

ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN AMOBILISASI α -AMILASE DARI *Aspergillus oryzae* FNCC 6004

Dwi Jayanti, Wuryanti, Taslimah
Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Universitas Diponegoro
djeuwie@yahoo.com

ABSTRAK

Isolasi, karakterisasi, dan amobilisasi α -amilase dari *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 dilakukan untuk mendapatkan α -amilase yang diisolasi dari *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 dengan aktivitas spesifik tertinggi, mendapatkan data karakteristik α -amilase hasil isolasi yang meliputi suhu dan pH optimum, memperoleh α -amilase amobil, aktivitas α -amilase amobil, dan uji perulangan α -amilase amobil dari *Aspergillus oryzae* FNCC 6004. Alfa amilase yang berhasil diisolasi kemudian dilakukan pengukuran aktivitas spesifik sebelum amobilisasi dan dilakukan karakterisasi yang meliputi penentuan suhu optimum dan pH optimum serta dilakukan amobilisasi menggunakan matriks *bacto agar*. Aktivitas spesifik α -amilase sebelum diamobilisasi sebesar 3,26 Unit/mg protein. Hasil karakterisasi α -amilase menunjukkan suhu optimum sebesar 36 °C dan pH optimum 4,5. Aktivitas α -amilase setelah diamobilisasi mengalami penurunan sebesar 17,91 %, yaitu dari 6,81 Unit menjadi 5,59 Unit dengan uji perulangan sampai 2 kali.

Kata kunci: *Aspergillus oryzae*, α -amilase, karakterisasi, dan amobilisasi.

ABSTRACT

Isolation, characterization, and immobilization of α -amylase from *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 done to obtain α -amylase was isolated from *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 with the highest specific activity, get the data characteristics of α -amylase results isolation which include temperature and pH optimum, to get immobilized α -amylase, the activity of immobilized α -amylase, and recurrence test of immobilized α -amylase of *Aspergillus oryzae* FNCC 6004. Alpha amylase that successfully isolated a specific activity measurements subsequently before immobilization and carried out characterization that includes the determination of the optimum temperature and optimum pH and done immobilization using *bacto agar* matrix. The specific activity of α -amylase before immobilized of 3.26 Unit/mg of protein. The results of the characterization of α -amylase shows a optimum temperature of 40 °C and optimum pH 4.5. The activity of immobilized α -amylase after experiencing a decrease of 17.91 %, it that is from 6.81 Unit became 5.56 Unit with two times recurrence test.

Key words: *Aspergillus oryzae*, α -amylase, characterization, and amobilisasi.

1. PENDAHULUAN

Alfa amilase (α -1,4-glucan-glucanohydrolase) adalah enzim ekstraseluler yang menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik secara acak pada rantai amilosa dan membentuk unit maltosa

Enzim tersebut memecah pati secara acak pada ikatan α -1,4-glikosida, akan tetapi tidak memberikan efek terhadap ikatan α -1,6-glikosida yang terdapat pada struktur amilopektin [7]. Alfa amilase banyak

digunakan dalam industri seperti industri gula, industri bir, dan monosodium glutamat [1]. Penggunaan α -amilase yang cukup besar pada bidang industri menjadi alasan untuk eksplorasi sumber α -amilase yang lebih efisien.

Alfa amilase dapat diisolasi dari hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Mikroorganisme dinilai lebih ekonomis, karena dapat menghasilkan enzim

dalam waktu yang pendek, tidak bergantung musim dan kondisi reaksi seperti pH dan temperatur mudah diatur [3]. Mikroorganisme yang banyak digunakan untuk menghasilkan α -amilase adalah jamur dan bakteri. Jamur banyak digunakan sebagai penghasil α -amilase karena mempunyai kelebihan diantaranya α -amilase yang dihasilkan dari jamur lebih stabil jika dibandingkan dengan α -amilase yang dihasilkan dari bakteri sehingga lebih menguntungkan jika digunakan untuk kepentingan industri [8]. Jamur yang banyak digunakan sebagai penghasil α -amilase adalah kelompok *Aspergillus*. Salah satu spesies *Aspergillus* yang berpotensi menghasilkan α -amilase adalah *Aspergillus oryzae* [6].

Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi α -amilase dari *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 pada substrat amilosa. Alfa amilase yang diperoleh dilakukan karakterisasi yang meliputi penentuan suhu optimum dan pH optimum, hal ini dikarenakan mekanisme kerja α -amilase sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti suhu dan pH untuk mengoptimalkan proses reaksinya.

Penggunaan enzim pada bidang industri memiliki kelemahan karena hanya dapat digunakan satu kali. Hal ini disebabkan karena enzim sulit untuk dipisahkan dari campuran produk. Kondisi ini mengakibatkan penggunaan enzim tidak efisien dan membutuhkan biaya yang besar, sehingga dibutuhkan suatu metode agar enzim dapat digunakan secara berulang. Salah satu metode yang umum digunakan adalah amobilisasi enzim. Pada penelitian ini

akan dilakukan amobilisasi α -amilase dengan metode penjerapan pada matriks *bacto agar*. Amobilisasi dilakukan dengan menggunakan matriks *bacto agar* karena matriks *bacto agar* dapat menjerap α -amilase, dimana tidak terjadi ikatan kimia dan reaksi antara enzim yang diamobilisasi dengan matriksnya sehingga tidak akan mempengaruhi konformasi α -amilase yang diamobilisasi [4].

2. METODOLOGI

2.1 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: alat-alat gelas laboratorium kimia, lampu spiritus, autoklaf, penangas air, inkubator, mikropipet, spektrofotometer *UV-Vis*, sentrifus, membran selofan, *magnetic stirrer*, *shaker*, oven, pH meter, blender, kasa, kapas, kawat ose, dan kompor listrik.

Bahan yang digunakan adalah biakan murni *Aspergillus oryzae*, *PDA (Potato Dextrose Agar)*, amilosa, bufer asetat, *yeast*, pepton, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , MgSO_4 , *DNS (3,5-dinitrosalisilic acid)*, FeSO_4 , NaOH , Fenol, Kalium natrium tartat, Na_2SO_3 , EDTA alkali, Na_2CO_3 , BaCl_2 , *BSA (Bovine Serum Albumin)*, CuSO_4 , NaCl , *folin ciocalteau*, maltosa, iodin, *bacto agar*.

2.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat dari kaca dibungkus menggunakan aluminium foil dan plastik lalu diautoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 20 menit, termasuk dalam hal ini media cair untuk produksi α -amilase.

2.3 Peremajaan *Aspergillus oryzae* FNCC 6004

Aspergillus oryzae FNCC 6004 yang berasal dari isolat murni diambil sebanyak satu kawat ose dan diinokulasikan pada media agar miring PDA (*potato dextro agar*) secara berulang sampai tiga kali. Setelah itu dilakukan pemindahan inokulum pada erlenmeyer yang berisi media fermentasi cair secara aseptik. Media fermentasi tersebut kemudian diinkubasi pada *incubator shaker*.

Tabel 1: Komposisi media fermentasi [10]

Komposisi	Jumlah (g/L)
<i>Yeast extract</i>	30
Pepton	20
(amilosa)	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
CaCl ₂	2,0
MgSO ₄	0,5
FeSO ₄	0,1
Bufer asetat	Sampai 1000 mL

2.4 Penentuan Kurva Pertumbuhan *Aspergillus oryzae* FNCC 6004

Sebanyak 13 buah tabung masing-masing diisi dengan 50 mL media fermentasi dalam bufer asetat pH 5 kemudian disterilisasi. Sebanyak 12 buah tabung masing-masing ditambahkan 1 mL inokulum kapang *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 secara aseptik dan satu buah yang lain dijadikan sebagai kontrol. Kemudian 13 tabung tersebut diinkubasi menggunakan *incubator shaker* pada suhu ruang. Selanjutnya sampel diambil tiap 24 jam sekali selama kurun waktu 288 jam (9 hari) untuk diukur berat keringnya.

2.5 Produksi α -amilase

Sebanyak 1 mL inokulum *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 hasil peremajaan dipindahkan secara aseptik kedalam media fermentasi dengan volume 100 mL sebagai starter. Sebanyak 5 mL starter *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 dipindahkan secara aseptik kedalam media fermentasi dengan volume 500 mL sebagai kultur produksi. Media fermentasi ini diinkubasi selama sembilan hari sesuai dengan kurva pertumbuhan. Setelah itu, media pertumbuhan tersebut disaring dengan kertas saring lalu disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan filtrat dan endapan.

2.6 Fraksinasi Enzim dengan Amonium Sulfat

Kedalam larutan ekstrak kasar enzim ditambahkan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-20% dikelompokkan menjadi fraksi 1 (F1), 20-40% fraksi 2 (F2), 40-60% fraksi 3 (F3), 60-80% fraksi 4 (F4) dan 80-100% fraksi 5 (F5). Selanjutnya endapan dibiarkan selama satu malam untuk mencapai kesetimbangannya, kemudian disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Hasil sentrifugasi akan terpisah antara filtrat dan endapan. Filtrat yang diperoleh dilanjutkan untuk tahap fraksinasi selanjutnya, sedangkan endapannya dilarutkan dengan bufer asetat 0,05 M pH 5.

2.7 Dialisis Enzim Hasil Fraksinasi

Proses dialisis dilakukan dengan memasukkan masing-masing fraksi kedalam membran selofan dan

merendamnya dalam bufer asetat 0,005 M dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 5 °C. Bufer asetat diganti tiap dua jam sekali hingga tidak ada amonium sulfat yang tersisa. Pengujian adanya amonium sulfat dalam bufer dilakukan dengan menambahkan larutan BaCl₂.

2.8 Penentuan Aktivitas α -amilase

Penentuan aktivitas α -amilase

diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum larutan standar maltosa dan penentuan kurva standar maltosa. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan mereaksikan 1 mL maltosa 0,2 mg/mL dengan reagensia *DNS* dan diukur serapannya dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada rentang panjang gelombang 400-600 nm. Penentuan kurva standar maltosa dilakukan serupa dengan penentuan panjang gelombang maksimum dimana pada penentuan kurva standar dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi dari 0,2-0,5 mg/mL dengan rentang konsentrasi 0,05 mg/mL dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum. Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan mereaksikan 0,1 mL enzim dengan 1 mL amilosa dan diinkubasi selama 30 menit. Hasil inkubasi ditambahkan dengan 1 mL larutan *DNS* dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum.

2.9 Penentuan Kadar protein

Penentuan kadar protein diawali dengan penentuan panjang gelombang larutan standar *BSA* dan pembuatan kurva standar *BSA*. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan standar *BSA* dilakukan dengan membuat larutan

BSA 2,00 mg/mL dan direaksikan dengan reagensia Lowry kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada rentang panjang gelombang 600-800 nm. Pembuatan kurva standar *BSA* dilakukan serupa dengan penentuan panjang gelombang maksimum dimana pembuatan kurva standar dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi larutan *BSA* antara 2,00-4,25 mg/mL dengan rentang 0,25 mg/mL dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum. Penentuan kadar protein dilakukan dengan mereaksikan 0,1 mL enzim dengan reagensia Lowry dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum.

2.10 Karakterisasi α -Amilase

Karakterisasi α -amilase meliputi penentuan suhu dan pH optimum. Penentuan suhu optimum dilakukan dengan mereaksikan 0,1 mL enzim α -amilase terhadap 1 mL amilosa pada pH 5 dan waktu inkubasi 20 menit dengan membuat variasi suhu antara 20 °C sampai 40 °C dengan rentang 5 °C. Hasil inkubasi tersebut ditambah dengan 1 mL larutan *DNS* dan diukur serapannya untuk mengetahui unit aktivitas tertinggi antara rentang tersebut. Perlakuan ini diulang terhadap suhu yang memberikan unit aktivitas tertinggi dengan rentang yang lebih kecil, yaitu rentang (2 °C). Hal serupa dilakukan terhadap penentuan pH optimum dimana rentang pH yang digunakan adalah 4,0-6,0 dengan interval 0,5 dan diteruskan terhadap pH yang memberikan hasil uji unit aktivitas tertinggi dengan interval 0,2.

2.11 Amobilisasi α -amilase

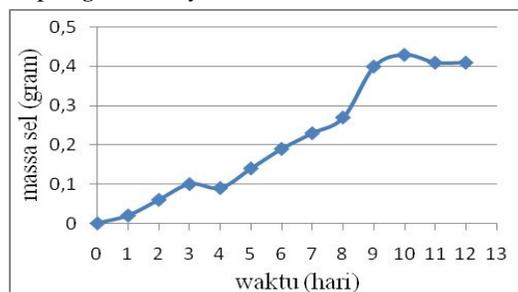
Sebanyak 300 mg *bacto agar* dilarutkan kedalam 2 mL NaCl 25% pada suhu 70 °C kemudian didinginkan sampai suhu 36 °C lalu dimasukkan 0,5 mL α -amilase dari fraksi IV amonium sulfat (kejenuhan 60-80%), diaduk hingga homogen, didinginkan pada suhu kamar, dicuci dengan aquades dan dipotong. Enzim tersebut kemudian diuji aktivitasnya.

3. HASIL

3.1 Pembuatan kuva pertumbuhan

Aspergillus oryzae FNCC 6004

Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui tahap-tahap pertumbuhan mikroorganisme sehingga akan diketahui waktu panen paling tepat untuk proses fermentasi. Kurva pertumbuhan dibuat berdasarkan berat kering sel karena jamur *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 tidak homogen dalam medium pertumbuhannya. Pengukuran berat kering *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 dilakukan setiap 24 jam dimana media tumbuh disaring, dikeringkan dengan oven dan desikator secara berulang sampai massanya tetap kemudian ditimbang massanya. Gambar I. berikut merupakan fase pertumbuhan. *Aspergillus oryzae* FNCC 6004.



Gambar I. Kurva pertumbuhan dari *Aspergillus oryzae* FNCC 6004

Berdasarkan kurva tersebut, hari pertama merupakan fase adaptasi. Hari kesembilan merupakan fase eksponensial yang ditandai dengan kenaikan massa sel dari *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 secara signifikan, hal tersebut mengindikasikan bahwa pada range waktu tersebut *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 membelah dengan cepat. 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 gula sederhana seperti maltosa dalam jumlah yang banyak. Hal ini yang mendasari dilakukannya massa panen pada fase eksponensial yang berada pada hari kesembilan. Hari ke 10 sampai hari ke 12 merupakan fase stasioner.

3.2 Produksi α -amilase

Produksi α -amilase diawali dengan membuat *starter*. 5 mL *starter Aspergillus oryzae* FNCC 6004 diambil dan diinokulasikan kedalam media fermentasi dengan volume 500 mL. Selanjutnya media fermentasi tersebut diinkubasi selama sembilan hari sesuai dengan data kurva pertumbuhan dimana *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 mencapai puncak fase eksponensial pada hari kesembilan, kemudian media fermentasi tersebut disaring dengan kertas saring untuk memisahkan massa selnya. Filtrat hasil saringan dilanjutkan dengan sentrifugasi untuk memisahkan spora atau sel mikroba yang lolos pada saat penyaringan. Filtrat yang diperoleh

dari hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kasar α -amilase ekstraseluler.

3.3 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Ekstrak kasar α -amilase diendapkan dengan menambahkan garam amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan. Pengendapan dengan garam akan terjadi kompetisi antara garam dan protein dalam memperebutkan air. Garam akan mengikat air, sehingga protein akan mengendap. Pada proses fraksinasi, terjadi penurunan kelarutan protein akibat naiknya konsentrasi garam, peristiwa ini disebut *salting out* [5]. Amonium sulfat banyak digunakan untuk mengendapkan protein karena kelarutannya tinggi, harga murah, dan umumnya tidak mempengaruhi struktur protein [9].

3.4 Dialisis

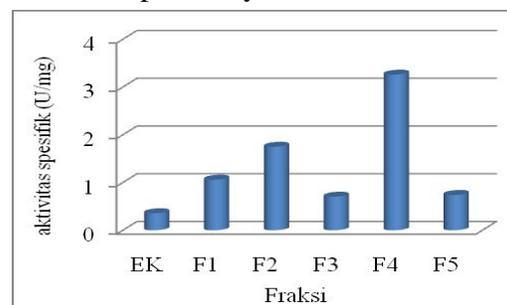
Proses dialisis dalam penelitian ini dilakukan untuk membebaskan protein dari garam amonium sulfat. Prinsip dialisis adalah difusi, yakni terjadinya aliran zat terlarut dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah yang melalui membran semi permeabel. Proses difusi ini akan mencapai kesetimbangan saat laju aliran amonium sulfat keluar membran sama dengan laju kembalinya amonium sulfat kedalam membran. Saat mencapai kestimbangan, bufer yang digunakan sebagai pelarut harus diganti agar proses dialisis tetap berjalan sampai semua amonium sulfat yang ada dalam suspensi protein dapat keluar. Identifikasi bebasnya amonium sulfat dilakukan dengan menambahkan larutan BaCl_2 ke dalam bufer yang digunakan. Proses ini dihentikan sampai tidak

terbentuk endapan putih pada saat penambahan BaCl_2 .

3.5 Uji Aktivitas α -amilase

Aktivitas α -amilase diukur dengan menggunakan metode Bernfeld [2], dimana total gula pereduksi ditentukan dengan menggunakan reagen *DNS* (3,5-dinitrosalicylic acid). Aktivitas enzim didasarkan perhitungan pada kurva standar maltosa dan kurva standar protein.

Fraksi dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi merupakan fraksi dengan jumlah enzim paling banyak dibandingkan fraksi lain, sehingga kemungkinan menemukan enzim lebih besar dimana aktivitas spesifik merupakan rasio antara unit aktivitas enzim dengan total protein dalam miligram. Hal ini berarti aktivitas spesifik menggambarkan tingkat kemurnian suatu enzim. Unit aktivitas dalam penelitian ini didefinisikan sebagai kemampuan α -amilase untuk menghidrolisis amilosa menjadi maltosa sebanyak 1 mg. Berikut adalah diagram masing-masing fraksi dengan nilai aktivitas spesifiknya.



Gambar II. Diagram aktivitas spesifik tiap fraksi

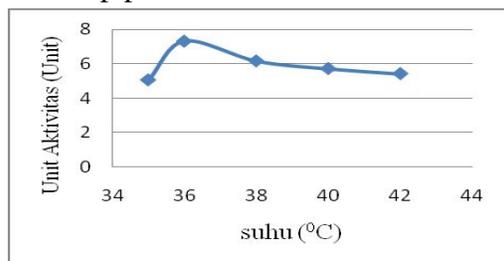
Berdasarkan diagram diatas, maka fraksi keempat merupakan fraksi dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi sebesar 3,26 Unit/mg protein. Hal tersebut

mengindikasikan bahwa pada fraksi tersebut keberadaan protein enzim paling banyak dibandingkan dengan fraksi lain. Tahap selanjutnya fraksi tersebut akan diteruskan untuk karakterisasi dan amobilisasi.

3.6 Karakterisasi α -amilase

Penentuan Suhu Optimum

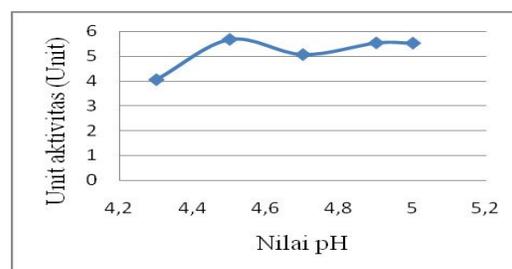
Suhu berperan dalam meningkatkan interaksi antara substrat dengan enzim dalam suatu reaksi enzimatik. Aktivitas α -amilase mengalami peningkatan sampai suhu 36 °C (suhu optimum) dengan unit aktivitas sebesar 7,33 Unit/mL. Kenaikan aktivitas enzim di bawah suhu optimum disebabkan karena kenaikan energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi, namun jika suhu tetap dinaikkan terus, energi kinetik molekul-molekul enzim menjadi besar sehingga memecahkan ikatan-ikatan yang mempertahankan enzim dalam bentuk aslinya dan akibatnya enzim mengalami denaturasi. Adanya perubahan suhu akan mempengaruhi ikatan hidrogen atau interaksi hidrofobik yang berperan dalam menjaga konformasi molekul enzim [11]. Berikut adalah grafik unit aktivitas terhadap perubahan suhu.



Gambar III. Suhu optimum α -amilase dalam menghidrolisis substrat amilosa menjadi maltosa.

Penentuan pH Optimum

Kondisi pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim, dimana aktivitas α -amilase mengalami peningkatan pada pH 4,5 (pH optimum) dengan unit aktivitas sebesar 5,67 Unit/mL. Perubahan pH mempengaruhi muatan total protein enzim yang dapat mempengaruhi aktivitasnya, baik dengan perubahan struktur maupun dengan perubahan muatan pada residu asam amino yang berfungsi mengikat substrat. Berikut adalah grafik unit aktivitas terhadap perubahan pH.



Gambar IV. Nilai pH optimum α -amilase dalam menghidrolisis substrat amilosa menjadi maltosa

3.7 Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim mencegah difusi enzim ke dalam campuran reaksi sehingga enzim mudah diperoleh kembali dan dapat digunakan kembali. Pada penelitian dilakukan amobilisasi α -amilase dengan metode penjerapan pada matriks *bacto agar*. Amobilisasi dilakukan dengan menggunakan matriks *bacto agar* karena matriks *bacto agar* dapat menyerap α -amilase, dimana tidak terjadi ikatan kimia dan reaksi antara enzim yang diamobilisasi dengan matriksnya sehingga tidak akan mempengaruhi konformasi α -amilase yang diamobilisasi [4].

Pada proses amobilisasi menggunakan matriks *bacto agar* mengalami penurunan aktivitas sebesar 17,91 %, yaitu dari 6,81 Unit menjadi 5,59 Unit dengan uji perulangan sampai 2 kali. Uji perulangan tersebut hanya dapat dilakukan sampai dua kali karena pada uji perulangan ke dua, persen penurunannya sudah mencapai 50,95 % dengan unit aktivitas sebesar 3,34 Unit/mL sehingga kurang efektif jika diteruskan untuk uji perulangan selanjutnya. Hal ini disebabkan enzim terperap dalam matrik sehingga untuk bereaksi dengan substrat, enzim terhalang oleh matrik. Penurunan aktivitas pada proses amobilisasi tersebut juga dikarenakan tidak adanya pengikatan secara kimia antara enzim dengan matriks *bacto agar* sehingga enzim mudah lepas dan keluar bersama produk yang terbentuk.

4. KESIMPULAN

Alfa amilase telah diisolasi dari *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 dengan aktivitas spesifik tertinggi pada fraksi IV amonium sulfat (kejenuhan 60-80%) sebesar 3,26 Unit/mg protein. Kondisi optimum kerja α -amilase dicapai pada suhu 36 °C, dan pH 4,5. Hasil amobilisasi α -amilase sebelum diamobil dan sesudah diamobil menggunakan matriks *bacto agar* mengalami penurunan aktivitas sebesar 17,91 %, yaitu dari 6,81 Unit menjadi 5,59 Unit dengan uji perulangan sampai 2 kali.

5. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Afifi A.F., Kamel E.M., Khalil A.A., Foad M.A., Fawzi E.M., dan Houseny M.M., 2008, *Purification and Characterization of α -amylase from Penicillium olsonii under the Effect of Some Antioxidant Vitamins*, Global Journal of Biotechnology and Biochemistry 3 (1): 14-21.
- [2] 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.
- [3] Harsono Y., 2001, *Pemurnian enzim α -amilase dengan Menggunakan Filtrasi Gel*, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 7-9.
- [4] Prakash, O., dan Jaiswal, N., 2011, *Immobilization of a Thermostable Amylase on Agarose and Agar Matrices and its Application in Starch Strain Removal*, *World Applied Sciences Journal*, 13 (3), 572-577.
- [5] Scopes, R.K., 1993, *Protein Purification: Principles and Practice 3rd edition*, Springer, Boston, USA, 71-100.
- [6] Sivaramarishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., dan Pandey, A., 2007, *Alpha amylase production by Aspergillus oryzae employing solid-state fermentation*, *J SCI IND RES* volume 66, 621-626
- [7] Sobreira A.G., Nascimento R.S., Taborda M.L., CunhaMorales A.A., Pepe deMoraes L., Araripe F.G.T., SoniaMaria dan Jos'e C.U., 2011, *Biochemical And Structural Characterization Of Amy1: An Alpha-Amylase Fromcryptococcus Flavus Expressed In Saccharomyces Cerevisiae*, SAGE-Hindawi access to research, enzyme research, volume 2011, Article ID 157294, 2-5.

- [8] Suganthi, R., Benazir, J.F., Santhi R., Kumar R.V., Hari A., Meenakshi N., Nidhiya K.A., Kavitha G., dan Lakshmi R., 2011, *Amylase Production by Aspergillus niger under Solid State Fermentation Using Agroindustrial Wastes*, International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST), 1736-1739.
- [9] Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. 172-220.
- [10] Ul-Haq-Ikram, Abdullah Roheena, Ashraf Hamad dan Hussain Athar Shah, 2002, *Isolation and Screening of Fungi for Biosynthesis of Alpha Amilase*, Biotechnology, Volume 1 Number 2-4, 61-66.
- [11] Wijaya, Rudi, 2005, *Karakteristik Enzim Serupa Tripsin dari Cacing Tanah*, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 24-39.

Pembimbing I

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

Pembimbing II

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