Yandri, A. S., dan Suhartati, T. 2018. *Peningkatan Kestabilan Enzim*. Aura. Lampung.
- Yandri, A. S., Suhartati, T. ., and Hadi, S. 2010. Purification and characterization of extracellular α -amilase enzyme from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Eur. J. Sci. Res.* **39**(1) : 64–74.
- Yandri, Ropingi, H., Suhartati, T., Hendri, J., Irawan, B., and Hadi, S. 2022. The Effect of zeolite/chitosan hybrid matrix for thermal-stabilization enhancement on the immobilization of *Aspergillus fumigatus* α -amylase. *Emerg. Sci. J.* **6**(3), 505–518.
- Yandri, Suhartati, T., Yuwono, S. D., Qudus, H. I., Tiarsa, E. R., and Hadi, S. 2018. Immobilization of α -amylase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 using bentonite. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* **20**(2) : 487–492.
- Yandri, Y., Nadila, N., Suhartati, T., Satria, H., dan Hadi, S. 2020. Peningkatan kestabilan enzim α -amilase dengan penambahan gliserol. *Analit. Anal. Environ. Chem.* **5**(02) : 143–154.
- Yandri, Y., Tiarsa, E. R., Suhartati, T., Irawan, B., and Hadi, S. 2023. Immobilization and stabilization of *Aspergillus fumigatus* α -amylase by adsorption on a chitin. *Emerg. Sci. J.* **7**(1) : 77–89.

- Yandri, Y., Tiarsa, E. R., Suhartati, T., Satria, H., Irawan, B., and Hadi, S. 2022. The stability improvement of α -amylase enzyme from *Aspergillus fumigatus* by immobilization on a bentonite matrix. *Biochem. Res. Int.* **2022** : 1–7.
- Yang, X., Tian, G., and Su, B. 2012. Environmental science immobilization technology : a sustainable solution for biofuel cell design. *Energy Environ. Sci.* **5**(2) : 5540–5563.
- Yang, Z., Domach, M., Auger, R., Yang, F. X., and Russell, A. J. 1996. Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *Enzyme Microb. Technol.* **18**(2) : 82–89.
- Yin, Z., Zhu, L., Li, S., Hu, T., Chu, R., Mo, F., Hu, D., Liu, C., and Li, B. 2020. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresour. Technol.* **301** : 1–19.
- Zdarta, J., Jedrzak, A., Klapiszewski, Ł., and Jesionowski, T. 2017. Immobilization of cellulase on a functional inorganic – organic hybrid support : stability and kinetic study. *Catalysts.* **7**(37) : 1–17.