

Storage Stability Analysis of Crude Amylase Extract from Banana Peel by Solid State Fermentation

Nurul Wakiah^{1*}, Ummu Farah Fadillah¹, Sudirman¹, Riskawati²

¹Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Sulawesi Barat, Majene, Indonesia;

²Teknik Industri Agro, Politeknik ATI Makassar, Makassar, Indonesia

Article History

Received : July 28th, 2025

Revised : July 29th, 2025

Accepted : July 31th, 2025

*Corresponding Author: **Nurul Wakiah**, Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Sulawesi Barat, Majene, Indonesia;
Email: nurulwakiah@unsulbar.ac.id

Abstract: Banana peel is a carbohydrate-rich by-product with potential as a fermentation substrate for enzyme production. This study aimed to evaluate the amylase production and storage stability of enzymes obtained through solid-state fermentation (SSF) of banana peel flour using *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Fermentation was conducted for 24 and 48 hours, followed by crude enzyme extraction and storage for 24 hours at room temperature. Proximate analysis revealed banana peel flour contained 78.64% carbohydrates and 46.24% starch, supporting its suitability as a fermentation medium. The highest amylase activities were 50.36 IU/mL/min (*B. subtilis*) and 56.33 IU/mL/min (*B. licheniformis*) after 24 hours, with comparable values at 48 hours. However, enzyme activity declined by over 78% after 24 hours of storage, indicating low stability at room temperature. These findings confirm that banana peel flour is an effective, low-cost substrate for amylase production via SSF. Nevertheless, stabilization strategies post-fermentation are crucial to preserve enzyme activity during storage. This study highlights the dual benefit of converting agricultural waste into valuable enzymes and supports further research on improving enzyme shelf-life for industrial applications.

Keywords: Amylase, Enzyme stability, Waste valorization.

Pendahuluan

Permintaan terhadap enzim amilase terus meningkat seiring berkembangnya industri pangan, tekstil, deterjen, dan bioetanol (Patil et al., 2022; Paul et al., 2021). Amilase merupakan salah satu enzim hidrolitik penting yang berfungsi mengkatalisis pemutusan ikatan glikosidik pada pati, menghasilkan produk seperti glukosa, maltosa, dan dekstrin (Paul et al., 2021). Produksi amilase secara konvensional umumnya menggunakan substrat mahal dan proses fermentasi cair (*submerged fermentation*), yang membutuhkan kontrol kondisi yang ketat dan biaya operasional tinggi (Farooq et al., 2021).

Salah satu pendekatan alternatif yang lebih ekonomis dan ramah lingkungan adalah fermentasi padat (*solid state fermentation/SSF*), yang memanfaatkan limbah lignoselulosa sebagai substrat (Nuraida

et al., 2022). Kulit pisang, sebagai limbah agroindustri yang melimpah dan belum dimanfaatkan secara optimal, memiliki potensi besar sebagai substrat SSF karena kandungan karbohidrat dan nutrisi pendukung pertumbuhan mikroba penghasil enzim. Pemanfaatan kulit pisang dalam produksi amilase tidak hanya mengurangi beban limbah organik, tetapi juga mendukung prinsip ekonomi sirkular (Naik et al., 2023).

Namun, dalam aplikasi industri, stabilitas enzim selama penyimpanan menjadi faktor penting yang menentukan efektivitas dan efisiensi penggunaannya (Mishra et al., 2022). Ekstrak kasar enzim (*crude enzyme extract*), meskipun murah dan mudah diperoleh, rentan mengalami penurunan aktivitas. Hal ini disebabkan oleh faktor-faktor lingkungan seperti suhu, kelembapan, dan waktu simpan (Akinfemiwa et al., 2023).

Penelitian mengenai produksi amilase

dari kulit pisang telah dikembangkan, namun data mengenai kestabilan amilase terutama pada penyimpanan suhu ruang masih sangat terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kestabilan penyimpanan ekstrak kasar amilase yang dihasilkan melalui fermentasi padat kulit pisang. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi praktis mengenai ketahanan enzim selama penyimpanan suhu ruang serta memperkuat potensi pemanfaatan limbah kulit pisang sebagai sumber enzim yang aplikatif dan berkelanjutan.

Bahan dan Metode

Alat dan bahan

Bahan baku yang digunakan adalah pisang. Produksi produksi di laboratorium menggunakan bahan baku pisang kepok (*Musa paradisiaca* L.) var. kepok yang diperoleh dari pasar tradisional Majene, Sulawesi Barat. *Bacillus subtilis* ATCC 19659 dan *Bacillus licheniformis* ATCC 12759. Bahan kimia lainnya berupa aquades, *Brain Heart Infusion Broth* (Oxoid, UK), NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, Singapore), Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, Singapore), NaOH (Sigma-Aldrich, USA), HCl , Na-K-tartarat (Sigma-Aldrich, Singapore), dan 3,5 *dinitrosalicylic acid* (Sigma-Aldrich, Singapore). Alat yang digunakan berupa oven, grinder, ayakan 40 mesh, autofklaf, inkubator, *laminar air flow*, *orbital shaker*, *sentrifuge* (Hermle Z326K, Germany), pompa vakum, spektrofotometer serta peralatan gelas lainnya.

Prosedur penelitian

Pembuatan tepung kulit pisang

Tepung kulit pisang dibuat dengan menggunakan metode pengeringan (Dundar, 2021; Wakiah, 2023). Pisang dikupas dan dikumpulkan kulitnya kemudian dikeringkan menggunakan oven pengering pada suhu 60°C selama 24 jam. Kulit pisang yang telah kering dihaluskan dan diayak menggunakan ayakan ukuran 40 mesh. Analisis proksimat dilakukan untuk kulit pisang dan tepung kulit pisang. Analisis proksimat terdiri dari kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar protein dan kadar karbohidrat berdasarkan *AOAC Official methods* (AOAC, 2012).

Solid state fermentation

Proses fermentasi dan ekstraksi crude amilase dilakukan berdasarkan (Wakiah, 2023). Tepung kulit pisang ditimbang sebanyak 5 gram dan dimasukkan kedalam erlenmeyer. Kadar airnya diatur hingga 80% dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum digunakan sebagai substrat fermentasi. Sebanyak 1 mL suspensi bakteri (*B. subtilis* atau *B. licheniformis*) ditambahkan kedalam masing-masing erlenmeyer. Fermentasi dilanjutkan dalam inkubator selama 24 jam dan 48 jam pada suhu 37°C . Ekstraksi dilakukan dengan menambahkan 100 mL buffer sodium fosfat 0,02 M pH 6,9 kedalam erlenmeyer dan diinkubasi dalam *orbital shaker* kecepatan 150 rpm selama 90 menit. Filtrat diperoleh dengan menyaring menggunakan kertas *Whatman* No. 1 kemudian disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C . Supernatan sebagai ekstrak enzim kasar dikumpulkan untuk kemudian dianalisis karakteristiknya.

Pengukuran aktivitas enzim dan stabilitas penyimpanan

Aktivitas enzim dari masing-masing perlakuan diukur untuk menentukan karakteristiknya menggunakan metode DNS berdasarkan Keharom et al. (2016). Supernatan yang dikumpulkan sebagai ekstrak enzim kasar diinkubasi pada suhu ruang 25°C selama 24 jam untuk analisis stabilitas enzim.

Analisis data

Data diolah dan disajikan sebagai nilai rata-rata dengan standar deviasi dari tiga ulangan. Analisis varians satu arah (ANOVA) dengan uji lanjut Duncan digunakan untuk menentukan signifikansi. Semua analisis data diuji statistik menggunakan aplikasi SPSS (*IBM SPSS Statistics* 26, USA) serta aplikasi *R Studio* untuk visualisasi data. Data digolongkan signifikan ketika nilai $p < 0.05$.

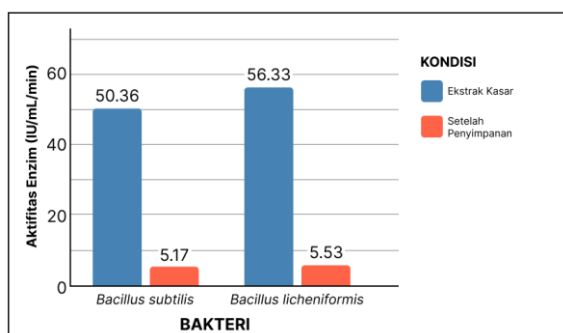
Hasil dan Pembahasan

Stabilitas penyimpanan amilase (fermentasi 24 jam)

Amilase merupakan enzim hidrolitik yang banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri, dan produksinya melalui fermentasi padat (*Solid-State Fermentation*, SSF) telah menjadi

pendekatan yang efisien, terutama dengan pemanfaatan substrat limbah pertanian (Wakiah, 2023). Penelitian ini mengevaluasi stabilitas enzim amilase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* dan *Bacillus licheniformis* melalui fermentasi padat selama 24 jam menggunakan tepung kulit pisang kepok sebagai substrat.

Hasil analisis (Gambar 1) menunjukkan bahwa kedua bakteri mampu menghasilkan enzim amilase dengan aktivitas yang tinggi pada kondisi ekstrak kasar, yaitu sebesar 50,36 IU/mL/min untuk *B. subtilis* dan 56,33 IU/mL/min untuk *B. licheniformis*. Hal ini menunjukkan bahwa kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca* L.) var. kepok berpotensi sebagai substrat fermentasi untuk mendukung produksi enzim amilase secara efisien. Penelitian mengenai aktivitas amilase yang diproduksi dari kulit pisang menggunakan *Bacillus subtilis* dengan masa inkubasi 24 jam 4,53 IU/mL/min (Kokab et al., 2003). Sementara itu, penggunaan *Bacillus cereus* pada substrat kulit pisang menghasilkan aktivitas amilase sebesar 59,78 IU/mL/min (Ramzan et al., 2019).



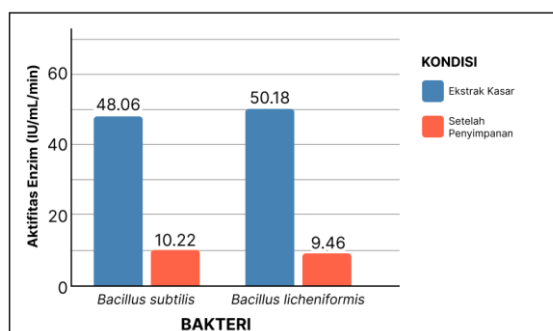
Gambar 1. Aktivitas amilase (fermentasi 24 jam) sebelum dan setelah penyimpanan

Namun demikian, penyimpanan ekstrak enzim pada suhu ruang ($t = 24$ jam, $T = 25^{\circ}\text{C}$) menyebabkan penurunan aktivitas enzim yang sangat signifikan. Aktivitas enzim *B. subtilis* menurun menjadi 5.17 IU/mL/min dan *B. licheniformis* menjadi 5.53 IU/mL/min, yang secara berturut-turut merepresentasikan kehilangan aktivitas sebesar 89.7% dan 90.2%. Tingginya persentase penurunan ini mengindikasikan bahwa enzim amilase yang dihasilkan dari kedua strain bersifat tidak stabil pada suhu ruang tanpa adanya perlakuan stabilisasi. Beberapa faktor yang diduga

berkontribusi terhadap inaktivasi enzim meliputi denaturasi akibat suhu, aktivitas proteolitik residu, perubahan pH selama penyimpanan, dan kemungkinan oksidasi gugus aktif enzim (Maghraby et al., 2023). Studi lain menunjukkan bahwa amilase *Bacillus licheniformis* kering yang diimobilisasi ke polietilen alt-maleat anhidrida menunjukkan kehilangan aktivitas berkisar antara 31% hingga 48% setelah hanya 24 jam penyimpanan pada suhu kamar (Cordeiro et al., 2011).

Stabilitas penyimpanan amilase (fermentasi 48 jam)

Ekstrak kasar yang diperoleh setelah fermentasi 48 jam dianalisis aktivitas sebelum penyimpanan dan setelah penyimpanan pada suhu ruang ($t = 24$ jam, $T = 25^{\circ}\text{C}$) (Gambar 2). Berdasarkan hasil analisis, aktivitas amilase dari *B. subtilis* pada kondisi ekstrak kasar mencapai 48,06 IU/mL/min, sedangkan *B. licheniformis* menunjukkan aktivitas sebesar 50,18 IU/mL/min. Namun, setelah penyimpanan selama 24 jam, aktivitas enzim mengalami penurunan drastis menjadi 10.22 IU/mL/min (*B. subtilis*) dan 9.46 IU/mL/min (*B. licheniformis*), yang masing-masing merepresentasikan kehilangan aktivitas sebesar 78.7% dan 81.1%. Penelitian serupa yang memproduksi amilase dari kulit pisang menggunakan *Bacillus subtilis* dengan masa inkubasi 48 jam menghasilkan aktivitas sebesar 7,14 IU/mL/min (Kokab et al., 2003).



Gambar 2. Aktivitas amilase (fermentasi 48 jam) sebelum dan setelah penyimpanan

Perbandingan antar waktu fermentasi menunjukkan bahwa fermentasi 24 jam menghasilkan aktivitas awal enzim yang tinggi. Namun dengan stabilitas rendah, sementara fermentasi 48 jam cenderung menghasilkan

aktivitas yang sedikit lebih rendah tetapi sedikit lebih stabil setelah penyimpanan. Studi yang dilakukan oleh Wakiah, (2023) juga menunjukkan hal yang serupa dimana amilase yang dihasilkan dengan 48 jam waktu inkubasi memiliki stabilitas yang sedikit lebih stabil dibandingkan dengan 24 jam waktu inkubasi.

Penurunan aktivitas enzim yang tajam pada kedua kondisi fermentasi menegaskan bahwa amilase hasil produksi SSF tanpa perlakuan stabilisasi sangat rentan terhadap inaktivasi selama penyimpanan pada suhu ruang. Studi yang dilakukan oleh Kyomuhimbo et al., (2023) menunjukkan bahwa lakase yang melalui proses stabilisasi melalui imobilisasi memiliki stabilitas yang jauh lebih tinggi. Faktor-faktor yang berkontribusi terhadap degradasi ini meliputi denaturasi struktur protein akibat suhu, aktivitas enzim proteolitik residu, serta paparan oksigen yang dapat menyebabkan oksidasi gugus aktif enzim (Grahame et al., 2015).

Substrat produksi amilase

Tepung kulit pisang digunakan sebagai substrat fermentasi dalam produksi enzim amilase melalui fermentasi padat oleh *B. Subtilis* dan *B. Licheniformis* (Wakiah, 2023). Berdasarkan analisis proksimat, proses pengeringan dan pengolahan kulit pisang menjadi tepung secara signifikan meningkatkan kandungan nutrisi padat dan mengurangi kadar air secara drastis. Tepung kulit pisang memiliki kandungan air sebesar 6,33%, jauh lebih rendah dibandingkan kulit pisang segar yang mencapai 82,01%. Penurunan kadar air ini penting untuk mendukung proses fermentasi padat, karena kelembapan rendah membantu mencegah pertumbuhan mikroorganisme kontaminan dan menciptakan kondisi yang optimal bagi pertumbuhan bakteri penghasil enzim pada SSF (Chen, 2013).

Tabel 1. Analisis Proksimat Kulit Pisang dan Tepung Kulit Pisang

No	Parameter	Tepung kulit pisang	Kulit pisang
1.	Air	6,33	82,01
2.	Abu	7,58	1,74
3.	Protein	4,08	0,95
4.	Lemak	3,37	3,06
5.	Karbohidrat	78,64	14,97
6.	Total Pati	46,24	4,68

Peningkatan kadar karbohidrat (dari 14,97% menjadi 78,64%) dan total pati (dari 4,68% menjadi 46,24%) pada tepung kulit pisang menjadikan substrat ini sangat potensial untuk mendukung produksi enzim amilase. Karbohidrat dan pati merupakan sumber utama induksi bagi ekspresi enzim amilase oleh bakteri, karena enzim ini disintesis untuk mendegradasi polisakarida menjadi gula sederhana (de Souza et al., 2010). Tingginya kandungan substrat polisakarida dalam tepung kulit pisang kemungkinan besar menjadi faktor utama yang berkontribusi terhadap aktivitas enzim yang tinggi (Mehmood et al., 2022).

Kandungan protein dan abu pada tepung meningkat masing-masing dari 0,95% dan 1,74% pada kulit pisang menjadi 4,08% dan 7,58%. Hal ini menunjukkan bahwa proses pengeringan dan penggilingan tidak hanya meningkatkan densitas nutrisi, tetapi juga kemungkinan menambah ketersediaan nitrogen dan mineral yang penting bagi metabolisme mikroba selama fermentasi (Călinoiu et al., 2018). Kandungan lemak relatif tidak banyak berubah, namun keberadaannya tidak secara langsung memengaruhi sintesis amilase (Nor-Liyana et al., 2019).

Meskipun aktivitas awal enzim cukup tinggi, hasil penyimpanan menunjukkan bahwa enzim mengalami penurunan stabilitas yang signifikan pada suhu ruang, dengan kehilangan aktivitas mencapai 82–91% setelah 24 jam. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun substrat yang digunakan mendukung produksi enzim secara maksimal, karakteristik ekstrak enzim hasil fermentasi tetap membutuhkan perlakuan stabilisasi pascaproduksi. Dengan kata lain, komposisi nutrisi dalam substrat mendukung biosintesis amilase, tetapi tidak cukup untuk menjaga kestabilan enzim setelah produksi, terutama tanpa agen protektan atau kondisi penyimpanan yang dikontrol (Maghraby et al., 2023).

Kesimpulan

Kulit pisang merupakan substrat yang efektif untuk produksi enzim amilase melalui fermentasi padat menggunakan *Bacillus subtilis* dan *Bacillus licheniformis*. Aktivitas enzim tertinggi diperoleh setelah 24 jam fermentasi. Meskipun demikian, hasil menunjukkan bahwa ekstrak enzim kasar yang dihasilkan memiliki

stabilitas penyimpanan yang rendah, ditandai dengan penurunan aktivitas lebih dari 78% setelah 24 jam penyimpanan pada suhu ruang. Temuan ini menegaskan potensi kulit pisang sebagai sumber karbon alternatif bernilai ekonomi dalam produksi enzim industri, sekaligus menekankan perlunya penerapan strategi stabilisasi pasca-fermentasi guna mempertahankan aktivitas enzim untuk aplikasi berskala industri.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang terlibat dalam melakukan penelitian ini.

Referensi

- Akinfemiwa, O., Zubair, M., & Muniraj, T. (2023). Amylase. *StatPearls*.
- AOAC. (2012). [AOAC]: Official Methods of Analysis (Volume I). In Wahshington DC (US) (Vol. 1, Issue Volume 1). Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemist, INC. doi: 10.7312/seir17116-004
- Călinoiu, L. F., & Vodnar, D. C. (2018). Whole grains and phenolic acids: A review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. *Nutrients*, 10(11), 1615. doi: 10.3390/nu10111615
- Chen, H. (2013). Anaerobic solid-state fermentation. In *Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice* (1st ed., p. 199). Berlin: Springer Dordrecht. doi: 10.1007/978-94-007-6043-1
- Cordeiro, A. L., Lenk, T., & Werner, C. (2011). Immobilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase onto reactive polymer films. *Journal of Biotechnology*, 154(4), 216–221. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.04.008
- de Souza, P. M., & e Magalhães, P. de O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850–861. doi: 10.1590/s1517-83822010000400004
- Dundar, A. (2021). An investigation on psychochemical parameters and potential use of waste fruit peels as carbon sources for α -amylase production from *Bacillus licheniformis*. In *Research & Reviews in Science and Mathematics* (1st ed., Issue May). Ankara: Gece Publishing. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Enihal-Ercan/publication/352178517_Imtiyaz_Sahibi_Publisher_Yasar_Hiz/links/60bda14992851cb13d83f470/Imtiyaz-Sahibi-Publisher-Yasar-Hiz.pdf#page=39
- Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: A review. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1281–1292. doi: 10.1007/s00203-020-02128-y
- Grahame, D. A. S., Bryksa, B. C., & Yada, R. Y. (2015). Factors affecting enzyme activity. In *Improving and tailoring enzymes for food quality and functionality* (pp. 11–55). Elsevier. doi: 10.1016/B978-1-78242-285-3.00002-8
- Keharom, S., Mahachai, R., & Chanthai, S. (2016). The optimization study of α -amylase activity based on central composite design-response surface methodology by dinitrosalicylic acid method. *International Food Research Journal*, 23(1)(January).
- Kokab, S., Asghar, M., Rehman, K., Asad, M. J., & Adedyo, O. (2003). Bio-Processing of Banana Peel for α -Amylase Production by *Bacillus subtilis*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 5(1), 36–39. doi: 1560–8530/2003/05
- Kyomuhimbo, H. D., & Brink, H. G. (2023). Applications and immobilization strategies of the copper-centred laccase enzyme; a review. *Heliyon*, 9(2), e13156. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13156
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega*, 8(6), 5184–5196. doi: 10.1021/acsomega.2c07560
- Mehmood, T., Ahmed, S., Waseem, R., Saeed, S., Ahmed, W., Irfan, M., & Ullah, A. (2022). Valorization of Fruit Peels into Biovanillin and Statistical Optimization of Process Using *Enterobacter hormaechei* through Solid-State Fermentation. *Fermentation*, 8(2), 40. doi:

- <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation8020040>
- Mishra, S., Joghee, N. N., & Jayaraman, G. (2022). Virgibacillus dokdonensis VITP14 produces α -amylase and protease with a broader operational range but with differential thermodynamic stability. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(1), 92–100. doi: 10.1002/bab.2084
- Naik, B., Kumar, V., Rizwanuddin, S., Chauhan, M., Gupta, A. K., Rustagi, S., Kumar, V., & Gupta, S. (2023). Agro-industrial waste: a cost-effective and eco-friendly substrate to produce amylase. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1), 30. doi: /10.1186/s43014-023-00143-2
- Nor-Liyana, J., Siroshini, K. T., Nurul-Syahirah, M. B., Chang, W. L., Nurul-Husna, S., Daryl, J. A., Khairul-Kamilah, A. K., & Hasnah, B. (2019). Phytochemical analysis of Elateriospermum tapos and its inhibitory effects on alpha-amylase, alpha-glucosidase and pancreatic lipase. *Journal of Tropical Forest Science*, 31(2), 240–248. doi: 10.26525/jtfs2019.31.2.240248
- Nuraida, L., Hasanah, U., Athaya, D. R., & Refita, K. (2022). *Teknologi Fermentasi Pangan* (Cetakan 1.). Bogor: IPB Press.
- Patil, A. G., Khan, K., Aishwarya, S., Padyana, S., Huchegowda, R., Reddy, K. R., Pais, R., Alrafas, H., Dsouza, R., & Madhavi, J. (2022). Fungal amylases and their industrial applications. In *Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 2: Bioprospecting for Biomolecules* (pp. 407–434). Springer. doi: /10.1007/978-3-030-85603-8_11
- Paul, J. S., Gupta, N., Beliya, E., Tiwari, S., & Jadhav, S. K. (2021). Aspects and recent trends in microbial α -amylase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(8), 2649–2698.
- Ramzan, I., Chaudhry, A., Bashir, H., Bilal, M., & Sumrin, A. (2019). Comparative study of alpha amylase producing mutated and unmutated Bacillus strains by taking cost effective measures. *Pure Applied Biology*, 8(2), 1789–1800. doi: 10.19045/bspab.2019.80122
- Wakiah, N. (2023). Meta-Analisis, Systematic Review, dan Produksi α -Amilase Melalui Fermentasi Limbah Agroindustri. [Institut Pertanian Bogor]. In Institut Pertanian Bogor.