

Isolasi, Karakterisasi dan Amobilisasi α -Amilase dari *Aspergillus niger* FNCC 6018

Khairun Nisa', Wuryanti, Taslimah

Lab. Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275, Telepon (024) 7474754 khairunnisa_b@yahoo.com

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang isolasi, karakterisasi dan amobilisasi α -amilase dari *Aspergillus niger* FNCC 6018. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan data aktivitas spesifik α -amilase hasil isolasi dari *Aspergillus niger* FNCC 6018, mendapatkan data kondisi optimum enzim, meliputi: pH dan suhu, serta mendapatkan data aktivitas α -amilase teramobilisasi dengan matriks *bacto agar* dan uji perulangannya. Metode yang dilakukan pada penelitian ini untuk uji aktivitas enzim α -amilase dengan mengukur kadar maltosa hasil hidrolisis amilosa dengan keberadaan enzim α -amilase menggunakan metode Bernfeld, dengan reagen *DNS* (3,5-dinitrosalicylic acid). Pengukuran kadar protein dilakukan dengan metode Lowry menggunakan standar *BSA* (*Bovine Serum Albumin*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa α -amilase diperoleh dari isolat kapang *Aspergillus niger* FNCC 6018 pada fraksi 3 amonium sulfat (40-60%) memiliki aktivitas spesifik tertinggi sebesar 5,7 Unit/mg protein. Kondisi optimum kerja enzim α -amilase dari *Aspergillus niger* FNCC 6018 dicapai pada pH 5,0 dan suhu 36^oC. Alfa amilase teramobilisasi pada matriks *bacto agar* memiliki aktivitas spesifik sebesar 1,95 Unit/mg protein dan dapat digunakan sampai 2x perulangan.

Kata kunci: α -amilase, *aspergillus niger*, enzim, amobilisasi, karakterisasi

ABSTRACT

Has done research on isolation, characterization, and immobilization α -amylase from *Aspergillus niger* FNCC 6018. The purposes of this research are to get specific activity data of isolated α -amylase from *Aspergillus niger* FNCC 6018, get optimum condition of enzyme data, include: pH and temperature, and get activity data of immobilized α -amylase in matrix *bacto agar* and recurrence test. The method is use in this research to determine α -amylase activity test by measuring maltose that produce from α -amylase which hydrolize amylose with Bernfeld method using *DNS* (3,5-dinitrosalicylic acid). Amount of protein was measured by Lowry method using standard *BSA* (*Bovine Serum Albumin*). The result of this research show that α -amylase enzyme isolated from *Aspergillus niger* FNCC 6018 which ammonium sulphate fraction 3 (40-60%) has the highest specific activity amount 5.7 Unit/mg protein. Optimum condition α -amylase from *Aspergillus niger* FNCC 6018 was achieved at optimum pH value 5.0 and temperature 36^oC. Immobilized α -amylase in matrix *bacto agar* had specific activity amount 1.95 Unit/mg protein and use until twice recurrence.

Keywords: α -amylase, *aspergillus niger*, enzyme, immobilization, characterization.

I. PENDAHULUAN

Alfa amilase (E.C.3.2.2.1 α -1,4-glucan-glucanohydrolase) ialah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan α -1,4 glikosidik pada pati, glikogen dan turunan polisakarida lainnya^{1}. Pemakaian α -amilase secara luas di bidang industri makanan dan minuman, industri kertas, industri tekstil, industri detergen, bioetanol, pengolahan limbah cair^{{2},{3},{4}}. Kebutuhan α -amilase sendiri sangat besar, sekitar 30% dari produksi enzim dunia adalah α -amilase, oleh karena itu meskipun telah banyak diisolasi dan dikristalisasi, eksplorasi sumber α -amilase yang lebih efisien masih dibutuhkan.

Alfa amilase yang berasal dari mikroorganisme seperti bakteri, ragi dan kapang telah banyak dilaporkan dan sifat-sifatnya telah dijelaskan^{5}. Salah satu kapang yang mampu menghasilkan α -amilase dalam jumlah besar ialah *Aspergillus niger*^{6}.

Aktivitas tertinggi α -amilase dari *Aspergillus niger* hasil isolasi *citrus fruit* pada pH 6,5 dan suhu 35⁰ C^{7}. Sedangkan penelitian lain α -amilase dari *Aspergillus niger* fermentasi dalam media padat memiliki aktivitas tertinggi pada pH 5,8 dan suhu 30⁰ C^{1}. Hal ini menunjukkan kondisi optimum masing-masing enzim berbeda walaupun didapatkan dari sumber mikroba yang sama. Untuk itu, perlu dilakukan penentuan kondisi optimum enzim untuk mengoptimalkan proses reaksi enzimatis.

Pemakaian enzim dalam keadaan bebas yaitu terlarut dalam air, kurang menguntungkan karena enzim hanya dapat digunakan satu kali reaksi. Untuk keperluan industri perlu digunakan teknologi amobilisasi enzim, yaitu penempatan atau lokalisasi enzim supaya dapat dipakai kembali secara terus menerus. Teknik amobilisasi yang dipilih seharusnya memenuhi kriteria utama, yaitu tidak terjadi perubahan konformasi enzim dan tidak mengganggu gugus fungsi di pusat aktif

enzim. Metode penjebakan enzim lebih banyak digunakan karena tidak terjadi ikatan secara kimia antara enzim dengan matriks sehingga enzim tidak mengalami gangguan^{8}. *Bacto agar* merupakan jenis polisakarida yang mengandung agarosa yang memiliki kekuatan gel yang baik. *Bacto agar* stabil dalam asam dan tidak reaktif terhadap protein. Harga dari *bacto agar* relatif murah dan memiliki kemampuan yang cukup baik sebagai matriks amobilisasi^{9}.

Berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya, maka dalam penelitian ini dilakukan isolasi α -amilase dari *Aspergillus niger* FNCC 6018, pemurnian dengan amonium sulfat, dialisis, penentuan kondisi optimum enzim meliputi variasi pH dan suhu, serta amobilisasi α -amilase menggunakan metode penjebakan dengan matriks *bacto agar*, uji aktivitas, dan uji perulangannya.

II. METODE KERJA

2.1 Bahan dan Alat

2.1.1. Bahan

Biakan murni kapang *Aspergillus niger* FNCC 6018, aquades, media PDA (*Potato Dextrose Agar*), bufer asetat 0,05M pH 5, asam asetat (CH₃COOH), natrium asetat (CH₃COONa), *soluble starch*, *yeast extract*, pepton, amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄), kalsium klorida (CaCl₂), magnesium sulfat (MgSO₄), besi sulfat (FeSO₄), EDTA alkali, reagen DNS (3,5-asam dinitrosalisilat), fenol (C₆H₅OH), natrium hidroksida (NaOH), kalium natrium tartat (KNaC₄H₄O₆.4H₂O), natrium karbonat (Na₂CO₃), barium klorida (BaCl₂), BSA (*bovine serum albumin*), tembaga sulfat (CuSO₄), *folin ciocalteau*, maltosa

2.1.2 Alat

Peralatan gelas standar, autoklaf (*Prestige Medical Series 2100*), inkubator bergoyang (TS-330A), mikropipet, spektrofotometer UV-Vis (*Spectronic 20D+*), sentrifus, pengaduk magnet, neraca analitik, oven, pH meter.

2.2 Cara Kerja

2.2.1 Peremajaan *Aspergillus niger* FNCC 6018

Aspergillus niger FNCC 6018 yang berasal dari isolat murni dalam stok agar miring diambil sebanyak 1 kawat ose dan diinokulasikan pada media agar miring PDA (*potato dextrose agar*). Setelah itu dipindahkan ke dalam media fermentasi yang sudah mengandung amilosa.

2.2.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Penentuan pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* FNCC 6018 dilakukan menggunakan metode pengukuran berat kering. Data yang didapatkan adalah jumlah berat kering yang diplotkan terhadap waktu sehingga akan diperoleh grafik jumlah berat kering terhadap waktu.

2.2.3. Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim α -Amilase

Pada penelitian ini, aktivitas enzim α -amilase diukur dengan menggunakan metode Bernfeld (1995)^{9}, dimana total gula pereduksi ditentukan menggunakan reagen DNS (*3,5-dinitrosalicylic acid*). Kadar protein pada tiap-tiap fraksi diukur dengan menggunakan metode Lowry^{10}.

2.2.4 Karakterisasi Enzim α -Amilase

pH. Sebanyak 0,1 mL enzim hasil fraksinasi ditambah 1 mL substrat amilum yang telah dilarutkan dalam bufer asetat pH bervariasi 4 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6 diinkubasi pada suhu dan waktu inkubasi optimum . Hasil inkubasi ditambah dengan 1 mL larutan DNS

kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit dan didinginkan pada suhu ruang kemudian diencerkan dengan aquades hingga tepat 10 mL. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 500 nm. Setelah didapatkan pH optimum maka dilakukan variasi pH lagi dengan rentang yang lebih dekat yakni dengan rentang 0,2.

Suhu. Sebanyak 0,1 mL enzim hasil fraksinasi ditambah 1 mL substrat amilum yang telah dilarutkan dalam bufer asetat pH 5 diinkubasi pada waktu inkubasi optimum, suhu bervariasi dengan variasi 25, 30, 35, 40°C. Hasil inkubasi ditambah dengan 1 mL larutan DNS, dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit dan didinginkan pada suhu ruang kemudian diencerkan menggunakan aquades hingga tepat 10 mL. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 500 nm. Setelah didapatkan suhu optimum maka dilakukan variasi lagi dengan rentang yang lebih dekat

2.2.5. Amobilisasi enzim α -Amilase

Proses amobilisasi enzim diawali dengan mempersiapkan matriks agar bakto. Sejumlah 300 mg agar dilarutkan dalam 2 mL NaCl 25% dengan suhu panas. Kemudian campuran didinginkan sampai suhu 36°C lalu dimasukkan 0,5 mL enzim α -amilase fraksi terbaik yaitu F3. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas.

2.2.6. Uji Aktivitas Enzim Amobil

Pengukuran aktivitas α -amilase amobil dilakukan dengan metode yang sama seperti α -amilase bebas. Alfa amilase amobil dibagi 5 karena satu potongan enzim amobil setara dengan 0,1 mL α -amilase bebas. Alfa amilase amobil dipotong menjadi kotak kotak kecil sekitar 3x3x3mm³. Kemudian α -amilase amobil direaksikan dengan 1 mL substrat amilosa 1% selama waktu kontak 30 menit pada suhu 36°C. Setelah itu enzim amobil dipisahkan kembali untuk diuji

perulangannya. Hasil inkubasi ditambah dengan 1 mL larutan DNS dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 10 menit, didinginkan pada suhu ruang kemudian diencerkan dengan aquades hingga tepat 10 mL. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 500 nm. Hasil serapannya diplotkan terhadap kurva standar maltosa untuk menentukan konsentrasi maltosa hasil hidrolisis substrat amilosa dengan α -amilase.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

III.1 Kurva Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan metode berat kering yaitu dengan menghitung pertambahan massa sel dari *Aspergillus niger* FNCC 6018 selama 10 hari. *Aspergillus niger* FNCC 6018 dalam media cair diambil setiap 1 hari untuk kemudian disaring dan dikeringkan lalu ditimbang massanya. Pada gambar III.1 dibawah ini menunjukkan fase-fase pertumbuhan *Aspergillus niger* FNCC 6018.



III.1. Grafik Kurva Pertumbuhan *Aspergillus niger* FNCC 6018

Pada hari pertama merupakan fase adaptasi. Pada fase ini *Aspergillus niger* FNCC 6018 masih beradaptasi dengan nutrien di lingkungan yang baru sehingga pertumbuhan kapang belum optimal. Pada hari kedua sampai hari keenam merupakan fase eksponensial yang ditandai dengan kenaikan massa sel dari *Aspergillus niger* FNCC 6018 yang cukup besar, hal tersebut mengindikasikan bahwa pada rentang waktu tersebut *Aspergillus niger* FNCC 6018 membelah dengan sangat cepat dan tumbuh dalam kondisi optimal. Fase eksponensial yang ditandai dengan pembelahan sel secara cepat membutuhkan gula sederhana sebagai sumber energi dalam jumlah yang banyak pula, sehingga pada fase ini mikroba akan mensekresikan α -amilase, yang berperan dalam pemecahan amilosa menjadi maltosa dalam jumlah yang banyak. Hal ini yang mendasari dilakukannya masa panen pada puncak fase eksponensial. Hari ketujuh sampai dengan hari kesembilan merupakan fase stasioner. Pada fase tersebut laju pertumbuhan dan kematian sama besar sehingga jumlah massa sel relatif tetap. Pada hari ke 10 merupakan fase kematian yang terlihat dari berkurangnya massa sel. Hal ini mengindikasikan bahwa jumlah sel *Aspergillus niger* FNCC 6018 yang mati sudah banyak dikarenakan kekurangan nutrisi dan dihasilkannya metabolit yang bersifat toksik.

III.3.2 Produksi Ekstrak Kasar Alfa Amilase, Fraksinasi dengan Amonium Sulfat, dan Dialisis

Alfa amilase merupakan enzim ekstraseluler maka untuk mendapatkan enzim dilakukan sentrifugasi terhadap media fermentasi, setelah sentrifugasi, enzim akan berada didalam supernatan (filtrat). Endapan merupakan sisa komponen-komponen media dan sel *Aspergillus niger* FNCC 6018, sedangkan filtrat merupakan enzim ekstrak

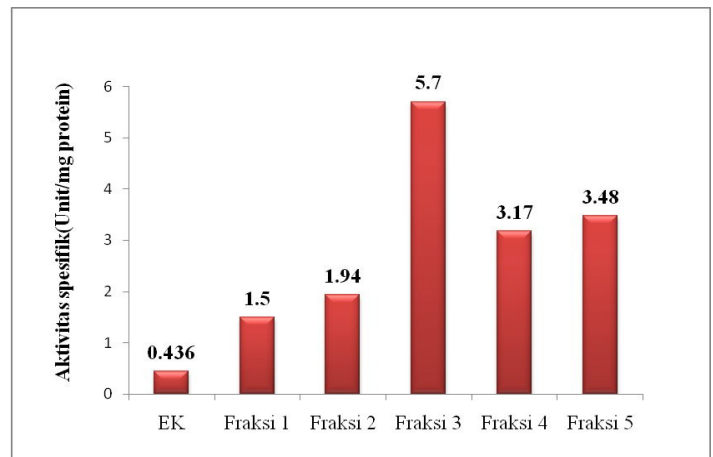
kasar yang terdiri dari protein enzim dan protein non enzim^{11}. Enzim ekstrak kasar yang diperoleh selanjutnya dilakukan pemurnian untuk mendapatkan α -amilase murni dengan proses fraksinasi bertingkat.

Fraksinasi adalah pemurnian tahap awal dengan cara pengendapan protein menggunakan garam sehingga diperoleh larutan dengan tingkat kejenuhan yang berbeda, diharapkan akan diperoleh beberapa fraksi protein.. Fraksinasi diikuti dengan sentrifugasi untuk memisahkan endapan dan filtrat. Filtrat yang diperoleh dilanjutkan untuk tahap fraksinasi selanjutnya, sedangkan endapan merupakan α -amilase yang dilarutkan dengan bufer asetat pH 5. Endapan yang diperoleh merupakan protein enzim yang perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut.

Prinsip dialisis adalah difusi, yakni terjadinya aliran zat terlarut yang melalui membran semi permeabel karena adanya perbedaan konsentrasi buffer^{12}. Dalam proses dialisis yang berperan sebagai zat terlarut adalah garam ammonium sulfat yang terlarut dalam buffer konsentrasi 0,05 M di dalam membran, buffer dengan konsentrasi yang lebih rendah yaitu 0,005 M. Protein enzim yang dihasilkan dari proses dialisis merupakan protein enzim yang terbebas dari amonium sulfat, dengan kata lain pada proses dialisis telah diperoleh enzim yang lebih murni.

III.3.3 Uji Aktivitas Spesifik α - Amilase

Aktivitas spesifik α -amilase dapat dihitung dari unit aktivitas enzim per mg protein. aktivitas spesifik menggambarkan tingkat kemurnian suatu enzim. Berikut adalah kurva masing-masing fraksi dengan nilai aktivitas spesifiknya:



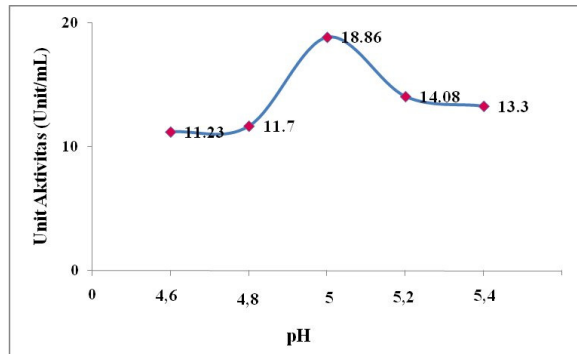
Gambar III.2. Aktivitas Spesifik α -Amilase

Berdasarkan gambar III.2 menunjukkan fraksi 3 (40-60%) memiliki aktivitas spesifik enzim tertinggi sebesar 5,7 Unit/mg protein. Hal ini mengindikasikan bahwa pada fraksi tersebut keberadaan protein enzim paling banyak dibandingkan dengan fraksi lain, sehingga fraksi ini dapat dikatakan sebagai fraksi yang paling murni dalam kelompok fraksinasi amonium sulfat.

III.3.4 Karakterisasi α - Amilase

III.3.4.1 Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum akan berpengaruh terhadap perubahan struktur tiga dimensi molekul enzim. Grafik hasil penentuan pH optimum disajikan pada gambar III.3:

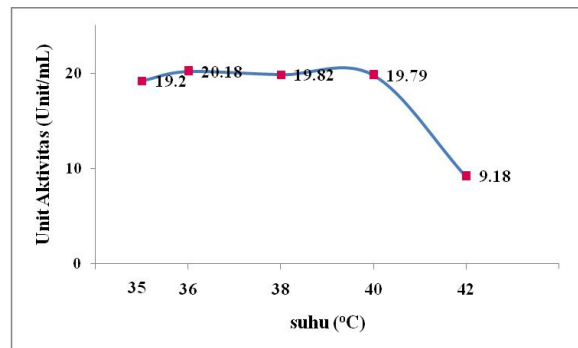


Gambar III.3. Grafik Penentuan pH Optimum α -Amilase

Pada gambar menunjukkan bahwa aktivitas α -amilase mengalami peningkatan sampai pada pH 5 (pH optimum) dengan unit aktivitas sebesar 18,86 Unit/mL kemudian mulai menurun pada pH 5,2 dan pH 5,4. Pada nilai pH rendah enzim mengalami protonasi dan kehilangan muatan negatifnya. Hal yang sama pada pH tinggi substrat akan terionisasi dan kehilangan muatan positifnya. Perubahan pH yang ekstrim akan menyebabkan enzim mengalami denaturasi karena terganggunya interaksi-interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur tiga dimensi enzim^{13}.

III.3.4.2. Penentuan Suhu Optimum

Dalam reaksi enzimatik, suhu berperan dalam meningkatkan interaksi antara substrat dengan enzim. Aktivitas α -amilase mengalami peningkatan pada suhu 36^oC (suhu optimum) dengan unit aktivitas sebesar 20,18 Unit/mL. Berikut adalah grafik unit aktivitas terhadap variasi perubahan suhu :



Gambar III.4. Grafik Penentuan Suhu Optimum α -Amilase

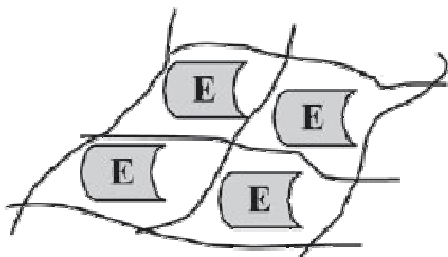
Ketika suhu 35^oC aktivitas enzim tidak tinggi, disebabkan tidak semua substrat berikatan dengan sisi aktif enzim. Saat bertambah sampai suhu optimum yaitu 36^oC, kecepatan reaksi enzim naik karena energi kinetik bertambah. Hal ini memperbesar peluang enzim dan substrat bereaksi untuk menghasilkan produk yang maksimal. Adanya perubahan suhu juga akan mempengaruhi ikatan hidrogen atau interaksi hidrofobik yang berperan dalam menjaga konformasi molekul enzim. Perubahan konformasi akan mempengaruhi sisi aktif dari enzim, kondisi panas tertentu menyebabkan ikatan hidrogen tersebut akan putus. Putusnya satu ikatan hidrogen akan menyebabkan mudahnya pemutusan ikatan hidrogen selanjutnya dalam rantai polipeptida tersebut, sehingga protein enzim mengalami denaturasi.

IV.5. Amobilisasi Enzim dengan Matriks *Bacto Agar*

Pada penelitian ini α -amilase fraksi ketiga yang merupakan fraksi amonium sulfat dengan aktivitas spesifik tertinggi diamobilisasi menggunakan metode pengebakan dengan matriks *bacto agar*. *Bacto agar* merupakan jenis polisakarida yang mengandung agarosa yang memiliki kekuatan gel yang baik. *Bacto agar* stabil dalam asam dan tidak reaktif terhadap protein. Harga dari

bacto agar relatif murah dan memiliki kemampuan yang cukup baik sebagai matriks amobilisasi^{14}.

Pada metode penjebakan, enzim terperangkap dalam kerangka polimer, tetapi substrat dan produk masih bisa melewati pori-pori dari polimer yang ada^{15}. Enzim tetap berada dalam bentuk aslinya tanpa adanya resiko penutupan bagian aktif. Hal ini karena dengan metode ini tidak terjadi pengikatan secara kimia antara enzim dengan matriks. Berikut ialah gambar penjebakan enzim dengan matriks *bacto agar*:



Gambar III.5 Penjebakan enzim dalam matriks *bacto agar*^{16}.

Hasil uji aktivitas α -amilase yang diamobilisasi dengan matriks *bacto agar* disajikan pada tabel III.1 :

Tabel III.1 Data aktivitas α -amilase teramobilisasi dengan matriks *bacto agar* dan uji perulangan

	Aktivitas spesifik (Unit/mg protein)	Persen penurunan aktivitas (%)
Alfa amilase amobil Pemakaian pertama	1,95	-
Alfa amilase amobil Pemakaian kedua	1,66	15,19
Alfa amilase amobil Pemakaian ketiga	1,08	44,83

Berdasarkan tabel III.1. aktivitas α -amilase teramobilisasi dengan matriks *bacto agar* dapat digunakan sampai dengan dua kali

perulangan. Pada perulangan pertama terjadi penurunan aktivitas sebesar 15,19%. Pada perulangan kedua terjadi penurunan aktivitas sebesar 44,83%. Penurunan aktivitas disebabkan substrat atau produk keluar masuk melalui pori-pori matriks *bacto agar*. Matriks *bacto agar* mempunyai berat molekul yang tinggi sehingga mengganggu interaksi substrat amilosa dengan enzim α -amilase^{11}.

Memungkinkan terjadi pelepasan α -amilase dari matriks *bacto agar* selama pemakaian. Semakin lama digunakan, jumlah enzim dalam matriks semakin berkurang. Karena dengan metode ini tidak terjadi pengikatan secara kimia antara enzim dengan matriks sehingga enzim mudah terlepas. Pada proses amobilisasi dilakukan pemanasan, dimana suhu tinggi dapat menyebabkan putusya ikatan hidrogen pada asam amino sisi aktif enzim. Putusnya satu ikatan hidrogen akan menyebabkan mudahnya pemutusan ikatan hidrogen selanjutnya dalam rantai polipeptida, sehingga protein enzim mengalami denaturasi.

IV. KESIMPULAN

1. Alfa amilase diperoleh dari isolat kapang *Aspergillus niger* FNCC 6018, fraksi 3 amonium sulfat (40-60%) memiliki aktivitas spesifik tertinggi sebesar 5,7 Unit/mg protein.
2. Kondisi optimum kerja α -amilase dari *Aspergillus niger* FNCC 6018 dicapai pada pH 5,0 dan suhu 36 °C.
3. Alfa amilase teramobilisasi pada matriks *bacto agar* memiliki aktivitas spesifik sebesar 1,95 Unit/mg protein dan digunakan sampai dua kali perulangan.

V. DAFTAR PUSTAKA

1. Alva S, Anupama J, Salva J, Chiu Y.Y., Vyshali P, Shruthi M., Yogeetha B. S, Bhavya D., Purvi J., Ruchi K., Kumudini B.S. and Varalakshmi K.N., 2007, *Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from Aspergillus sp. JGI 12 in solid state culture*, African journal of Biotechnology 6: 576 – 581.
2. Aiyer PV. 2005. Amylases and their applications, African Journal of Biotechnology.4: 125–1529.
3. Mitidieri S., S.A.H. Martinelli, S. Augusto dan H.V. Marilene, 2006, *Enzymatic Detergent formulation containing amylase from Aspergillus niger: A comparative study with commercial detergent formulations*, Boiresour. Technol. 97 (10): 1217-1224.
4. Souza P.M., Magalhaes P.O., 2010, *Application of microbial α -amylase in industry- a review*, Brazilian Journal of Microbiology, 41: 850-86
5. Gupta R., Paresh G., Harapriya M., Vineet K. G., dan Bhavna C., 2003, *Microbial α -Amylases : a biotechnological perspective*, Process Biochemistry 38:1599-1616
6. Abu E.A., Ado S.A., James D.B., 2005, *Raw starch degrading amylase production by mixed culture of Aspergillus niger and Saccharomyces cerevisiae grown on Sorghum pomace*, Afr. J. Biotechnol; 4; 785 – 790.
7. Adejuwon, A.O., 2010, *Synthetic Production of Amylase from Aspergillus Niger Isolated from Citrus Fruit*, African Journal of Basic and Applied Sciences 2 (5-6): 158-160
8. Mubarik,N.R., 2001, *Imobilisasi Protease Bacillus subtilis ATCC 6633 Menggunakan Matriks Gel Poliakrilamida*, ISSN 0854-8587, 11-14.
9. Bernfeld, P., 1955, *Amylases α and β* , Dalam Colowick, S.P. and N.O. Kaplan (Eds), *Methods in Enzymology and Related of Biochemistry*. Academic Press, New York
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and P.J. Randall, 1951, *Protein measurement with the folin phenol reagent*, J. Biological Chemistry, 193: 265-275.
11. Volk, W.A., dan Wheeler, M.F., 1993, *Mikrobiologi Dasar*, Jilid 1, Edisi ke-5, 85-90, Erlangga.
12. Voet, D., dan Voet, J.G., 1995, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York.
13. Hames, D., dan Hooper, N., 2005, *Biochemistry*, Third Edition, 64-65, Taylor and Francis Group.
14. Prakash, O., dan Jaiswal, N., 2011, *Immobilization of a Thermostable Amylase on Agarose and Agar Matrices and Its Application in Starch Stain Removal*, World Applied Sciences Journal 13 (3), 572-577.
15. Belitz, H.D., dan Grosch, W., 1999, *Food Chemistry*, Springer, Verlag, Berlin
16. Sheldon, R.A., 2007, *Enzyme Immobilization*, Dep. Biotechnology. DOI: 10.1002/adsc.200700082

Mengetahui,

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Wuryanti, M.Si
NIP. 1957 05 11 1987 03 2 001

Dra. Taslimah, M.Si
NIP. 1956 07 09 1987 03 2 001