

**KONVERSI ENZIMATIS PATI ONGGOK MENJADI
GLUKOSA MENGGUNAKAN α -AMILASE AMOBIL DARI
Bacillus subtilis ITBCCB148 UNTUK PRODUKSI
BIOETANOL**

(Tesis)

Oleh

ARUM WIDYASMARA



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

ABSTRACT

ENZYMATIC CONVERSION OF TAPIOKA SOLID WASTE STARCH TO BE GLUCOSA USING IMMOBILIZED α -AMYLASE FROM *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 FOR BIOETANOL PRODUCTION

By

Arum Widyasmara

In this study, the α -amylase enzyme from *Bacillus subtilis* ITBCCB148 was immobilized through crosslinking method on chitosan matrix. The aims of this study were to determine the effect of immobilization on the stability of α -amylase to temperature and pH, and to convert cassava solid waste starch by the immobilized α -amylase to be glucose which is used for bioethanol production. The steps of this study were done as following: production process, isolation, purification, immobilization, characterization of purification enzyme and immobilization, enzymatic conversion of cassava solid waste starch and bioethanol fermentation. The results showed that the specific activity of the purified α -amylase enzyme after the dialysis stage was 4504.15 U mg⁻¹ and its purity increased 4.87 times than the crude extract enzyme. The purified α -amylase enzyme has an optimum temperature of 65°C, $K_M = 1.63$ mg mL⁻¹ substrate, and $V_{max} = 39.68$ μ mol mL⁻¹ min⁻¹. The immobilized α -amylase enzyme has an optimum temperature of 75°C, $K_M = 3.514$ mg mL⁻¹ substrate, and $V_{max} = 7,05$ μ mol mL⁻¹ min⁻¹. The residual activity of the purified enzyme and immobilized enzyme in the study of thermal stability on 60°C for 80 minutes were 58% and 86.15%, respectively. The immobilized enzyme can be used repeatedly up to 6 times. The kinetic studies of purified enzyme were obtained $t_{1/2} = 113.61$ minutes, $k_i = 0.0061$ min⁻¹, and $\Delta G_i = 107.34$ kJ mol⁻¹. The kinetic studies of the immobilized enzyme were obtained $t_{1/2} = 433.13$ minutes, $k_i = 0.0016$ min⁻¹, and $\Delta G_i = 111.06$ kJ mol⁻¹. Based on the decrease of k_i value, increase of ΔG_i and half-life ($t_{1/2}$), the immobilization by chitosan can improve the stability of α -amylase from *B. subtilis* ITBCCB148. Furthermore, the *Saccharomyces cerevisiae* fermentation on cassava solid waste starch converted by the immobilized α -amylase obtained ethanol approximately 0.129%.

Keywords: α -amylase, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, chitosan, immobilization, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRAK

KONVERSI ENZIMATIS PATI ONGGOK MENJADI GLUKOSA MENGUNAKAN α -AMILASE AMOBIL DARI *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 UNTUK PRODUKSI BIOETANOL

Oleh
Arum Widyasmara

Pada penelitian ini telah dilakukan amobilisasi enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 melalui metode ikatan silang pada matriks kitosan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh amobilisasi pada kestabilan enzim α -amilase terhadap suhu dan pH serta konversi enzimatis pati ongkok oleh enzim α -amilase amobil menjadi glukosa reduksi yang selanjutnya digunakan untuk produksi bioetanol. Tahap penelitian ini meliputi proses produksi, isolasi, pemurnian, amobilisasi, karakterisasi enzim hasil pemurnian dan amobilisasi serta konversi enzimatis pati ongkok dan fermentasi bioetanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian hingga tahap dialisis adalah 4.504,15 U mg⁻¹ dan kemurniannya meningkat 4,87 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 65°C, $K_M = 1,63$ mg mL⁻¹ substrat, dan $V_{maks} = 39,68$ μ mol mL⁻¹ menit⁻¹. Enzim α -amilase hasil amobilisasi memiliki suhu optimum 75°C, $K_M = 3,514$ mg mL⁻¹ substrat, dan $V_{maks} = 7,05$ μ mol mL⁻¹ menit⁻¹. Aktivitas sisa enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi dalam uji stabilitas termal pada suhu 60°C selama 80 menit berturut-turut sebesar 58% dan 86,15%. Enzim amobil dapat digunakan berulang hingga 6 kali. Data kinetika enzim hasil pemurnian diperoleh $t_{1/2} = 113,61$ menit, $k_i = 0,0061$ menit⁻¹, dan $\Delta G_i = 107,34$ kJ mol⁻¹. Data kinetika enzim hasil amobilisasi diperoleh $t_{1/2} = 433,13$ menit, $k_i = 0,0016$ menit⁻¹, dan ΔG_i yaitu 111,06 kJ mol⁻¹. Berdasarkan penurunan nilai k_i , peningkatan nilai ΔG_i dan waktu paruh ($t_{1/2}$), diketahui bahwa amobilisasi menggunakan kitosan dapat meningkatkan stabilitas enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148. Selanjutnya, hasil fermentasi *Saccharomyces cerevisiae* pada pati ongkok yang dikonversi dengan enzim α -amilase didapatkan kadar etanol berkisar 0,129%.

Kata kunci : α -amilase, amobilisasi, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, kitosan, *Saccharomyces cerevisiae*

**KONVERSI ENZIMATIS PATI ONGGOK MENJADI
GLUKOSA MENGGUNAKAN α -AMILASE AMOBIL DARI
Bacillus subtilis ITBCCB148 UNTUK PRODUKSI
BIOETANOL**

Oleh

ARUM WIDYASMARA

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
MAGISTER SAINS

Pada

Program Studi Magister Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

Judul Tesis

: **KONVERSI ENZIMATIS PATI ONGGOK
MENJADI GLUKOSA MENGGUNAKAN
 α -AMILASE AMOBIL DARI *Bacillus
subtilis* ITBCCB148 UNTUK PRODUKSI
BIOETANOL**

Nama Mahasiswa

: **Arum Widiasmara**

Nomor Pokok Mahasiswa

: 1527011011

Program Studi

: Magister Kimia

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Prof. Dr. Ir. Yandri AS, M.S.
NIP 19560905 199203 1 001

Prof. Sutopo Hadi, Ph.D.
NIP 19710415 199512 1 001

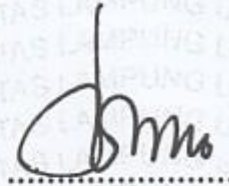
2. Ketua Program Studi Magister Kimia

Dr. Rudy T.M. Situmeang, M.Sc.
NIP 19600616 198811 1 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji


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



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



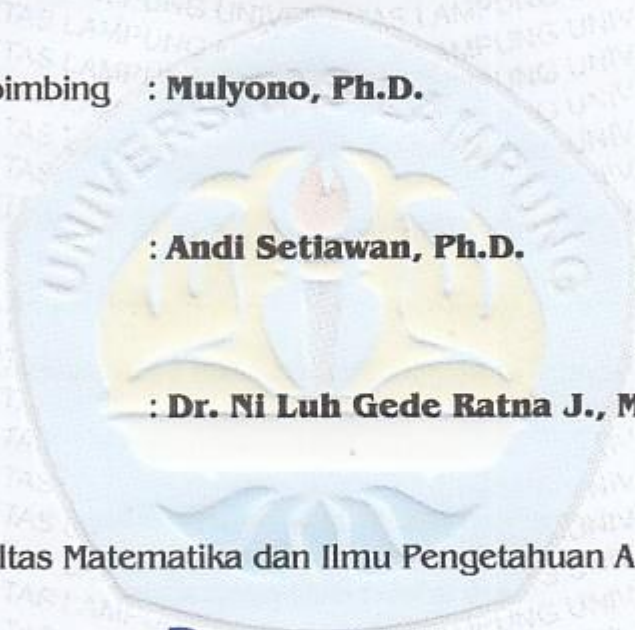
Penguji
Bukan Pembimbing : **Mulyono, Ph.D.**



: **Andi Setiawan, Ph.D.**



: **Dr. Ni Luh Gede Ratna J., M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D.
NIP 19710212 199512 1 001



3. Direktur Program Pascasarjana

Prof. Drs. Mustofa, M.A., Ph.D.
NIP 19570101 198403 1 020



Tanggal Lulus Ujian Tesis : **26 Januari 2018**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa :

1. Tesis dengan judul “Konversi Enzimatis Pati Onggok menjadi Glukosa Menggunakan α -amilase Amobil dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 untuk Produksi Bioetanol” adalah karya saya sendiri dan saya tidak melakukan penjiplakan atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai dengan tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan kepada Universitas Lampung

Atas pernyataan ini, apabila dikemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya; saya bersedia dan sanggup dituntut sesuai dengan hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, Januari 2018
Pembuat Pernyataan,



Arum Widyasmara
NPM. 1527011011

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Kudus pada tanggal 26 Januari 1986, anak ke dua dari dua bersaudara, yang merupakan buah kasih dari pasangan Ayahanda H. Sumihardjo dan Ibunda S.N. Farida Sofiati.

Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri Barongan III Kudus pada tahun 1998, pendidikan tingkat menengah di SMP Negeri 1 Kudus pada tahun 2001 dan SMA Negeri 1 Kudus pada tahun 2004. Pada tahun yang sama, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Farmasi Universitas Indonesia melalui jalur Penelusuran Minat dan Kemampuan (PMDK) dan berhasil menyelesaikan S1 pada tahun 2008. Penulis melanjutkan pendidikan Program Profesi Apoteker dan menyelesaikan pendidikan tersebut pada tahun 2009.

Penulis melangsungkan pernikahan pada tahun 2010 dan kini telah dikaruniai satu orang putri. Penulis diangkat menjadi Pegawai Negeri Sipil pada tahun 2011 pada instansi Politeknik AKA Bogor Kementerian Perindustrian. Pada tahun yang sama, penulis mengikuti suami pindah tugas ke Provinsi Lampung dan penulis pindah tugas di instansi SMK-SMTI Bandar Lampung Kementerian Perindustrian. Pada tahun 2015, penulis melanjutkan pendidikan di Program Studi Magister Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas

Lampung melalui program beasiswa mandiri yang dibiayai oleh Pusat Pendidikan dan Pelatihan (Pusdiklat) Industri Kementerian Perindustrian.

Selama mengajar di SMK-SMTI Bandar Lampung, penulis mengampu mata pelajaran Membuat Larutan Standar dan Standarisasi, Analisis Gravimetri, Analisis Titrimetri dan Analisis Spektrofotometri. Pada tahun 2017, penulis mengikuti Pendidikan dan Latihan Profesi Guru (PLPG) dan berhasil mendapatkan sertifikat pendidik bidang Kimia Analisis.

MOTTO

“Niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat”. (Al Mujadalah :11)

“Karena sesungguhnya bersama setiap kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama setiap kesulitan ada kemudahan”. (Al-Insyirah : 5-6)

“Barangsiapa yang menghendaki kehidupan dunia maka wajib baginya memiliki ilmu, dan barang siapa yang menghendaki kehidupan akhirat, maka wajib baginya memiliki ilmu, dan barang siapa menghendaki keduanya, maka wajib baginya memiliki ilmu”. (HR. Turmudzi)

“The only way to do great work is to love what you do”.
(Steve Job)

Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang dan dengan segala rasa syukur kepada Allah SWT, aku persembahkan karyaku ini untuk:

Suami tercinta Moh. Fazlurrahman dan anakku tercinta Zara Tsurayya Fazra, yang senantiasa mendo'akan, mendukung, memberi semangat, memotivasi dan selalu menguatkan dalam setiap derap langkahku menuju kesuksesan.

Ayahanda H. Sumihardjo, ibunda S.N. Farida Sofiati, dan ibunda mertua Hj. Asiyah yang penuh keikhlasan mendoakan, mendukung dan memotivasi dalam segala langkah ananda.

Kakanda dan adinda, Bagus Pamungkas, Bachtiar Aulawy, Aminah, Isti Kumalasari dan Atina Rosdiana yang senantiasa mendukung dan menguatkan.

Pembimbing Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. teladan bagiku

Guru-guru yang telah menjadi inspirasiku untuk tetap belajar.

Siswa-siswa yang telah mendorongku untuk terus berkembang.

Seluruh sahabat yang selalu menjadi sumber semangatku.

Dunia Pendidikan dimana aku bertekad berbakti untuk senantiasa mengembangkan dan berbagi ilmu.

SANWACANA

Alhamdulillah *rabbil'alamin*. Segala puji dan syukur hanya milik Allah SWT, Dzat yang senantiasa menganugerahkan ilmu pengetahuan kepada manusia dengan perantara kalam, sehingga atas kehendak dan izin-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **“Konversi Enzimatis Pati Onggok menjadi Glukosa Menggunakan α -Amilase Amobil dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 untuk Produksi Bioetanol”** dengan baik. Shalawat serta salam semoga selalu tercurah kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat serta pengikutnya yang setia hingga Yaumul Akhir. Amin.

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Magister Kimia pada Program Studi Magister Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Tidak sedikit kendala yang dihadapi penulis dalam pelaksanaan serta dalam penulisan tesis ini, namun *Alhamdulillah*, Allah memberikan kemudahan melalui orang-orang untuk membantu penulis, sehingga kendala tersebut dapat dihadapi. Dalam kesempatan ini, penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S., selaku pembimbing utama, guru dan teladan bagi penulis yang telah membagikan ilmu dan senantiasa dengan sabar memberikan motivasi, bimbingan dan dukungan kepada penulis.
2. Bapak Prof. Sutopo Hadi, Ph.D. selaku pembimbing kedua dan guru bagi penulis, yang senantiasa memberikan bimbingan, saran dan masukan kepada penulis.

3. Bapak Mulyono, Ph.D, selaku pembahas, guru dan inspirator bagi penulis, yang dengan sabar memberikan masukan dan bimbingan kepada penulis.
4. Bapak Andi Setiawan, Ph.D., selaku pembahas dan guru bagi penulis, atas semua masukan, bimbingan dan saran kepada penulis.
5. Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si. selaku pembahas dan koordinator seminar hasil yang banyak membantu serta memberikan masukan dan bimbingan kepada penulis.
6. Bapak Dr. Rudy T.M. Situmeang, M.Sc., selaku Ketua Program Studi Magister Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
7. Bapak Dr.Eng. Suropto Dwi Yuwono, selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Bapak Prof. Dr. Warsito D.E.A., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
9. Bapak Drs. Mujiyono, MM., selaku Kepala Pusdiklat Industri Kementerian Perindustrian atas pemberian Program Beasiswa Mandiri yang telah diberikan sehingga penulis dapat menempuh pendidikan di Program Magister Kimia FMIPA Universitas Lampung.
10. Ibu Dra. Hj. Sulastri, MTA., Kepala Sekolah SMK-SMTI Bandar Lampung yang telah memberikan dukungan kepada penulis.
11. Bapak Drs. H. Heri Purnomo, M.Pd., Kepala Sekolah SMK-SMTI Bandar Lampung periode 2009-2017, yang telah memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis.

12. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung, atas seluruh dedikasi dan ilmu yang diberikan kepada penulis selama menempuh masa pendidikan.
13. Pak Jon, Pak Gani dan seluruh staf pegawai Jurusan Kimia serta seluruh staf pegawai Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang banyak membantu penulis dalam menyelesaikan pendidikan.
14. Pak Hambali, Mbak Do'a dan kawan kawan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung yang banyak membantu penulis dalam melakukan analisa spektrofotometri.
15. Miranti Safitri dan Ari Gunawan, rekan seperjuangan dalam pencarian ilmu, yang telah memberikan semangat, motivasi dan dukungan kepada penulis.
16. Rekan-rekan dan adik-adik, Ezra, Nia, Maya, Khomsatun, Sinta, di Laboratorium Biokimia atas bantuan, semangat dan doa doa kalian.
17. Bapak Hery Sefriadi, Bapak Ridian Laresta, Bapak Hamim Usman dan Mbak Nurbaity serta seluruh guru dan staf pegawai SMK-SMTI Bandar Lampung yang telah memberikan dukungan dan doa kepada penulis.
18. Mbak Yani, Mbak Tria, Mbak Pirma, Mbak Mira, Kristin, Mbak April, Mbak Suci, Mbak Desi, Mbak Nurhayati, Mbak Fetty, Mbak Niken, Mbak Anjar, Rini dan Rani, sahabat *Members* yang telah banyak memberikan dukungan dan doa kepada penulis.
19. Orang tua tercinta, Bapak H. Sumihardjo, Ibu S.N. Farida Sofiati dan Ibu Hj. Asiyah yang senantiasa memberikan doa terbaik bagi penulis dan kesabaran dalam membimbing penulis.

20. Kakanda dan Adinda, Mas Bagus Pamungkas, Mas Bachtiar Aulawy, Mbak Aminah, Isti Kumalasari dan Atina Rosdiana yang senantiasa memberikan semangat, doa dan dukungan kepada penulis.
21. Segenap keluarga besar Honggosoco, keluarga besar Bani Choiri Syamsi dan keluarga besar Mbah Munisah yang senantiasa memberikan doa kepada penulis.
22. Terimakasih tak terhingga kepada suami dan anak tercinta, Moh. Fazlurrahman dan Zara Tsurayya Fazra, sumber kekuatan penulis dalam menjalani segala peran.

Terima kasih atas segala bantuan dan dukungan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu. *Jazakumullah Khairan Katsiran wa Jazakumullah Ahsanal Jaza*, Semoga Allah SWT akan membalas kalian dengan kebaikan yang banyak dan semoga Allah SWT akan membalas kalian dengan kebaikan yang terbaik . Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, tetapi semoga dapat bermanfaat bagi para pembaca khususnya rekan-rekan mahasiswa. Aamiin.

Bandar Lampung, Januari 2018
Penulis,

Arum Widyasmara

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR GAMBAR	iii
DAFTAR TABEL	v
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	5
C. Manfaat Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Konversi Enzimatis Pati oleh α -Amilase	6
B. Isolasi dan Pemurnian Enzim	9
1. Sentrifugasi.....	9
2. Fraksinasi dengan amonium sulfat	10
3. Dialisis	11
C. Uji Aktivitas Enzim -Amilase	12
D. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry	14
E. Kinetika Reaksi Enzim.....	14
F. Stabilitas Enzim.....	16
G. Amobilisasi	18
H. Kitosan.....	23
I. Produksi Bioetanol	25
III. METODE PENELITIAN	29
A. Waktu dan Tempat.....	29
B. Bahan dan Alat.....	29
C. Metode Penelitian	30
1. Produksi Enzim -amilase.....	30
2. Isolasi -amilase	31
3. Pemurnian enzim -amilase	31

4. Uji Aktivitas α -amilase.....	32
5. Penentuan Kadar Protein	33
6. Amobilisasi Enzim Hasil Pemurnian.....	34
7. Karakterisasi Enzim α -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Amobilisasi	36
8. Konversi Enzimatis Pati Onggok Menjadi Gula Pereduksi Glukosa Menggunakan Enzim Hasil Amobilisasi	38
9. Proses Fermentasi Etanol	39
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
A. Isolasi Enzim	40
B. Pemurnian Enzim.....	41
1. Fraksinasi dengan amonium sulfat	41
2. Dialisis	43
C. Penentuan Konsentrasi Glutaraldehyd Optimal.....	45
D. Penentuan pH Pengikatan Enzim pada Matrik Pengamobil	47
E. Karakterisasi Enzim Hasil Pemurnian dan Hasil Amobilisasi.....	48
1. Penentuan Suhu Optimum.....	48
2. Penentuan Stabilitas Termal	50
3. Penentuan K_M Dan V_{maks}	51
4. Pemakaian Berulang Enzim Hasil Amobilisasi.....	53
5. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (K_i), Waktu Paruh ($T_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i).....	54
F. Konversi Enzimatis Pati Onggok dan Fermentasi Etanol.....	56
V. KESIMPULAN DAN SARAN	59
A. Kesimpulan	60
B. Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN.....	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Skema struktur granul yang mengandung amilosa dan amilopektin.....	7
2. Grafik Lineweaver – Burk	16
3. Jalur amobilisasi enzim	23
4. Amobilisasi enzim dengan ikatan kovalen dan non kovalen pada matriks eksternal	23
5. Struktur molekul kitosan	24
6. Struktur larutan glutaraldehid dalam air	25
7. Reaksi antara gutaraldehid dengan enzim	25
8. Diagram alir produksi bioetanol	28
9. Diagram alir metode penelitian	39
10. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-90)% dengan aktivitas spesifik enzim -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148.....	42
11. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-30)% dan (30-90)% dengan aktivitas spesifik enzim -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148.....	43
12. Aktivitas unit enzim -amilase pada berbagai konsentrasi glutaraldehid yang ditambahkan.....	46
13. Pembentukan ikatan kovalen antara kitosan dan glutaraldehid	46
14. Pembentukan ikatan kovalen antara kompleks kitosan glutaraldehid dan enzim	47
15. Aktivitas unit enzim -amilase pada berbagai pH pengikatan dengan matriks kitosan	48

16. Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan amobilisasi	48
17. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan amobilisasi	50
18. Grafik Lineweaver-Burk enzim α -amilase hasil pemurnian dan amobilisasi	51
19. Pemakaian berulang enzim α -amilase hasil amobilisasi pada matriks kitosan	53
20. Grafik $\ln(E_i/E_o)$ enzim hasil pemurnian dan amobilisasi.....	54
21. Kromatogram hasil kromatografi gas pada pati onggok setelah fermentasi...57	
22. Kromatogram standar etanol	58
23. Kurva standar Bovine Serum Albumin	77
24. Kurva standar glukosa	78
25. <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148 dalam medium agar miring	80
26. Media inokulasi	80
27. Fermentasi <i>Bacillus subtilis</i> untuk mendapatkan enzim α -amilase.....	81
28. Pemanenan ekstrak kasar enzim α -amilase	81
29. Fraksinasi enzim α -amilase dengan amonium sulfat	82
30. Dialisis enzim α -amilase	82
31. Uji aktivitas enzim α -amilase hasil pemurnian dengan metode Fuwa	83
32. Uji kadar protein dengan metode Lowry.....	83
33. Uji enzim α -amilase dan pembuatan kurva standar glukosa dengan metode Mandels.	84
34. Pembuatan bubur onggok	84
35. Inkubasi substrat bubur onggok dan enzim α -amilase hasil amobilisasi ...	85
36. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dalam PDA	85

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemurnian enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148.	45
2. Nilai K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian dan amobilisasi.....	52
3. Nilai k_i , G_i , dan $t_{1/2}$ enzim hasil pemurnian dan amobilisasi.....	54
4. Kadar glukosa sebelum dan sesudah fermentasi.....	56
5. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-100)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148.....	67
6. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat (0-30)% dan (30-100)%	
7. dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148..	67
8. Aktivitas unit enzim α -amilase pada berbagai konsentrasi glutaraldehid yayang ditambahkan	68
9. Aktivitas unit enzim α -amilase pada berbagai pH pengikatan dengan matriks kitosan saat pengikatan	68
10. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi.....	69
11. Hubungan antara suhu dengan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	69
12. Hubungan antara aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi selama inaktivasi termal 60°C ...	70
13. Hubungan antara aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi selama inaktivasi termal 60°C.	70
14. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk.....	71

15. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim -amilase hasil amobilisasi berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk	71
16. Hubungan antara pemakaian berulang enzim hasil amobilisasi dengan aktivitas unit (U/mL).....	71
17. Data $\ln(E_i/E_o)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim -amilase hasil pemurnian selama inaktivasi termal 60°C	73
18. Data $\ln(E_i/E_o)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim -amilase hasil amobilisasi selama inaktivasi termal 60°C	73
19. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	77
20. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi	78

I. PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG MASALAH

Bioetanol adalah salah satu jenis etanol yang dihasilkan dari bahan alam. Ada beberapa jenis bahan alam yang digunakan untuk menghasilkan bioetanol, antara lain ubi kayu, kentang, beras dan tebu. Akan tetapi bahan-bahan tersebut di atas merupakan komoditas pangan yang utama di Indonesia. Dalam Undang-Undang RI No. 8 Tahun 2012 penggunaan komoditas pangan disebutkan bahwa penggunaan komoditas pangan sebagai bahan baku sumber energi tidak diperbolehkan jika dapat mengancam ketahanan pangan. Oleh karena itu dibutuhkan usaha untuk mencari sumber energi alternatif lain dari limbah industri seperti kulit pisang, sekam padi, batang sawit, dan onggok (Wahyuono et al., 2014).

Onggok merupakan limbah padat dari produksi tepung tapioka yang dihasilkan dari ubi kayu. Onggok merupakan bahan yang paling potensial dari limbah industri untuk produksi bioetanol berdasarkan kandungan polisakarida dan gula pereduksi. Onggok memiliki kandungan polisakarida meliputi 38,29 % berat (Wijayanti dkk., 2012).

Onggok dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol karena mengandung serat kasar dan pati yang tinggi. Onggok tidak dapat

dikonversi secara langsung sebagai bahan baku bioetanol, tetapi harus dihidrolisis terlebih dahulu. Hidrolisis dapat dilakukan dengan katalis asam maupun enzimatis. Hidrolisis dengan katalis asam mempunyai kelemahan, antara lain memerlukan peralatan yang tahan korosi dan terbentuknya senyawa inhibitor seperti *furfural*, *5-hydroxymethylfurfural* (HMF) selama proses hidrolisis asam (Millati *et al.*, 2002). Hidrolisis enzimatis lebih efektif dilakukan karena katalis enzim bekerja secara spesifik sehingga hasil hidrolisis dapat dikendalikan, mencegah adanya reaksi sampingan, dan ramah lingkungan. Enzim yang digunakan untuk menghidrolisis serat adalah enzim selulase dan enzim yang menghidrolisis pati adalah enzim amilase. Hasil-hasil tersebut berupa gula reduksi yang akan dikonversi oleh *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan bioetanol (Zainab dkk., 2011).

Hidrolisis pati yang memiliki bobot molekul rendah dikatalisis oleh α -amilase yang merupakan enzim komersial yang paling penting. Produk hasil hidrolisis telah diaplikasikan secara luas pada industri makanan, kertas dan tekstil. α -amilase merupakan endoamilase yang mengkatalisis reaksi hidrolisis internal ikatan pada α -1,4-glikosida dalam tepung secara acak. α -amilase dari mikroba untuk tujuan industri terutama dihasilkan dari *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* dan *Aspergillus oryzae*. Karena banyaknya penggunaan amilase dalam berbagai industri, terjadi peningkatan ketertarikan pada amilase pendegradasi pati serta banyaknya penelitian yang menunjukkan pembentukan amilase oleh mikroorganisme dan pemurnian produk enzim (Konsula and Kyriakides, 2004).

Dalam industri pangan, hidrolisis pati untuk menghasilkan gula pereduksi umumnya berlangsung pada reaksi secara *batch*, dimana secara ekonomis merugikan karena enzim hanya digunakan sekali. Agar enzim dapat digunakan berulang, amobilisasi enzim telah digunakan di beberapa industri. Penempelan secara kovalen merupakan metode amobilisasi enzim yang penting, yang digunakan untuk meningkatkan resistensi terhadap suhu, denaturasi, dan pelarut organik. Beberapa pengembangan tergantung pada kondisi lain pada sistem, asal enzim, tipe penyangga dan metode amobilisasi (Bayramoglu *et al.*, 2004).

Ada beberapa keuntungan dengan menempelkan enzim pada matriks penyangga padat. Beberapa alasan utama adalah : (1) Penggunaan jamak atau berulang pada enzim, (2) Kemampuan untuk menghentikan reaksi yang cepat dengan memindahkan enzim dari larutan reaksi, (3) Amobilisasi dapat memberikan efek yang signifikan pada stabilitas enzim melawan efek denaturasi, (4) Produk tidak terkontaminasi dengan enzim terutama pada industri makanan dan farmasi, (5) Membantu pemurnian enzim dari larutan reaksi dan memisahkan enzim dari substrat dan produk (Ghiaci *et al.*, 2009).

Saat ini, γ -amilase telah diamobilisasi secara kovalen pada mikrospore *poly (hydroxyethylmethacrylate)*, *poly (methylmethacrylate – acrylic acid)* dan membran zirconium. α -amilase juga telah digunakan pada penyangga umum, seperti membran nitroselular dan manik kitosan secara fisik dan adsorpsi *ion-exchange* (Bayramoglu *et al.*, 2004).

Proses amobilisasi α -amilase dari isolat bakteri lokal *B.subtilis* ITBCCB148 telah sukses meningkatkan stabilitas enzim pada suhu tinggi dengan *Diethylaminoethyl Cellulosa* (DEAE-Cellulosa) meskipun stabilitas suhunya hanya meningkat 1,5 kali. Penggunaan berulang pada enzim amobil juga lebih baik dari enzim murni (Yandri *et al.*, 2010b).

Kitosan dapat digunakan sebagai penyangga untuk enzim maupun sel utuh. Kitosan [*poly-S (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose*] merupakan produk deasetilasi dari kitin yang dihasilkan dari kerangka luar *family crustacea* yang memiliki kelarutan dalam larutan asam lebih tinggi dari kitin. Kitosan merupakan senyawa yang murah, inert, hidrofilik, penyangga yang biokompatibel, sehingga menarik untuk digunakan sebagai penyangga dalam amobilisasi enzim. Kehadiran gugus amin memfasilitasi ikatan kovalen pada enzim. Amobilisasi dapat melalui ikatan kovalen pada film kitosan transparan maupun melalui metode penjebakan pada biji kitosan (Cetinus *and* Oztop, 2003).

Berdasarkan hasil-hasil yang telah dilaporkan tersebut, maka pada penelitian ini dipilih proses amobilisasi untuk meningkatkan kestabilan enzim α -amilase yang diisolasi dan dimurnikan dari bakteri isolat lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Enzim amobil selanjutnya digunakan untuk konversi enzimatis pati onggok menjadi glukosa untuk produksi bioetanol. Zat pengamobil yang akan digunakan adalah kitosan.

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Untuk mengetahui pengaruh amobilisasi pada kestabilan enzim α -amilase terhadap suhu dan pH.
2. Konversi enzimatik pati onggok oleh enzim α -amilase amobil menjadi glukosa reduksi yang selanjutnya digunakan untuk produksi bioetanol.

C. MANFAAT PENELITIAN

1. Pemanfaatan kitosan sebagai zat pengamobil enzim α -amilase dalam skala industri.
2. Memberikan alternatif konversi enzimatik pati menggunakan enzim α -amilase amobil untuk produksi bioetanol.

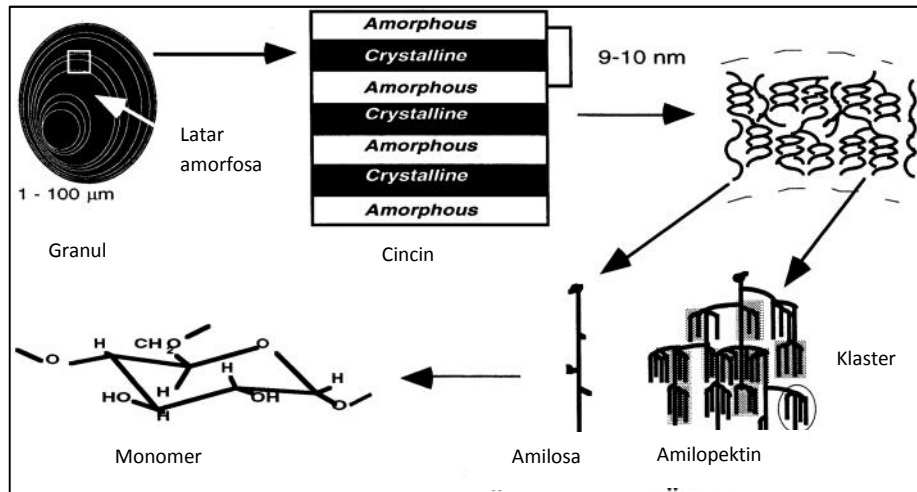
II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Konversi Enzimatis Pati oleh α -Amilase

Selain digunakan sebagai sumber makanan secara langsung, pati dapat digunakan dalam bentuk yang berbeda setelah diproses secara kimiawi dan enzimatis seperti pati terhidrolisat, sirup glukosa, fruktosa, turunan pati atau maltodekstrin, atau siklodekstrin. Beberapa tanaman penghasil pati untuk industri adalah jagung, singkong, kentang dan gandum (DeBaere, 1999)

Tanaman mensintesis pati sebagai hasil dari fotosintesis, dimana energi cahaya dari sinar matahari yang masuk dalam proses tersebut diubah menjadi energi kimia. Pati disintesis dalam plastida yang ditemukan pada daun sebagai senyawa cadangan respirasi selama siklus gelap. Pati merupakan polimer dari glukosa yang berikatan satu sama lain melalui oksigen pada C1 yang disebut dengan ikatan glikosida. Ikatan glikosida stabil pada pH tinggi, namun dapat terhidrolisa pada pH rendah. Ujung dari rantai polimer terdapat gugus aldehid. Gugus ini disebut sebagai ujung pereduksi. Dua tipe polimer glukosa pada pati meliputi: (i) amilosa dan (ii) amilopektin. Amilosa merupakan polimer linear yang terdiri dari 6000 unit glukosa dengan ikatan α -1,4 glikosida. Jumlah dari residu glukosa juga ditunjukkan dengan istilah 'derajat polimerisasi'. Amilosa dalam kentang atau singkong memiliki derajat polimerisasi 1000-6000, sedangkan amilosa dalam jagung atau gandum memiliki derajat polimerisasi bervariasi dari

200 dan 1200. Amilopektin terdiri dari rantai ikatan α -1,4 linear pendek dengan 10 – 60 glukosa dan rantai samping ikatan α -1,6 dengan 15 – 45 unit glukosa. Amilopektin lengkap mengandung 2.000 – 200.000 unit glukosa, sehingga menjadi molekul alam yang terbesar (Buleon *et.al.*, 1998). Skema struktur granul yang mengandung amilosa dan amilopektin ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Skema struktur granul yang mengandung amilosa dan amilopektin (Buleon *et al.*, 1998)

Granul pati terdiri dari bentuk amorfosa dan daerah kristalin. Pada pati batang dan akar, daerah kristalin terdiri dari amilopektin, sedangkan amilosa berada pada daerah amorfosa. Amilopektin kurang larut dalam air, sedangkan amilosa dari granul pati larut dalam air panas. Hal ini menyebabkan granul pati cukup mudah untuk diekstrak dari tanaman. Ketika campuran air dan granul pati dipanaskan, granul akan mengembang hingga titik dimana tidak dapat kembali lagi. Proses pengembangan ini disebut dengan gelatinisasi. Selama proses ini, amilosa larut dan keluar dari granul dan menyebabkan peningkatan viskositas campuran. Selanjutnya, granul pecah dan menyebabkan dispersi koloid kental (Maarel *et al.*, 2002).

Ada 4 kelompok enzim pengkonversi amilum: (i) *endoamylases*, (ii) *exoamylases*, (iii) *debranching enzyme*, (iv) *transferases* (Maarel *et al.*, 2002).

1. *Endo dan exoamylases* (Endo dan eksoamilase)

Endoamilase mampu memutus ikatan α -1,4 glikosida pada bagian dalam (endo-) dari rantai amilosa dan amilopektin. α -*amylase* (EC 3.2.1.1) dikenal sebagai endoamilase. Hasil akhir dari produk reaksi α -*amylase* merupakan oligosakarida dengan berbagai ukuran. Eksoamilase memutus α -1,4 glikosida seperti *S-amylase* (EC 3.2.1.2) atau memutus antara ikatan α -1,4 dan α -1,6 glikosida, seperti *amyloglucosidase* atau *glucoamilase* (EC 3.2.1.3) dan α -*glucosidase* (EC 3.2.1.20). Eksoamilase beraksi pada residu glukosa terluar dari amilosa atau amilopektin

2. *Debranching enzymes* (Enzim Pemutus Rantai)

Enzim pemutus rantai merupakan enzim yang khusus memotong ikatan α ,1-6 glikosida, meliputi: *isoamylase* (EC 3.2.1.68) dan *pullanase* tipe I (EC 3.2.1.41). Perbedaan utama antara *pullulanases* dan *isoamylase* adalah kemampuan untuk menghidrolisis pullulan, polisakarida dengan unit maltotriose berulang dengan ikatan α ,1-6. *Pullulanases* dapat menghidrolisis ikatan α ,1-6 glikosida dalam pullulan dan amilopektin, sedangkan *isoamylase* hanya dapat menghidrolisis ikatan α ,1-6 pada amilopektin.

3. *Transferases* (Transferase)

Transferase memotong ikatan α ,1-4 glikosida dari molekul donor dan memindahkan bagian dari molekul donor pada glikosida penerima dengan pembentukan ikatan glikosida baru. Enzim *amylomaltase* (EC 2.4.1.25) dan *cyclodextrin glycosyltransferase* (EC 2.4.1.19) membentuk ikatan α ,1-4

glikosida yang baru, sementara branching enzyme (EC 2.4.1.18) membentuk ikatan $\alpha,1-6$ glikosida. Enzim *cyclodextrin glycosyltransferase* memiliki aktivitas hidrolitik yang rendah dan membuat oligosakarida siklik dengan 6,7 atau 8 residu glukosa. Siklodekstrin diproduksi melalui reaksi intramolekuler transglikosilasi dimana enzim memutus ikatan $\alpha,1-4$ glikosida. *Amylomaltases* memiliki reaksi enzimatik yang mendekati *cyclodextrin glycosyltransferases*. Perbedaan utamanya adalah *amylomaltase* menunjukkan reaksi transglikosilasi yang menghasilkan produk linear sedangkan *cyclodextrin glycosyltransferase* menghasilkan produk siklik. *Glucan branching enzyme* berperan dalam sintesis glikogen pada berbagai mikroorganisme dalam pembentukan ikatan $\alpha,1-6$ glikosida pada rantai samping glikogen (Maarel *et al.*, 2002).

B. Isolasi dan Pemurnian Enzim

1. Sentrifugasi

Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim intraseluler langsung digunakan di dalam sel dan sering ditemukan pada bagian membran dari sebuah organel sel, sedangkan enzim ekstraseluler dilepas dari sel ke lingkungan untuk menghidrolisis polimer di lingkungan (Maier *et al.*, 2000). Adapun enzim -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat dikeluarkan dari sel bakteri melalui sentrifugasi, tanpa perlu memecah sel. Prinsip sentrifugasi yaitu memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal, sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan berada di atas (Faatih, 2009). Sel-sel

mikroba biasanya akan mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Santos *et al.*, 2015). Hasil sentrifugasi diperoleh *pellet* (endapan pengotor) dan supernatan (ekstrak kasar enzim). Proses sentrifugasi dilakukan pada suhu dingin 2–4°C untuk mencegah denaturasi enzim karena proses tersebut akan melepaskan panas (Suhartono, 1989).

2. Fraksinasi dengan amonium sulfat

Pemurnian enzim bertujuan memisahkan enzim yang dikehendaki dari protein (enzim) lain yang tidak diinginkan. Fraksinasi merupakan proses pengendapan protein (enzim) dengan penambahan senyawa elektrolit seperti garam amonium sulfat, natrium klorida, atau natrium sulfat. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat guna menghilangkan protein-protein lain yang mudah larut serta mengendapkan protein (enzim) lebih banyak pada suatu konsentrasi garam tertentu.

Dalam proses fraksinasi, saat konsentrasi garam lebih tinggi maka kelarutan enzim dalam air menjadi lebih rendah. Kekuatan ion garam yang lebih tinggi menghasilkan muatan yang dapat membentuk ikatan kovalen dengan air. Akhirnya, sebagian air yang menghidrasi molekul enzim akan tertarik oleh garam sehingga enzim akan mengendap. Peristiwa ini disebut *salting out* (Wirahadikusumah, 1977).

Amonium sulfat memiliki keunggulan, diantaranya: kelarutan yang tinggi dalam air, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai molaritas tinggi dalam keadaan jenuh sehingga memiliki daya pengendapan yang efektif, memiliki efek penstabil terhadap enzim, panas pelarutannya rendah sehingga panas yang dihasilkan mudah hilang, dapat digunakan pada berbagai pH, larutan pekatnya

dapat mencegah pertumbuhan bakteri, dalam larutan amonium sulfat sebagian besar protein terlindungi dari denaturasi, dan pada larutan jenuhnya (4,04 M pada 20°C) memiliki kerapatan yang tidak cukup besar (sekitar 1,235 g/cm³) sehingga tidak mengganggu sedimentasi protein saat sentrifugasi (Scopes, 1993).

Berdasarkan penelitian Yandri *et al.* (2010a), aktivitas spesifik enzim - amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148 hasil pemurnian melalui fraksinasi dengan amonium sulfat memberikan hasil lebih baik sebesar 1534 U/mg, dibandingkan dengan ekstrak kasarnya sebesar 269,6 U/mg.

3. Dialisis

Dialisis merupakan pemurnian enzim berdasarkan difusi ion-ion garam yang berlangsung pada suatu membran semipermeabel, yaitu kantong selofan. Proses ini terjadi karena adanya perbedaan tekanan osmotik antara cairan yang ada di dalam dan di luar membran. Ion-ion garam yang memiliki tekanan osmotik lebih tinggi akan menuju luar membran, sedangkan molekul H⁺ dari buffer yang memiliki tekanan osmotik lebih rendah akan masuk ke dalam membran. Enzim yang memiliki berat molekul lebih besar akan tertahan di dalam membran, sedangkan ion-ion garam yang kecil akan keluar melalui pori-pori membran. Proses dialisis perlu dilakukan dalam suhu 2-4°C untuk mencegah denaturasi enzim (Suhartono, 1989). Untuk mencapai keseimbangan osmotik, maka dapat dilakukan beberapa cara untuk mempercepat pergerakan molekul yaitu:

- a. Pergantian larutan buffer dengan konsentrasi rendah secara kontinu pada selang waktu tertentu sampai ion-ion garam dalam membran dapat diabaikan (Lehninger, 2005).

- b. Membuat luas permukaan membran sebesar mungkin, misalnya menambah panjang kantong selofan (Nopiani, 2015).
- c. Mengubah lapisan larutan yang berhubungan langsung dengan membran secara terus menerus dengan mengaduk buffer menggunakan *stirrer* (Nopiani, 2015).

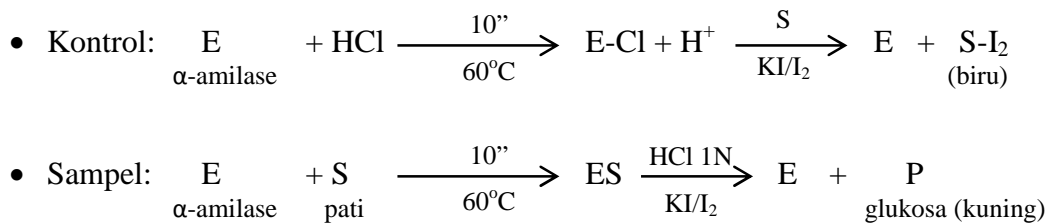
C. Uji Aktivitas Enzim -Amilase

Aktivitas Unit (AU) enzim adalah jumlah enzim yang menyebabkan transformasi substrat 1 μmol /menit dalam keadaan optimum. Kemurnian enzim dinyatakan dalam Aktivitas Spesifik (AS) yaitu jumlah Unit Aktivitas (AU) per miligram protein. Jumlah enzim dalam ekstrak suatu jaringan dapat ditentukan secara kuantitatif berdasarkan efek katalisis enzim tersebut melalui dua pendekatan, yaitu berdasarkan pengukuran substrat yang berkurang ataupun produk yang terbentuk.

Pengujian aktivitas α -amilase dilakukan dengan metode Fuwa dan metode Mandels. Aktivitas enzim dihitung sebagai fungsi absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Metode Fuwa digunakan pada tahap isolasi dan pemurnian enzim α -amilase. Adapun metode Mandels digunakan dalam penentuan data kinetika enzim α -amilase yaitu nilai K_M , V_{maks} , $t_{1/2}$, k_i , dan G_i (Ferialiana, 2011). Metode Mandels didasarkan pada pembentukan produk (glukosa) hasil hidrolisis substrat pati yang akan mengalami oksidasi setelah penambahan reagen DNS menghasilkan larutan berwarna merah. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 510 nm (Fessenden dan Fessenden, 1986). Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan menggunakan kurva

standar glukosa (Mandels *et al.*, 1976). Adapun metode Fuwa didasarkan atas berkurangnya substrat pati yang terhidrolisis dan menghasilkan warna biru setelah penambahan iodin. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada maks 610 nm (Fuwa, 1954; Fessenden dan Fessenden, 1986).

Berikut ini ilustrasi reaksi enzimatik pada metode Fuwa:



Pada kontrol, iodin (I_2) terperangkap dalam rantai spiral substrat (amilosa) menghasilkan larutan berwarna biru. Enzim sejak awal sudah diinaktivasi oleh HCl sehingga substrat tetap utuh karena tidak dihidrolisis oleh enzim, maka larutan akan tetap berwarna biru. Pada sampel, enzim akan mengikat substrat membentuk kompleks enzim-substrat. Kompleks tersebut akan bereaksi dengan larutan iodin membentuk larutan berwarna kuning yang dapat diukur secara spektrofotometri. Semakin banyak substrat yang dihidrolisis oleh enzim, maka warna larutan akan semakin kuning bening. Hal ini dikarenakan substrat pati yang berikatan dengan iodin dan enzim semakin berkurang dan berubah menjadi produk, yaitu glukosa. Selain itu, enzim melepas ikatan spiral antara iodin dan substrat sehingga warna menjadi kuning bening (Fuwa, 1954).

D. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

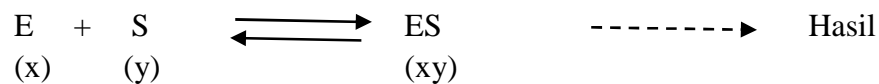
Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein (enzim) masih terdapat pada tiap fraksi pemurnian dengan aktivitas yang tetap baik (Ferialiana, 2011). Pengukuran didasarkan pada kurva standar BSA sebagai protein standar yang mengandung asam amino tirosin dan triptofan. Asam amino tersebut memiliki ikatan konjugasi yang mengalami transisi elektronik pada 280 nm (Boyer, 2012). Pada metode Lowry, ion Cu(II) bereaksi dengan ikatan peptida pada protein (enzim) membentuk senyawa kompleks. Selanjutnya, kompleks Cu²⁺ dengan protein yang terbentuk tersebut akan tereduksi menjadi Cu⁺ pada kondisi alkalis. Kemudian, Cu⁺ yang terikat pada rantai samping tirosin, triptofan, atau sistein dari protein (enzim) akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocelteau* yang akan mengikat protein. Reaksi ini secara perlahan akan mereduksi reagen tersebut menjadi heteromolibdenum menghasilkan warna hijau-kebiruan yang akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 750 nm. Intensitas warna yang dihasilkan tergantung pada kandungan triptofan dan tirosin pada protein (enzim) (Lowry *et al.*, 1951).

E. Kinetika Reaksi Enzim

Menurut Amstrong (1983), konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) merupakan parameter dalam kinetika reaksi enzim. Konsentrasi substrat sangat mempengaruhinya. Untuk itu, kita perlu mempelajari mekanisme suatu enzim untuk mengetahui bagaimana tahapan terjadinya pengikatan substrat dan pelepasan produk oleh enzim.

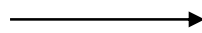
Nilai K_M dapat diartikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah dari kecepatan maksimumnya. Nilai K_M dan V_{maks} untuk setiap enzim bervariasi dan sangat khas dengan substrat tertentu pada suhu dan pH tertentu (Kamelia *et al.*, 2005). Jika nilai K_M kecil, maka kompleks enzim-substrat yang terbentuk memiliki afinitas yang tinggi. Jika Nilai K_M besar, maka kompleks enzim-substrat yang terbentuk memiliki afinitas yang rendah (Amstrong, 1983).

Mekanisme Michaelis-Menten menjelaskan kekuatan reaksi-reaksi enzim sebagai berikut :



E = enzim, ES = kompleks enzim substrat, dan S = substrat, sedangkan [S] [E] dan [ES]. Transformasi persamaan Michaelis – Menten yang paling banyak digunakan adalah gabungan persamaan Michaelis – Menten dengan Lineweaver - Burk. Persamaan Michaelis – Menten dan Lineweaver – Burk dapat dilihat di bawah ini dan gambarnya ditunjukkan pada Gambar 2 (Lehninger, 2005).

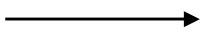
$$v_o = \frac{v_{maks} [S]}{K_M + [S]}$$



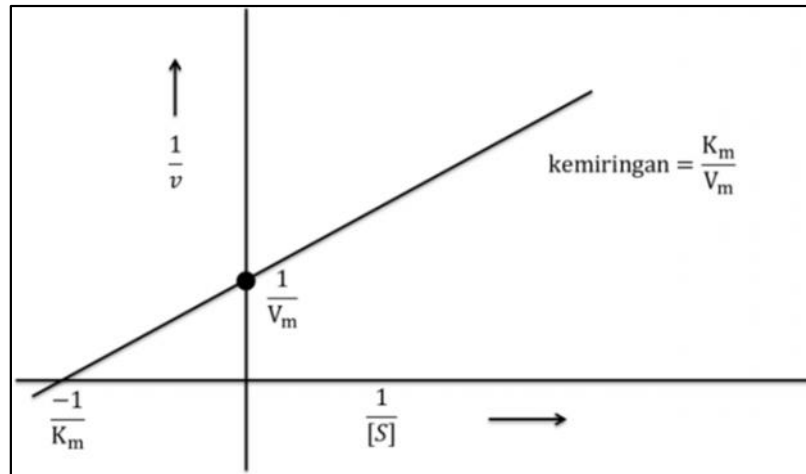
Persamaan Michaelis-Menten

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M + [S]}{v_{maks} [S]}$$

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{v_{maks} [S]} + \frac{1}{v_{maks}}$$



Persamaan Lineweaver-Burk



Gambar 2. Grafik Lineweaver-Burk (Lehninger, 2005)

F. Stabilitas Enzim

Kestabilan enzim diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penggunaan, penyimpanan, serta kemantapan struktur terhadap pengaruh kondisi fisiologis. Kestabilan enzim meliputi kestabilan termal dan kestabilan pH. Kestabilan ini sangat penting terutama saat aplikasi dalam industri yang bekerja pada pH dan suhu ekstrim. Penggunaan kondisi ekstrim tersebut dimaksudkan agar laju reaksi lebih tinggi, mengurangi kontaminan, serta mengurangi masalah viskositas. Stabilitas termal enzim ditentukan dari aktivitas sisa enzim tersebut setelah diinkubasi selama waktu tertentu.

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas unit enzim pada } t_i}{\text{Aktivitas unit enzim pada } t_0} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

Stabilitas enzim dapat dilihat pula dari nilai waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju reaksi inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (G_i). Penentuan

nilai waktu paruh ($t_{1/2}$) didasarkan pada persamaan laju reaksi inaktivasi (k_i) orde satu antara aktivitas sisa enzim pada t_0 ($[E]_0$) dan pada t_i ($[E]_i$).

$$\ln \frac{[E]_i}{[E]_0} = -k_i \cdot t_{1/2} \dots \dots \dots (2)$$

Adapun penentuan perubahan energi akibat denaturasi (G_i) enzim diturunkan dari persamaan termodinamika:

$$G_i = -RT \ln \frac{k_i \cdot h}{k_B \cdot T} \dots \dots \dots (3)$$

Keterangan:

R = konstanta gas ideal ($8,315 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

h = konstanta Planck ($6,625 \times 10^{-34} \text{ J.det}$)

k_B = konstanta Boltzman ($1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$)

(Yandri *et al.*, 2010a).

Peningkatan nilai G_i pada enzim amobil mengindikasikan bahwa konformasi struktur enzim menjadi lebih *folding* dari semula yang menyebabkan struktur enzim lebih kaku dan kurang fleksibel, sehingga energi yang diperlukan untuk mendenaturasi enzim tersebut semakin tinggi. Adapun penurunan nilai k_i diperkirakan karena kondisi enzim yang kurang fleksibel dalam larutan air, sehingga ketidakterlipatan (*unfolding*) protein menjadi berkurang dan kestabilan enzim meningkat (Yandri dan Wulandari, 2009).

G. Amobilisasi

Enzim (biokatalis) digunakan secara luas dalam industri karena kemudahannya dalam diproduksi, spesifitas substrat dan biokatalis yang ramah lingkungan. Akan tetapi kekurangan dari biokatalis adalah ketidakmampuan untuk digunakan kembali dan kestabilan kimia selama reaksi kimia berlangsung. Sehingga diperlukan amobilisasi yang cukup efisien untuk meningkatkan kestabilan kimia dan reproduksibilitas enzim. Amobilisasi enzim dapat dilakukan pada enzim maupun pada keseluruhan sel. Amobilisasi enzim adalah pengikatan enzim pada penyangga / matriks yang berbeda dari substrat dan produk (Datta *et al.*, 2012).

Beberapa karakteristik yang harus dimiliki oleh penyangga amobil:

1. Penyangga harus memiliki permukaan dengan konfigurasi yang sesuai dengan permukaan enzim.
2. Penyangga harus memiliki gugus reaktif yang cukup rapat pada permukaan sehingga dapat berikatan kovalen dengan dengan enzim.
3. Gugus reaktif pada enzim dan penyangga harus memberikan bentuk sterik dalam reaksi sehingga kompleks enzim penyangga membentuk struktur yang rigid
4. Gugus reaktif pada penyangga harus bereaksi dengan gugus pada permukaan enzim.
5. Gugus reaktif pada amobilisasi harus cukup stabil selama reaksi.

6. Penyangga harus mudah dipisahkan dengan enzim setelah amobilisasi dengan menghilangkan atau menghambat gugus reaktif pada penyangga tanpa mempengaruhi enzim (Mateo *et al.*, 2007).

Beberapa metode yang digunakan untuk amobilisasi enzim adalah :

1. *Carrier binding* (pembentukan ikatan)

Protein enzim memiliki residu asam amino yang mengandung gugus reaktif, gugus ionik dan gugus hidrofobik sebagaimana daerah hidrofobik. Residu asam amino dan daerah hidrofobik dapat berperan dalam amobilisasi enzim melalui ikatan kovalen, ikatan ion dan adsorpsi fisik.

- a. Ikatan kovalen

Ikatan kovalen enzim dan penyangga dapat terjadi karena adanya rantai asam amino samping seperti *arginine*, asam aspartat, histidin dan gugus fungsi seperti *imidazole*, *indolyl* dan hidroksi fenol (Datta *et al.*, 2012).

Enzim yang diamobil dengan ikatan kovalen memiliki keuntungan :

- 1) Tidak mudah lepas dari penyangga karena ikatan yang kuat.
- 2) Enzim amobil dapat dengan mudah berinteraksi dengan substrat karena enzim berada pada permukaan penyangga.
- 3) Terjadi peningkatan kestabilan terhadap panas karena kuatnya interaksi antara molekul enzim dan penyangga (Aehle, 2004).

Kekurangan enzim yang diamobil dengan ikatan kovalen :

- 1) Struktur aktif dari molekul enzim cenderung dihancurkan oleh modifikasi sebagian.

- 2) Interaksi yang kuat antara molekul enzim dan penyangga menghalangi pergerakan molekul enzim dan menurunkan aktivitas enzim.
- 3) Kondisi optimal untuk amobilisasi sulit untuk dicapai.
- 4) Metode ini tidak cocok untuk amobilisasi sel.
- 5) Penyangga pada umumnya tidak dapat diperbarui (Aehle, 2004).

Contoh penyangga yang menggunakan ikatan kovalen:

- 1) *Cyanogen bromide (CNBr)-agarose* dan *CNBr teraktifasi-sepharose* mengandung karbohidrat dan glutraldehid sebagai lengan yang meningkatkan kestabilan suhu pada enzim yang terikat secara kovalen.
- 2) Kestabilan yang tinggi dan biokatalis hiperaktif juga dilaporkan pada enzim yang terikat kovalen pada silika gel yang telah dimodifikasi dengan silanisasi dengan penghilangan gugus aldehid non reaktif.
- 3) Peningkatan waktu paruh dan stabilitas suhu juga diamati pada enzim yang ditambahkan silica dan kitosan (Datta *et al.*, 2012).

b. Ikatan ion

Prosedur pada metode ini sangat sederhana, penyangga dapat diperbarui dan enzim tidak dimodifikasi. Contoh penggunaan ikatan ion pada amobilisasi adalah pada produksi *L-amino acids* oleh *aminoacylase* (E.C. 3.5.1.14) yang diamobilisasi pada *DEAE-Sephadex*. Ikatan enzim pada penyangga dipengaruhi oleh buffer yang digunakan, pH, kekuatan ion, dan suhu. Beberapa turunan dari *Cellulose* dan *Sephadex* dapat digunakan untuk amobilisasi (Aehle, 2004).

c. Adsorpsi fisik

Pada metode ini, enzim menempel pada penyangga melalui ikatan hidrogen, ikatan *van der Waals* atau interaksi hidrofobik. Ikatan pada amobilisasi non kovalen dapat berubah dengan pengaruh dari kekuatan ion, suhu, maupun polaritas dari pelarut. Amobilisasi dengan adsorpsi fisik merupakan metode yang paling mudah dan tidak mengganggu aktivitas katalitik enzim namun kekurangan dari metode ini adalah lemahnya ikatan dapat menyebabkan lepasnya enzim dari matriks penyangga (Brena and Batista-Viera, 2006).

2. *Cross-linking* (ikatan silang)

Senyawa dengan 2 atau multi gugus fungsi dapat digunakan sebagai reagen untuk ikatan silang intermolekuler enzim. Ikatan silang enzim merupakan makromolekul tak larut. Selain glutaraldehid sebagai reagen ikatan silang beberapa senyawa lain yang digunakan adalah *toluene diisocyanate* atau *hexamethylene diisocyanate* (Aehle, 2004).

Untuk meningkatkan stabilitas kompleks enzim penyangga, penambahan glutaraldehid menunjukkan hasil yang cukup baik, karena terjadi ikatan silang antara glutaraldehid dengan enzim dan glutaraldehid dengan penyangga (Mateo *et al.*, 2007).

3. *Entrapment* (Penjebakan)

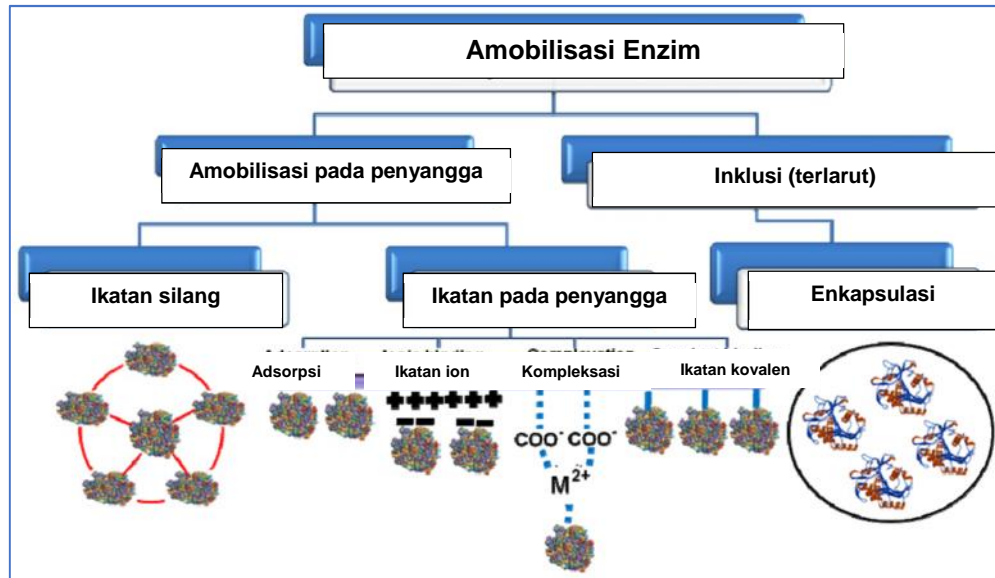
Penjebakan merupakan mengurung enzim dengan ikatan kovalen dan nonkovalen dalam gel maupun serat (Singh *et al.*, 2013).

Klasifikasi penjebakan biokatalis:

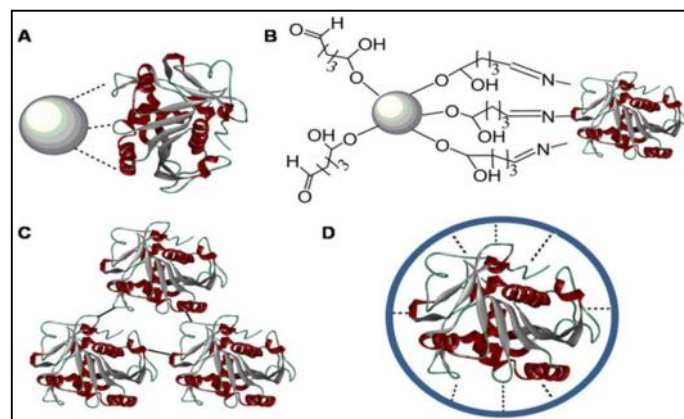
- a. *Lattice type* : biokatalis dijebak pada matrik gel yang disiapkan dari polisakarida, protein, atau polimer sintetik.
- b. *Microcapsule type* : biokatalis dijebak pada mikrokapsul dari polimer sintesis semi permeabel.
- c. *Liposome type* : biokatalis dijebak dalam membran cair yang disiapkan dari fosfolipid.
- d. *Hollow-fiber type* : biokatalis dipisahkan dari lingkungan dengan serat berongga.
- e. *Membrane type* : biokatalis dipisahkan dari larutan reaksi dengan membrane ultrafiltrasi.

Keuntungan dari metode penjebakan adalah tidak hanya enzim tunggal namun tapi juga beberapa enzim yang berbeda, organel sel dan beberapa sel dapat diamobilisasi dengan prosedur yang sama. Kerugian dari metode ini adalah substrat dengan bobot molekul yang tinggi kesulitan untuk memasuki enzim yang terjebak dan penyangga tidak dapat diperbarui (Aehle, 2014).

Secara keseluruhan, jalur amobilisasi enzim dapat diamati pada Gambar 3, dan skema amobilisasi enzim dengan ikatan kovalen dan non kovalen pada matriks eksternal dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 3. Jalur Amobilisasi Enzim (Singh *et.al.*, 2013)

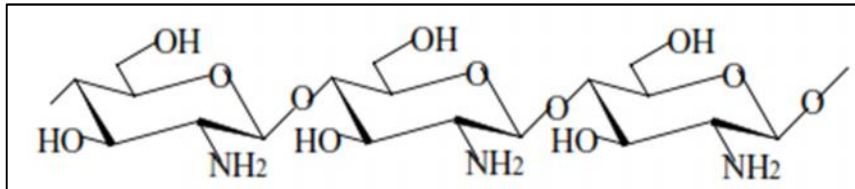


Gambar 4. Amobilisasi enzim dengan ikatan kovalen dan non kovalen pada matriks eksternal : A. Adsorpsi fisik pada nanopartikel, B. Ikatan kovalen enzim pada nanopartikel, C. ikatan silang kovalen, D. Mikroenkapsulasi enzim dalam misel (Singh *et.al.*, 2013)

H. Kitosan

Kitosan adalah suatu polisakarida berbentuk linier yang terdiri dari monomer (1-4)-2-amino-2-deoxy--D-glukosa dan merupakan turunan deasetilasi dari kitin (Cetinus *and* Oztop, 2003). Struktur molekul kitosan dapat dilihat pada

Gambar 5. Kitin merupakan jenis polisakarida terbesar ke dua di bumi setelah selulosa dan dapat ditemukan pada eksoskeleton invertebrate dan beberapa fungi pada dinding selnya. Kitin merupakan polimer dari (1 → 4)-2-asetamin-2-deoxy-D-glukosa.

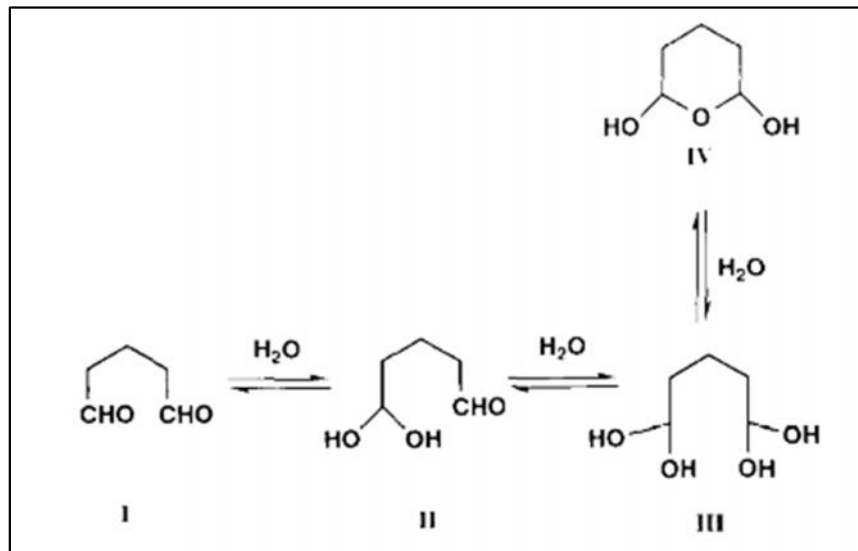


Gambar 5. Struktur molekul Kitosan (Krajewska, 2004)

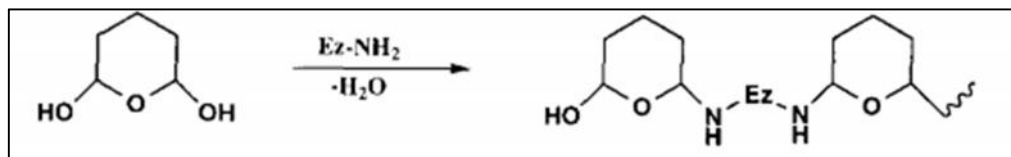
Kitosan merupakan rantai poliglukosamin dengan bobot molekul yang tinggi, dan memiliki gugus amin reaktif dan gugus hidroksil yang memungkinkan terjadinya modifikasi kimia. Adanya gugus amin menyebabkan kitosan menjadi polielektrolit kation ($pK_a \sim 6.5$). Kitosan larut pada larutan asam dengan pH dibawah 6.5 dan ketika terlarut memiliki muatan positif pada gugus amin yang dapat berikatan dengan permukaan bermuatan negatif, beragregasi dengan komponen polianionik sehingga dapat mengkelat ion logam berat. Karena sifat yang dimilikinya, kitosan dapat diaplikasikan dalam bidang bioteknologi, sebagai matrik kromatografi, membran dalam membran pemisahan, dan sebagai penyangga pada amobilisasi enzim (Krajewska, 2004).

Metode yang dapat digunakan dalam amobilisasi enzim dengan kitosan adalah penjebakan dalam manik kitosan, pembentukan ikatan kovalen dengan film transparan kitosan atau dengan penggunaan glutaraldehid membentuk ikatan silang. Glutaraldehid merupakan senyawa penaut silang yang banyak digunakan karena preparasi yang mudah dan harga terjangkau. Senyawa ini memiliki dua

gugus aldehid yang dapat membentuk ikatan silang antara enzim dengan matrik penyangga amobilisasi (Cetinus *and* Oztop, 2003). Struktur Glutaraldehid terlarut dalam air ditunjukkan pada Gambar 6 dan reaksi antara glutaraldehid dengan enzim ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 6. Struktur Larutan Glutaraldehid dalam Air (Walt and Agayn, 1994)



Gambar 7. Reaksi antara glutaraldehid dengan enzim (Walt and Agayn, 1994)

I. Produksi Bioetanol

Dalam pembuatan bioetanol, bahan baku yang digunakan dapat berasal dari :

1. Tanaman penghasil gula,

Pada tanaman penghasil gula, seperti tebu, tetes tebu, bit, dan sorgum manis, ragi dapat langsung mengkonsumsi gula sederhana dan mengkonversikannya

menjadi etanol. Untuk meningkatkan nilai dari tetes tebu limbah hasil industri gula, saat ini dikembangkan metode produksi gula dan etanol secara simultan. Pada proses fermentasi, gula diubah menjadi etanol dengan penambahan mikroorganisme. Saat ini mikroorganisme yang sering digunakan untuk proses fermentasi adalah *Saccharomyces cerevisiae* (Liang *et al.*, 2012).

2. Tanaman pati

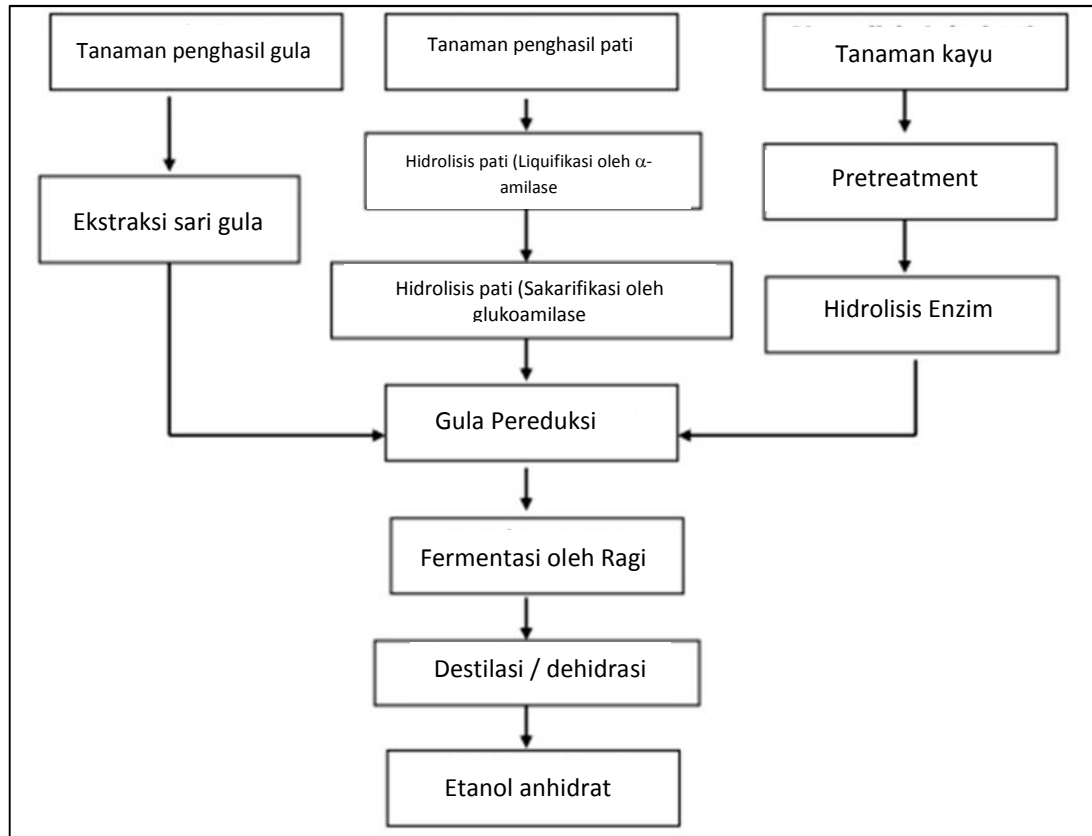
Etanol yang diproduksi dari material yang mengandung pati, tahap konversi dari pati menjadi etanol meliputi tahap liquifikasi (untuk menghasilkan pati yang larut) dan tahap hidrolisis (untuk menghasilkan glukosa). Glukosa yang dihasilkan selanjutnya difermentasi untuk menghasilkan alkohol. Sebagian besar pati mengandung kurang lebih 20-30% amilosa dan sisanya amilopektin yang berbentuk granul sehingga sulit berinteraksi dengan enzim hidrolisis. Dengan pemanasan dalam air, struktur granul dipecahkan sehingga polimer glukosa lebih mudah larut dan dapat berinteraksi dengan enzim. Proses ini disebut dengan gelatinisasi. Suhu dimana sifat pati berubah disebut suhu gelatinisasi. Liquifikasi merupakan langkah dimana pati didegradasi oleh endoenzim, α -amilase yang hanya memotong α -1,4 dan menyebabkan turunnya viskositas pati yang dimasak. Umumnya enzim liquifikasi memiliki aktivitas pada suhu tinggi (85°C) sehingga enzim dapat mengurangi kekentalan pasta pati selama dimasak. Selanjutnya, dekstrin, hasil dari liquifikasi, dihidrolisis menjadi glukosa oleh enzim glukamilase yang dapat menghidrolisis ikatan α -1,4 dan α -1,6 glikosida. Glukosa yang dihasilkan selanjutnya diubah menjadi etanol oleh ragi. Pada akhir fermentasi diperoleh bir dengan kandungan etanol 10% v/v, selanjutnya didestilasi

dan dehidrasi untuk menghilangkan air dan pengotor lainnya sehingga diperoleh etanol anhidrat (Sriroth *et al.*, 2012).

3. Bahan lignoselulosa yang berasal dari limbah pertanian.

Proses untuk mengkonversi dari biopolymer biomassa menjadi gula yang dapat difermentasi disebut hidrolisis. Ada beberapa metode yang digunakan dalam hidrolisis, yang pertama menggunakan asam sebagai katalis dan kedua menggunakan enzim selulase. Preatreatment diperlukan untuk menghilangkan lignin dan meningkatkan porositas dari materi lignoselulosa untuk proses enzimatik. Selulase merupakan protein yang terbagi dalam 3 kelompok: *endoglukanase* yang bekerja pada daerah kristalin dalam serat selulosa membentuk ujung rantai bebas, *exoglukanase* yang menghidrolisis ikatan 1,4-glikosida membentuk selobiose, dan *S-glucosidase* yang mengubah selo-oligosakarida dan disakarida selobiose menjadi residu glukosa (Verardi *et al.*, 2012).

Secara singkat, bagan diagram alir pembuatan bioetanol ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Diagram Alir Produksi Bioetanol (Sriroth *et al.*, 2012).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2016 – Oktober 2017 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis Spektrofotometri UV-Vis dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia dan Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis Etanol dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gajah Mada.

B. Bahan dan Alat

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dan Jamur *Saccharomyces cerevisiae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Fermentasi ITB. Bahan kimia yang digunakan adalah: ekstrak ragi, pati, agar NA, KH_2PO_4 , KCl, FeSO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2CO_3 , NaOH, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, I_2 , KI, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_2SO_3 , fenol, Na-K tartrat, pereaksi Folin Ciocalteu, NaHCO_3 , asam dinitrosalisilat dan bahan kimia lain dengan derajat proanalisis. Pemurnian enzim dengan metode dialisis dilakukan dengan menggunakan kantong selofan dan buffer fosfat pH 6,5. Kitosan produksi Sigma-Aldrich digunakan dalam amobilisasi. Glutaraldehid produksi Sigma-Aldrich digunakan untuk preparasi amobilisasi. Protein standar

untuk penentuan kadar protein digunakan bovin serum albumin diperoleh dari E. Merck.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Sentrifuga Beckman, J2-21, *Gyrotory shaker* New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison N. J. USA 610; Spektrofotometer UV-Visible Shimadzu; Mikropipet Socorex; Oven Memmert-Germany; Neraca analitis Sartorius-Germany; pH meter Fisher-Canada; pengaduk magnet NUOVA II-USA; *Autoclave* model N25X; pipet Eppendorf; peralatan gelas (gelas kimia; tabung reaksi; Erlenmeyer dan peralatan gelas lainnya).

C. Metode Penelitian

Tahapan penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut : produksi, isolasi, pemurnian, karakterisasi dan amobilisasi enzim, dilanjutkan dengan hidrolisis enzimatis pati onggok menggunakan enzim amobil dan fermentasi hasil hidrolisis menjadi bioetanol.

1. Produksi Enzim α -amilase

α -Amilase diproduksi pada media fermentasi yang mengandung: pati 0,5%; ekstrak ragi 0,5%; KH_2PO_4 0,05%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02% dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01% dengan pH 6,5. Suhu fermentasi 32°C; dan lama waktu fermentasi 72 jam (Yandri *et al.*, 2010a). Media pertumbuhan ini sesuai dengan media pertumbuhan *Saccharomycopsis fibuligera* untuk menghasilkan α -amilase (Gogoi *et al.*, 1987).

2. Isolasi α -amilase

α -Amilase dalam media fermentasi dipisahkan dari sel bakteri lokal *B. subtilis* ITBCCB148 dengan sentrifugasi dingin pada laju 5000 rpm selama 20 menit sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim (Yandri *et al.*, 2010a).

3. Pemurnian α -amilase

Pemurnian enzim dilakukan bertahap, yaitu: fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan garam amonium sulfat berbagai tingkat kejenuhan dan dialisa sehingga diperoleh enzim hasil pemurnian (Yandri *et al.*, 2010a).

a. Fraksinasi dengan ammonium sulfat

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh selanjutnya diendapkan dari larutannya dengan amonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-15)%; (15-30)%; (30-45)%; (45-60)%; (60-75)% dan (75-90)% untuk mendapatkan pola yang menentukan pada derajat kejenuhan mana didapatkan aktivitas spesifik enzim yang tertinggi.

Adapun proses pengerjaannya yaitu ekstrak kasar enzim yang diperoleh diukur volumenya, selanjutnya dilakukan penambahan garam ammonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan ammonium sulfat selanjutnya dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 6,5 dan diuji aktifitasnya dengan metode Fuwa dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry untuk mengetahui fraksi-fraksi yang mengandung enzim

amilase dengan aktivitas spesifik yang tinggi. Filtrat yang didapat dari fraksi (0-15)% digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan (15-30)% dengan prosedur yang sama dan seterusnya sampai fraksi (75-90)%. Setelah diketahui fraksi-fraksi yang mengandung enzim selulase dengan aktivitas spesifik tertinggi, maka langkah selanjutnya adalah melakukan fraksinasi ulang pada tingkat fraksinasi tersebut, sehingga enzim dapat terendapkan secara maksimal (Yandri *et.al.*, 2010a).

b. Dialisis

Enzim hasil fraksinasi dengan aktivitas tertinggi kemudian dimurnikan melalui dialisis pada membran semipermeabel (kantong selofan). Endapan tersebut dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis menggunakan buffer fosfat 0,01 M pH 6,5 selama 24 jam pada suhu dingin. Selama dialisis, pergantian buffer selama 4 jam dilakukan agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi (Ferialiana, 2011). Selanjutnya, uji aktivitas dengan metode Fuwa dilakukan dan kadar proteinnya diukur dengan metode Lowry.

4. Uji Aktivitas α -amilase

a. Metode Fuwa

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan metode iodine (Fuwa, 1954). Enzim yang telah diencerkan dengan tepat sebanyak 250 μ L ditambahkan ke dalam 250 μ L larutan pati 0,2% dalam 0,1 mol/L bufer fosfat pH 6,0 dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 250 μ L HCl 1 N dan kemudian ditambahkan 250 μ L pereaksi iodine (I_2 0,2% dan KI 2%),

dan 4 mL air suling ke dalam campuran reaksi. Setelah campuran diaduk rata serapannya diukur pada λ 600 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama, hanya menggunakan 250 μ L enzim yang sudah diinaktifkan.

Aktivitas enzim α -amilase ditentukan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Unit} = \frac{(\text{OD kontrol} - \text{OD sampel})}{\text{OD kontrol}} \times 2 \times 4 \times \text{faktor pengenceran}$$

b. Metode Mandels

Berdasarkan glukosa yang terbentuk. Sebanyak 0,5 mL enzim, 0,5 mL larutan pati 0,1% dalam bufer sitrat pH 6,0 dicampur, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C. Setelah itu ditambahkan 2 mL pereaksi asam dinitrosalisilat, dididihkan selama 10 menit pada penangas air dan didinginkan. Setelah dingin, serapannya diukur pada panjang gelombang 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Kurva standar glukosa pada penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 12.

Pereaksi asam dinitrosalisilat (Mandels *et al.*, 1976) terdiri dari: asam dinitrosalisilat 1%, fenol 0,2%, Na₂SO₃ 0,05%, NaOH 1%, garam Rochel (Na/K-tartrat) 40% 1mL. Semua zat dicampurkan dan dicukupkan volumenya hingga 100 mL.

5. Penentuan Kadar Protein

a. Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas α -amilase metode Lowry

Pereaksi A : 2 gram Na₂CO₃ dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.

- Pereaksi B : 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na/K-tartrat 1%.
- Pereaksi C : 2 mL pereaksi B + 100 mL pereaksi A.
- Pereaksi D : reagen *folin ciocelteau* diencerkan dengan aquades 1:1.
- Larutan Standar : Larutan BSA (Bovine Serum Albumin) dengan kadar 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ppm).

b. Penentuan kadar protein metode Lowry

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry *et al.* (1951).

Penentuan kadar protein dilakukan sebagai berikut: sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah 0,9 mL air dan 5 mL pereaksi C, dikocok dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, dikocok dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Serapan dibaca pada λ 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan protein standar albumin serum sapi. Kurva standar albumin sapi dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 11.

6. Amobilisasi Enzim Hasil Pemurnian

Amobilisasi enzim pada kitosan dilakukan melalui metode pembentukan ikatan silang dengan glutaraldehid, dengan prosedur sebagai berikut (Cetinus *and* Oztop., 2003):

a. Penentuan konsentrasi glutaraldehid optimal

Sebanyak 0,25 g serbuk kitosan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi lalu distabilkan menggunakan buffer fosfat 0,1 M pH 6,5. Kemudian matriks

dipisahkan dari larutannya melalui sentrifugasi lalu ditambahkan 0,25 mL enzim hasil dialisis dan 0,25 mL glutaraldehid dengan variasi konsentrasi yaitu 0%; 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8% dan 1%. Campuran tersebut diaduk pada suhu ruang selama \pm 30 menit, dicuci dengan buffer fosfat 0,1 M pH 6,5, kemudian dipisahkan melalui sentrifugasi. Filtrat dipipet 0,25 mL sebagai kontrol pengujian mendels dan sisa filtrat dibuang. Endapan enzim kitosan ditambahkan dengan substrat amilum 0,1 % 0,5 mL dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit sambil diaduk tiap 10 menit. Campuran tersebut dipisahkan melalui sentrifugasi. Filtrat dipipet sebanyak 0,5 mL ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1,0 mL pereaksi DNS dan dilakukan pengujian aktivitas enzim menggunakan metode Mandels. Konsentrasi glutaraldehid yang dapat memberikan aktivitas enzim tertinggi ditetapkan sebagai konsentrasi glutaraldehid optimum (Krajewska *et.al.*, 1990).

b. Penentuan pH pengikatan optimal

Sebanyak 0,25 g serbuk kitosan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi lalu distabilkan menggunakan buffer fosfat 0,1 M dengan variasi pH yaitu 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; dan 7,5. Matriks dipisahkan dari larutannya melalui sentrifugasi lalu ditambahkan 0,25 mL enzim hasil dialisis dan 0,25 mL glutaraldehid dengan konsentrasi optimum. Campuran tersebut diaduk pada suhu ruang selama \pm 30 menit, dicuci dengan buffer fosfat 0,1 M sesuai variasi pH masing-masing lalu dipisahkan melalui sentrifugasi. Filtrat dipipet 0,25 mL sebagai kontrol pengujian mendels dan sisa filtrat dibuang. Endapan enzim kitosan ditambahkan dengan substrat amilum 0,1 % sebanyak 0,5 mL dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30

menit sambil diaduk tiap 10 menit. Campuran tersebut dipisahkan melalui sentrifugasi. Filtrat dipipet sebanyak 0,5 mL ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1,0 mL pereaksi DNS dan dilakukan pengujian aktivitas enzim menggunakan metode Mandels. pH buffer yang dapat memberikan aktivitas enzim tertinggi ditetapkan sebagai pH optimum.

7. Karakterisasi Enzim -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Amobilisasi

Karakterisasi enzim hasil amobilisasi meliputi: penentuan suhu optimum, penentuan data kinetika, dan penentuan kestabilan terhadap suhu dan pH.

a. Penentuan suhu optimum enzim hasil amobilisasi

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim murni dan amobil dilakukan dengan memvariasikan suhu inkubasi yaitu 55; 60; 65; 70; 75 dan 80 selama 30 menit. Selanjutnya, diuji dan dibandingkan aktivitas sisa (%) enzim murni dan amobil menggunakan metode Mandels.

b. Uji kestabilan enzim hasil amobilisasi terhadap pH dan suhu

Uji kestabilan termal enzim sebelum dan sesudah amobilisasi dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama periode waktu 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 menit pada suhu 60°C (Yandri *et al.*, 2010a).

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

Penentuan nilai konstanta laju inaktivasi termal (k_i) dan $t_{1/2}$ didasarkan pada persamaan laju reaksi inaktivasi (k_i) orde satu antara aktivitas sisa enzim pada t_0 ($[E]_0$) dan aktivitas sisa enzim pada t_i ($[E]_i$), yaitu:

$$\ln \frac{[E]_i}{[E]_o} = -k_i \cdot t_{1/2}$$

Adapun penentuan perubahan energi akibat denaturasi (G_i) enzim murni dan enzim amobil, diturunkan dari persamaan termodinamika:

$$G_i = -RT \ln \frac{k_i \cdot h}{k_B \cdot T}$$

Keterangan:

R = konstanta gas ideal ($8,315 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal (menit^{-1})

h = konstanta Planck ($6,625 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{det}$)

k_B = konstanta Boltzman ($1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$)

(Yandri *et al.*, 2010a).

d. Penentuan data kinetika enzim hasil amobilisasi

Nilai Konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) hasil pemurnian ditentukan dari persamaan Lineweaver-Burk dengan memvariasikan konsentrasi substrat (larutan pati) yaitu 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1% pada suhu 60°C selama 30 menit. Data hubungan antara laju reaksi enzim terhadap konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva Lineweaver-Burk.

e. Pemakaian berulang enzim hasil amobilisasi

Enzim amobil yang telah dipakai (direaksikan dengan substrat) dicuci dengan buffer fosfat pH optimum lalu disentrifugasi. Kemudian endapan enzim amobil direaksikan dengan substrat yang baru. Selanjutnya diuji dan dibandingkan

aktivitas sisa (%) enzim amobil sebelum dan sesudah pemakaian berulang menggunakan metode Mandels.

8. Konversi Enzimatis Pati Onggok Menjadi Gula Pereduksi Glukosa Menggunakan Enzim Hasil Amobilisasi

Enzim hasil amobilisasi yang telah dikarakterisasi digunakan untuk proses konversi enzimatis pati onggok menjadi gula pereduksi

a. Pembuatan bubur onggok

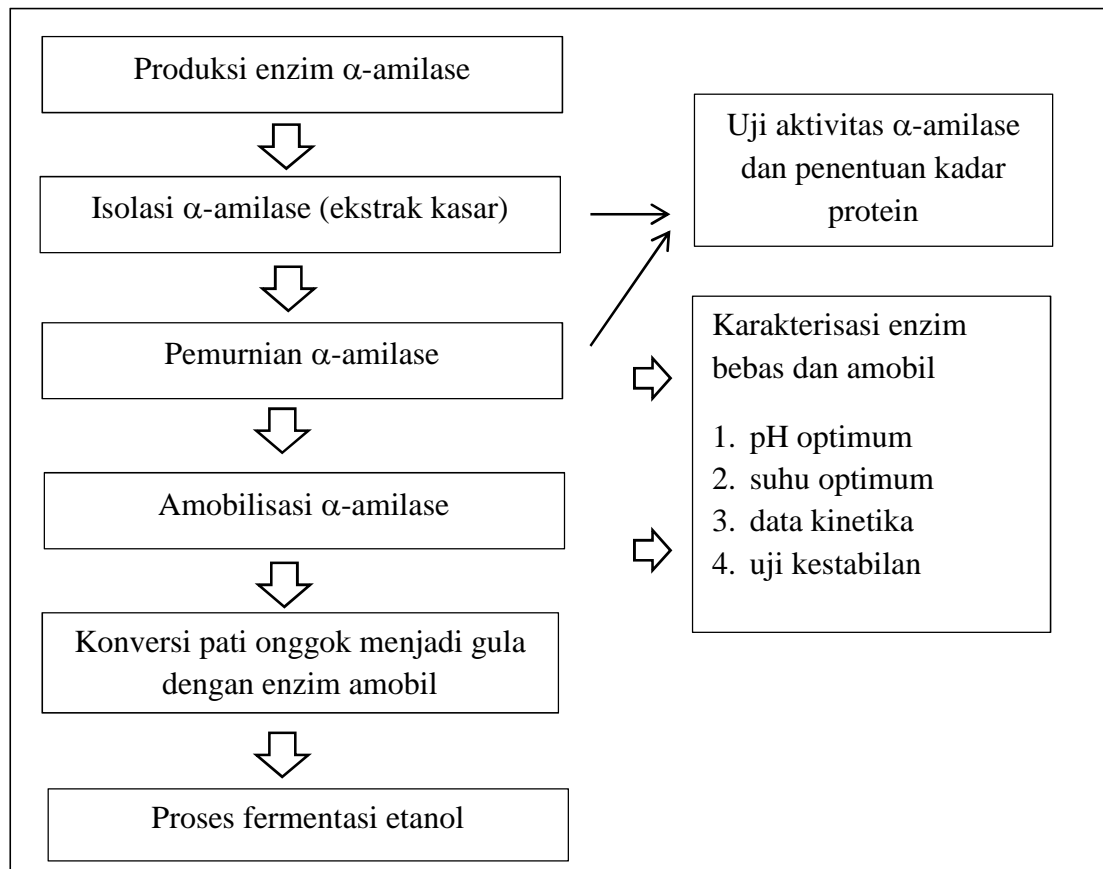
Medium yang digunakan adalah tepung onggok yang telah dibuat bubur, dengan konsentrasi 10%. Sebanyak 10 g onggok ditimbang dan ditambahkan 100 mL aquades. Larutan onggok selanjutnya dipanaskan sambil diaduk sampai semua onggok tercampur selama 15 menit (Juariah dkk, 2004).

b. Konversi pati onggok menjadi glukosa dengan enzim amobil

Sebanyak 5 gram kitosan dilarutkan dalam buffer fosfat pH optimum. Memisahkan filtrat dan matrik dengan sentrifugasi. Matrik kitosan ditambahkan dengan glutaraldehid 1% sebanyak 5 mL dan enzim hasil dialisa sebanyak 5 mL dan diaduk selama 30 menit. Komplek enzim-kitosan dicuci dengan buffer fosfat pH optimum dan dipisahkan dengan sentrifugasi selama 20 menit. Matrik enzim-kitosan ditambahkan dengan 50 mL bubur onggok dan diinkubasi pada suhu 75°C selama 30 menit. Filtrat dan matrik enzim-kitosan dipisahkan dengan sentrifugasi. Filtrat disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

9. Proses Fermentasi Etanol

Volume medium gula reduksi untuk fermentasi adalah 50 mL. Medium yang telah disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit, selanjutnya didinginkan dan diinokulasi dengan 2 mL kultur 24 jam *Saccharomyces cereviciae*. Media inokulasi mengandung glukosa 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 % dan Yeast Extract 0,5%. Media fermentasi mengandung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 % (Elevri dan Putra, 2006). Selanjutnya diinkubasi pada kondisi anaerob selama 5 hari. Pemanenan dilakukan dengan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 20 menit. Hasil etanol selanjutnya akan dianalisa dengan kromatografi gas (Sutiyono dkk,2013). Diagram alir pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Diagram Alir Metode Penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian hingga tahap dialisis adalah $4504,15 \text{ U mg}^{-1}$ dan kemurniannya meningkat hingga 4,87 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 24,38%.
2. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 65°C , $K_M = 1,63 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{\text{maks}} = 39,68 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, dan aktivitas sisa pada uji stabilitas dalam suhu 60°C selama 80 menit sebesar 58 %.
3. Enzim α -amilase hasil amobilisasi memiliki suhu optimum menjadi 75°C , $K_M = 3,514 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{\text{maks}} = 7,05 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, dan aktivitas sisa pada uji stabilitas dalam suhu 60°C selama 80 menit sebesar 86,15 %.
4. Enzim amobil dapat digunakan berulang hingga 6 (enam) kali pengulangan.
5. Uji stabilitas enzim hasil pemurnian pada suhu 60°C memiliki nilai $t_{1/2} = 113,61$ menit, $k_i = 0,0061 \text{ menit}^{-1}$, dan $G_i = 107,34 \text{ kJ mol}^{-1}$.
6. Uji stabilitas enzim hasil amobilisasi pada suhu 60°C memiliki nilai $t_{1/2} = 433,13$ menit, $k_i = 0,0016 \text{ menit}^{-1}$, dan G_i yaitu $111,06 \text{ kJ mol}^{-1}$.
7. Hasil fermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae* pada pati onggok yang dikonversi dengan enzim α -amilase diidentifikasi sebagai bioetanol dengan kadar berkisar 0,129%.

B. Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka disarankan untuk melakukan optimasi pada proses konversi enzimatik menggunakan α -amilase amobil sehingga didapatkan kadar glukosa yang optimal sebagai substrat dalam proses fermentasi. Selain itu, perlu juga dilakukan optimasi kondisi fermentasi meliputi pH fermentasi, suhu, suplemen dalam media, konsentrasi substrat, banyaknya inokulum yang ditambahkan dan lama fermentasi sehingga diharapkan mendapatkan kadar etanol yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Aehle, W. (ed). 2004. *Enzyme in Industry: Production and Applications. Third edition*. Willey-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinhem: 71-75.
- Armstrong, F.B. 1983. *Biochemistry, Second Edition*. Oxford University Press. 135-139; 142-143.
- Bayramoglu, G., M. Yilmaz, M.Y. Arica. 2004. Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. *Food Chemistry*, **84**: 591-599.
- Boyer, R.F. 2012. *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques Second Edition*. Pearson Education, Inc. USA: 67-69.
- Brena, B.M. and F. Batista-Viera. 2006. Immobilization of Enzym. *Dalam : Method in Biotechnology : Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition* (JM Guisan.,ed). Humana Press Inc, Totowa. NJ: 15-30.
- Buleon, A., P. Colonna, V. Planchot, S. Ball. 1998. Starch granules : structure and biosynthesis. *Biological Macromolecules*, **23**: 85-112.
- Cetinus, S.A. and H. Nursevin Oztop. 2003. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme and Microbial Technology*, **32**, 889-894.
- Chang, M.Y. and R.S. Juang. 2004. Activities, stabilities and reaction kinetics of three free and choitosan-clay composite immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, **36**: 75-82.
- Chaplin, M.F. and C. Bucke. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. Cambridge : 22-23.
- Datta, S., L.R. Christena, Y.R.S Rajaram. 2012. Review Article : Enzyme immobilization : an overview on rechniques and support materials, *3 Biotech* : 1-10
- DeBaere, H. 1999. Starch policy in European community. *Starch/Stärke*, **51**, 189 – 193.

- Elevri, P.A. dan S.R. Putra. 2006. Produksi etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang diamobilisasi dengan agar batang. *Akta Kimindo*, **1** (2): 105-114.
- Faatih, M. 2009. Isolasi dan digesti dna kromosom. *J. Saintex*. **10** (1) : 61 – 67.
- Feraliana. 2011. Amobilisasi enzim -amilase dari *bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan menggunakan karboksi metil sephadex C-50 (cm-sephadex c-50). *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Fessenden, R.J dan J.S. Fessenden. 1986. *Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 2, Alih Bahasa : Aloysius Hadyana Pudjaatmaka, Ph.D.* Erlangga. Jakarta: 417-418.
- Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrat. *The Journal of Biochemistry*, **41** (3): 583-603.
- Ghiaci. M., H. Aghaei, S. Soleimanian, M.E. Sedaghat. 2009. Enzym immobilization : Part 2 Immobilization of alkaline phosphatase in Na-bentonit and modified bentonite. *Applied Clay Science*, **43**: 308-316.
- Gogoi, B.K., R.L. Bezbaruah, K.R. Pillai, J.N. Baruah. 1987. Production, purification and characterization of an α -amylase produced by *Saccharomycopsis fibuligera*, *Journal of Applied Biochemistry*, **63**: 373-379.
- Juariah, S., A.Susilowati., R. Setyaningsih. 2004. Fermentasi etanol dari limbah padat tapioka (onggok) oleh *Aspergillus niger* dan *Zymomonas mobilis*. *Bioteknologi*, **1**(1): 7-12.
- Kamelia, R., M. Sindumarta, dan D. Natalia. 2005. Isolasi dan karakterisasi protease intraseluler termostabil dari bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP1. *Seminar Nasional MIPA*. Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Krajewska, B. 2004. Application of chitin- and chitosan- based materials for enzyme immobilization : a review. *Enzyme and Microbial Technology* **35**: 126-139.
- Konsula, Z., M. Liakopoulou-Kyriakides. 2004. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, **39**: 1745-1749.

- Lehninger, A.L., D.L. Nelson, M.C. Cox. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition*. W.H. Freeman & Company: 191-238
- Liang, L., Riyi Xu, Qiwei Li, X. Huang, Yuxing An, Y. Zhang, Y Guo. 2012. Simultaneous Production of Sugar and Ethanol from Sugarcane in China, the Development, Research, and Prospect Aspect. *Bioethanol*, Intechweb.org: 76-80.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry* : 193-265.
- Maarel, M.J.E.C., B. van der Veen, J.C.M. Uitdehaag, H. Leemhuis, L.Dijkhuizen. 2002. Properties and application of starch-converting enzyme of the α amylase family. *Journal of Biotechnology* **94**: 137-155.
- Maier, R., I. Pepper and C.P. Gerba. 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press. London : 212-220.
- Mandels, M., R. Andreotti, C. Roche. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology Bioengineering* **6**: 21-33.
- Mateo, C., J.M Palomo, GF. Lorente, JM Guisan, RF. Lafuente .2007. Improvement of enzym activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzym and Microbial Technology* **40**: 1451-1463
- Millati, R., C. Niklasson, M.J. Taherzadeh. 2002. Effect of pH, time and Suhue of Overliming on Detoxification of dilute-acid Hidrolyzates for Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* **38**: 515-522.
- Nopiani. 2015. Peningkatan kestabilan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* 27853 dengan amobilisasi menggunakan bentonit. *Tesis*. Program Pascasarjana Magister Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Santos, A.S., N. Rosa, M. Souza, H.K. Philippsen, and E. Medeiros. 2015. Thermal-stability of enzyme activity and its application in the hydrolysis of starch reidue from *Mandioca* processing. *International Journal of Science Research*. **4** (10) : 2277-8179.
- Scopes, R.K. 1993. *Protein Purification : Principle and Practice Third Edition*. Springer Verlag. New York: 77-85.
- Singh, R.K., M.K. Tiwari, R. Singh, J.K. Lee. 2013. Review : From protein engineering to immobilization : promising strategies for the upgrade of

- industrial enzyme, *International Journal of Molecular Sciences*, **14**: 1232-1277.
- Sriroth, K., S. Wanlapatit, K. Piyachomkwan. 2012. Cassava Bioethanol, *Bioethanol*. Intechweb.org: 3-29.
- Stryer, L. 1975. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company. New York: 643-645
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sutiyono, S., L. Edahwati, N. Dyah. 2013. Etanol dari hasil hidrolisis onggok, *Jurnal Teknik Kimia*, **8** (1): 33-36.
- Tesfaw, A. and F. Asssefa. 2014. Review article current trend in bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: substrate, inhibitor reduction, growth variable, coculture and immobilization. *International Scholarly Research Notices* **2014**: 11 pg.
- Verardi, A., I. de Bari, E. Ricca and V. Calabro. 2012. Hidrolysis of lignocellulosic biomass: current status of processes and technologies and future perspectives. *Bioethanol*. Intechweb.org: 95-114.
- Walt D.R., V.I. Agayn. 1994. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends in analytical chemistry*, **13** (10): 425-427.
- Wahyuono, R.A., M. N. Hakim, S. A. Santoso. 2014. Feasibility study on the production of bioethanol from tapioca solid waste to meet the national demand of biofuel. *Energy Procedia*, **65**: 324-330.
- Wijayanti, D.K., C. Lestari, Mulyanto. 2014. Pengaruh overliming pada pembuatan etanol dari limbah pada pabrik tepung tapioca (onggok) dengan hidrolisis asam dan enzim. *Jurnal Teknik Pomits* **1** (1): 1-3.
- Wingfield, P.T. 2001. Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science Author Manuscript HHS Public Access*: 1-10.
- Wirahadikusumah, M. 1977. *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB. Bandung.
- Xavier, M.T., V.F. Soares, D.G. Freire, C.P. Moreira, M.F. Mendes, E. Bon. 1987. α -Amilase and glucoamylase immobilized on chitin and ceramic supports. *Biomass*, **13**: 25-32.

- Yandri, A.S dan P. Wulandari. 2009. Pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas termal dan esnzim α -Amilase dari *Rhizopus oryzae*. *Junal Sains MIPA*. **15** (2): 111-118.
- Yandri, T. Suhartati, S. Hadi. 2010a. Purification and Characterization of Extracellular α -Amilase Enzyme from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148, *European Journal of Scientific Research*, **39** (1): 64-67.
- Yandri, T. Suhartati, S. Hadi. 2010b. Immobilization of α -amylase from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with diethylaminoethyl cellulose (DEAE-Cellulose). *Material Science Researh India*, 7(1): 123-128.
- Yang, Z., D. Michael, A. Robert, X.Y. Fang, and J.R. Alan. 1996. Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin, *Enzyme and Microbial Technology*, **18**: 82-89.
- Zainab, A., S. Modu, A.S. Falmata, Maisaratu.. 2011. Laboratory scale production of glucose syrup by the enzymatic hydrolysis of starch made from maize, millet, and sorgum. *Biokemistri*, **23** (1): 1-8.