

**KONVERSI ENZIMATIS PATI ONGGOK MENJADI GLUKOSA
MENGUNAKAN ENZIM α -AMILASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148
YANG DIAMOBILISASI DENGAN BENTONIT
UNTUK PRODUKSI BIOETANOL**

(Skripsi)

**Oleh
BUNGA LANTRI DWINTA**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

ABSTRACT

ENZYMATIC CONVERSION OF ONGGOK STARCH INTO GLUCOSE USING α -AMYLASE FROM *Bacillus subtilis* ITBCCB148 IMMOBILIZED BY BENTONITE FOR BIOETHANOL PRODUCTION

By

Bunga Lantri Dwinta

Amylase is widely apply commercially in food and non-food industry. One of them is in bioethanol production the required-enzyme should have high stability and also stable on pH and extreme temperature. This study explored the effect of amylase immobilization on bentonite matrix to have high stability that required to convert the starch substrate into glucose in a part of bioethanol production. The steps of this study includes the production process, isolation, purification, immobilization, characterization, enzymatic conversion, and fermentation. Our investigation showed that the specific activity of purified enzyme was 22,388.82 U/mg and its purity increased 32.61 times than crude extract ones. Purified enzyme has an optimum temperature of 55°C, $K_M = 4.8$ mg/mL substrate, and $V_{max} = 50$ $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, in addition the immobilized enzyme has an optimum temperature of 60 °C, $K_M = 9.81$ mg/mL substrate, and $V_{max} = 34.01$ $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$. The residual activity of purified and immobilized enzymes in the thermal stability test were 28 and 61%. From data of purified enzyme kinetics showed that the value of $k_i = 0.014 \text{ min}^{-1}$, $\Delta G_i = 98.645 \text{ kJ mol}^{-1}$, and $t_{1/2} = 49.5 \text{ min}$, in addition the immobilized enzyme has $k_i = 0.005 \text{ min}^{-1}$, $\Delta G_i = 107.876 \text{ kJ mol}^{-1}$, and $t_{1/2} = 138.6 \text{ min}$ respectively. Our investigation showed that immobilization bentonite-immobilized amylase has higher stability than the pure one. Bioethanol obtained from fermentation process using *S.cereviciae* and yeast were 0.215 and 0.247% respectively.

Keywords: α -amylase, enzyme immobilization, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, bentonite, bioethanol, onggok starch.

ABSTRAK

KONVERSI ENZIMATIS PATI ONGGOK MENJADI GLUKOSA MENGUNAKAN ENZIM α -AMILASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148 YANG DIAMOBILISASI DENGAN BENTONIT UNTUK PRODUKSI BIOETANOL

Oleh

Bunga Lantri Dwinta

Amilase banyak digunakan secara komersial dalam produk industri pangan dan non pangan. Salah satunya adalah produk bioetanol, maka enzim yang digunakan sebaiknya memiliki stabilitas enzim yang tinggi agar dapat bekerja pada pH dan suhu ekstrim. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh amobilisasi enzim pada matriks pengamobil yaitu bentonit terhadap kestabilan enzim. Enzim amobil kemudian digunakan untuk mengonversi substrat pati onggok menjadi glukosa untuk produksi bioetanol. Tahap penelitian ini meliputi proses produksi, isolasi, pemurnian enzim, amobilisasi enzim, karakterisasi enzim, konversi enzimatis, dan fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik enzim murni sebesar 22.388,82 U/mg dan kemurniannya meningkat 32,61 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim. Enzim murni memiliki suhu optimum 55°C, $K_M = 4,8$ mg/mL substrat, dan $V_{maks} = 50 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, sedangkan enzim amobil memiliki suhu optimum 60 °C, $K_M = 9,81$ mg/mL substrat, dan $V_{maks} = 34,01 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$. Aktivitas sisa dari enzim murni dan enzim amobil pada uji stabilitas termal berturut-turut adalah 28 dan 61%. Data kinetika enzim murni diperoleh nilai $k_i = 0,014 \text{ menit}^{-1}$, $\Delta G_i = 98,645 \text{ kJ mol}^{-1}$, dan $t_{1/2} = 49,5$ menit, sedangkan enzim amobil diperoleh nilai $k_i = 0,005 \text{ menit}^{-1}$, $\Delta G_i = 107,876 \text{ kJ mol}^{-1}$, dan $t_{1/2} = 138,6$ menit, dari data tersebut menunjukkan bahwa amobilisasi dengan bentonit dapat meningkatkan kestabilan enzim. Kadar bioetanol yang diperoleh dari proses fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* dan ragi berturut-turut adalah 0,215 dan 0,247%.

Kata kunci : α -amilase, amobilisasi enzim, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, bentonit, bioetanol, pati onggok.

**KONVERSI ENZIMATIS PATI ONGGOK MENJADI GLUKOSA
MENGUNAKAN ENZIM α -AMILASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148
YANG DIAMOBILISASI DENGAN BENTONIT
UNTUK PRODUKSI BIOETANOL**

Oleh

BUNGA LANTRI DWINTA

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
SARJANA SAINS**

pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

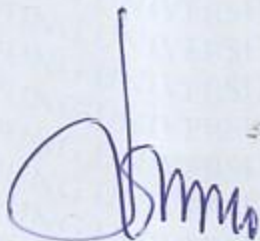
Judul Skripsi : **KONVERSI ENZIMATIS PATI ONGGOK
MENJADI GLUKOSA MENGGUNAKAN
ENZIM α -AMILASE DARI *Bacillus subtilis*
ITBCCB148 YANG DIAMOBILISASI DENGAN
BENTONIT UNTUK PRODUKSI BIOETANOL**

Nama Mahasiswa : **Bunga Lantri Dwinta**

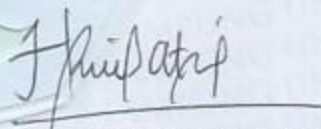
No. Pokok Mahasiswa : 1417011018

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP 19711001 200501 1 002

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA



Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, M.T.
NIP 19740705 200003 1 001

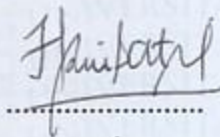
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

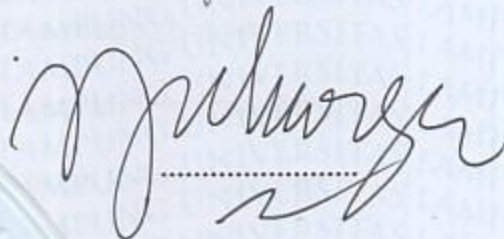
Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**



Sekretaris : **Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Prof. Suharso, Ph.D.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **12 September 2018**

RIWAYAT HIDUP



Skripsi ini ditulis oleh Bunga Lantri Dwinta dari Desa Podomoro, Kecamatan Pringsewu Kabupaten Pringsewu. Anak ketiga dari empat bersaudara pasangan Bapak Sugiarto dan Ibu Ekowati. Kakak pertama bernama Dewi Retno Sari, Kakak kedua bernama Intan Kristinanda, dan seorang Adik bernama Yenci Brika Enkekes.

Penulis lahir pada Bulan Januari tahun 1997. Mengawali pendidikan di bangku Sekolah Dasar Negeri 04 Podomoro, lulus pada tahun 2009. Kemudian melanjutkan di Sekolah Menengah Pertama Negeri 03 Pringsewu, lulus pada tahun 2012. Selanjutnya menempuh pendidikan di Sekolah Menengah Atas Negeri 02 Pringsewu, lulus pada tahun 2014. Pada tahun yang sama, penulis diterima sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Unila melalui jalur SMPTN (Seleksi Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Penulis menjalani Program Kuliah Kerja Nyata (KKN) selama 40 hari di Desa Penyandingan, Kecamatan Kelumbayan pada tahun 2017. Pada tahun yang sama, penulis telah melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unila. Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia pada tahun 2017-2018 dan pernah

menjadi asisten praktikum Teknik Penelitian dan Rekayasa Biokimia (TPRB) untuk mahasiswa S1 Jurusan Kimia FMIPA Unila.

Selama di perguruan tinggi, penulis pernah bergabung dalam bidang organisasi kemahasiswaan. Dimulai dari tahun 2014-2015 sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI). Tahun 2015-2016 sebagai anggota biro penerbitan Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI). Tahun 2016 sebagai sekretaris bidang kesekretariatan Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI).

MOTTO

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.

(Al-Insyirah 6-8)

Mulailah dengan keyakinan. Jalankan dengan keikhlasan.

Selesaikan dengan kebahagiaan.

(Anonim)

Jangan menyerah. Hal memalukan bukanlah ketika kau jatuh, tetapi ketika kau tidak mau bangkit lagi.

(Midorima Shintarou)

Your dreams today can be future tomorrow

(Anonim)

Jadilah bunga harapan yang takkan pernah layu.

(Conan Edogawa)

PERSEMBAHAN

Bismillahirrohmanirrohim...

*Kupersembahkan karya ini sebagai rasa syukur kepada Allah SWT beserta Nabi
Junjungan kami Muhammad SAW dan ucapan terima kasih serta banggaku
kepada :*

Bapak dan Ibu Tercinta

Sebuah karya kecil yang belum sebanding dengan kasih sayang, cinta, dan
pengorbanan serta jerih payahmu sepanjang hidupku selama ini

Kakak dan Adik Tersayang

Dewi Retno Sari, Saleh Sa'af
Yenci Brika Enkekes, Intan Kristinanda
Terimakasih karena kalian selalu mendukung dan memberi semangat kepadaku

Pembimbing Akademik

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

Teman-temanku

Seluruh keluarga Chemistry'14 yang selalu menyemangatiku

Almamater Tercinta

Tempatku menuntut ilmu selama ini
S1 Kimia FMIPA Universitas Lampung

SANWACANA

Alhamdulillah, puji syukur kehadirat Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **Konversi Enzimatis Pati Onggok menjadi Glukosa menggunakan Enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 yang Diamobilisasi dengan Bentonit untuk Produksi Bioetanol.**

Penyusunan skripsi ini adalah salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Dalam penyusunan skripsi ini, penulis telah banyak menerima bantuan, baik moril maupun materil, serta bimbingan dari beberapa pihak. Oleh karena itu, sebagai wujud rasa hormat, penulis menyampaikan terima kasih kepada pihak-pihak berikut ini :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S. selaku pembimbing I sekaligus pembimbing akademik yang telah membimbing penulis dalam menyelesaikan skripsi ini dengan penuh kesabaran, memberikan pengarahan, saran dan kritik, serta nasihat yang berharga selama menjadi mahasiswa kimia.

2. Bapak Dr. Eng. Heri Satria S.Si., M.Si. selaku pembimbing II yang juga telah memberikan bimbingan, memberikan saran dan kritik, nasihat, serta sumbangan pikiran selama penyusunan skripsi.
3. Bapak Prof Suharso Ph.D. selaku pembahas yang telah memberikan saran dan kritik yang sangat bermanfaat.
4. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono M.T. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
5. Bapak Prof. Warsito S.Si., DEA, Ph.D. selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.
6. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah membekali penulis dengan berbagai ilmu pengetahuan.
7. Bapak dan Ibuku tercinta yang tak henti-henti memberikan kasih sayang, mendoakan, memberikan petunjuk, dukungan, dan nasihat dalam menyelesaikan skripsi ini, serta terima kasih karena telah memberikan kebahagiaan tersendiri untukku yang sangat istimewa.
8. Kakak dan adikku tersayang (Dewi, Intan, dan Yenci), kakak iparku (Saleh), serta keponakanku yang imut-imut (Abyan Farrel, Keyla Az-zahra, dan Kevin Alvaro) terima kasih atas semangat, dukungan, doa, bantuan moril maupun materil, ramennya, ributnya, serta cendanya.
9. Paman dan Tante semua serta saudara-saudara sepupu yang selalu memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.
10. Bapak Dailami dan Ibu Retno serta anak-anaknya yang sudah banyak membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

11. Sahabat-sahabatku, yang selalu memberikan canda tawa dan kadang keusilan yang tidak seberapa, serta semangat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini yaitu : Diva Amila, Rahma Agustina, Khumil Ajmila, Fadwa Rani, Bidari Maulid Diana, dan Dhia Hawari.
12. *Partner Riset* Prof Yandri (Riza Mufarida, Ni Putu Rahma, Erika Liandini, Rica Aulia, Mbik Surtini) sebagai teman berbagi saran, yang telah membantu dan menemani selama penulis semasa penelitian.
13. *Ever Lasting Partner* : Riza Mufarida Akhsin yang telah menemani dan membantu penulis dalam mengurus semua berkas dengan slogan “Sampai Mati jadi Sahabat, Sahabat till Jannah”
14. Tim Biokimia 14, Leony, Ayuning, Hesti, Agung, Asrul, Fernando, Luthfi, Angga, dan kakak-adik tingkatku yang telah membantu dan menemani penulis selama penelitian.
15. Penghuni Kamar 301 Rusunawa, yang memberikan keceriaan tersendiri bagi penulis yaitu Siti Fatkhul Ulum, Merliyanisa, Kurnia Purnama Ayu, sebagai keluarga kecil yang selalu memberikan semangat.
16. Pendamping dunia dan akhirat penulis yang selalu memberikan semangat dari masa depan. Siapa pun kelak kau, semoga Allah SWT menyatukan kita dalam jalinan iman dan takwa. Amin.
17. Teman-teman seperjuangan Chemistry’14 yang penulis sayangi, terima kasih atas kebersamaannya yang sempat menemani hari-hari kuliah penulis.
18. Laboran Biokimia : Pak Jon yang telah membantu melancarkan penulis selama penelitian.

19. Staf Administrasi : Pak Gani yang membantu penulis dalam mengurus persyaratan maupun berkas selama kuliah dan penelitian.
20. Himaki FMIPA Universitas Lampung, terima kasih atas pengalaman yang diberikan kepada penulis.
21. Kakak dan adik tingkat penulis dari tahun 2012 - 2016.
22. Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu, karena kekhilafan semata, dimanapun mereka berada.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Akhirnya hanya kepada Allah SWT kita kembalikan semua urusan dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, rekan-rekan mahasiswa, dan para pembaca umumnya. Amin.

Bandar Lampung, Oktober 2018
Penulis,

Bunga Lantri Dwinta

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI.....	i
DAFTAR GAMBAR.....	iv
DAFTAR TABEL	vi
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	4
C. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Enzim	5
1. Penggolongan Enzim	6
2. Mekanisme Enzim	8
3. Sifat Katalitik Enzim.....	8
4. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim.....	9
5. Kinetika Enzim	11
B. Stabilitas Enzim.....	13
1. Pengaruh Temperatur Tinggi (Stabilitas Termal)	14
2. Pengaruh pH (Stabilitas Terhadap pH)	14
3. Pengaruh Kadar Air	15
C. Amilase.....	15
D. <i>Bacillus subtilis</i>	17
E. Onggok	18
F. Pemurnian Enzim.....	18
1. Sentrifuga.....	19
2. Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat.....	20
3. Dialisis	21
G. Uji Aktivitas Enzim Amilase	22

1. Metode Fuwa	22
2. Metode Mandels.....	23
H. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry.....	23
I. Amobilisasi Enzim	24
1. Metode Pengikatan.....	25
2. Metode Ikatan Silang	26
3. Metode Penjebakan	26
J. Bentonit	27
K. Bioetanol	29
L. Fermentasi	31
M. Kromatografi Gas	32
III. METODE PENELITIAN	34
A. Waktu dan Tempat Penelitian	34
B. Alat dan Bahan	34
C. Prosedur Penelitian.....	35
1. Pembiakan <i>B. subtilis</i> ITBCCB148 dan <i>S. cerevisiae</i>	35
2. Produksi Enzim α -amilase	36
3. Isolasi Enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148	36
4. Pemurnian Enzim α -amilase dari <i>B. subtilis</i> ITBCCB148	37
5. Uji Aktivitas Unit (AU) Enzim α -amilase Metode Fuwa	38
6. Uji Aktivitas Unit (AU) Enzim α -amilase Metode Mandels	39
7. Uji Kadar Protein Metode Lowry	40
8. Amobilisasi Enzim menggunakan Bentonit.....	40
9. Karakterisasi Enzim α -amilase Murni dan Amobil	41
10. Konversi Pati Onggok.....	43
11. Produksi Bioetanol.....	44
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	47
A. Produksi dan Isolasi Enzim α -amilase	47
B. Pemurnian Enzim α -amilase.....	47
1. Fraksinasi Bertingkat dengan Ammonium Sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	48
2. Dialisis	49
C. Penentuan pH Pengikatan Enzim pada Matriks Pengamobil	51

D. Karakterisasi Enzim α -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Amobilisasi	52
1. Penentuan Suhu Optimum Enzim α -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Amobilisasi	52
2. Penentuan Stabilitas Termal Enzim α -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Amobilisasi	53
3. Penentuan K_M dan V_{maks} Enzim α -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Amobilisasi	54
4. Pemakaian Berulang Enzim Amobilisasi	56
5. Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim α -amilase Hasil Pemurnian dan Hasil Amobilisasi	57
a. Waktu Paruh ($t_{1/2}$) dan Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i)	58
b. Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)	59
6. Konversi Enzimatis Pati Onggok dan Fermentasi Etanol	60
V. SIMPULAN DAN SARAN	65
A. Simpulan	65
B. Saran	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu	9
2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH	10
3. Hubungan substrat dengan aktivitas enzim	11
4. Grafik Lineweaver-Burk	12
5. Struktur kristal montmorillonit bentonit	28
6. Skema fraksinasi bertingkat dengan $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	37
7. Skema penelitian	46
8. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat (0-100)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase	48
9. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat (0-20)% dan (20-85)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase	49
10. Aktivitas unit enzim α -amilase pada berbagai pH pengikatan	51
11. Suhu optimum enzim α -amilase hasil pemurnian dan amobilisasi	52
12. Stabilitas termal enzim α -amilase hasil pemurnian dan amobilisasi	53
13. Grafik Lineweaver-Burk enzim α -amilase hasil pemurnian dan Amobilisasi.	55
14. Pemakaian berulang enzim α -amilase menggunakan bentonit	57
15. Grafik $\ln (E_i/E_o)$ enzim α -amilase hasil pemurnian dan amobilisasi	58
16. Hubungan antara konsentrasi onggok dengan kadar glukosa	61
17. Hubungan antara waktu inkubasi dengan kadar glukosa	61
18. Kromatogram hasil kromatografi gas pada <i>S. cerevisiae</i>	63
19. Kromatogram hasil kromatografi gas pada Ragi	63
20. Kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA)	84

21. Kurva standar glukosa.....	85
22. Kromatogram standar etanol 0,5%.....	86
23. Kromatogram standar etanol 1%.....	86
24. Kromatogram standar etanol 2%.....	87
25. Kromatogram standar etanol 3%.....	87
26. Kurva standar etanol	88

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemurnian enzim α -amilase dari <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148.....	50
2. Nilai K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi	55
3. Nilai konstanta laju inaktivasi (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim α -amilase hasil pemurnian dan amobilisasi	58
4. Kadar Glukosa Sebelum dan Sesudah Fermentasi.....	62
5. Contoh data dan nilai aktivitas unit (AU)	72
6. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat (0-100)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148	73
7. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat (0-20)% dan (20-85)% dengan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148.....	73
8. Aktivitas unit enzim α -amilase pada berbagai pH pengikatan dengan matriks kitosan saat pengikatan	74
9. Hubungan antara suhu dengan aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	75
10. Hubungan antara suhu dengan aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	75
11. Hubungan antara aktivitas unit (U/mL) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi selama inaktivasi termal 60°C yang selanjutnya diinkubasi pada suhu optimum (enzim hasil pemurnian pada suhu 55°C dan hasil amobilisasi pada suhu 60°C)	76
12. Hubungan antara aktivitas sisa (%) enzim α -amilase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi selama inaktivasi termal 60°C yang selanjutnya	

diinkubasi pada suhu optimum (enzim hasil pemurnian pada suhu 55°C dan hasil amobilisasi pada suhu 60°C)	76
13. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil pemurnian berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk	77
14. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim α -amilase hasil amobilisasi berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk	77
15. Hubungan antara pemakaian berulang enzim hasil amobilisasi dengan aktivitas unit (U/mL).....	78
16. Data $\ln (E_i/E_o)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil pemurnian selama inaktivasi termal 60°C.....	79
17. Data $\ln (E_i/E_o)$ untuk penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim α -amilase hasil amobilisasi selama inaktivasi termal 60°C.....	79
18. Kadar glukosa dengan variasi konsentrasi onggok	83
19. Kadar glukosa dengan variasi waktu inkubasi	83
20. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi	84
21. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi	85
22. Luas area puncak etanol pada berbagai konsentrasi etanol.....	87
23. Luas puncak pada sampel <i>S. cereviciae</i> dan ragi	89

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Dewasa ini, perkembangan teknologi untuk menghasilkan bioetanol dalam bidang industri sangatlah pesat. Salah satu teknologi yang dapat digunakan untuk memproduksi bioetanol adalah dengan cara fermentasi. Fermentasi itu sendiri merupakan proses perubahan kimia yang berlangsung akibat adanya aktivitas enzim yang dikeluarkan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme yang dapat digunakan pada fermentasi bioetanol yaitu *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharina latissima*, *Zymomonas mobilis*, dan *Aspergillus niger*. Namun *Saccharomyces cerevisiae* lebih sering digunakan dibandingkan dengan mikroorganisme lain karena dapat menghasilkan etanol dengan rendemen yang sangat tinggi, mudah ditemukan, memiliki laju pertumbuhan yang cepat dan stabil, serta membutuhkan nutrisi yang sederhana dan lebih mudah beradaptasi dengan lingkungan (Walker, 2011).

Bioetanol dapat diproduksi dari bahan-bahan yang mengandung pati. Sumber pati dapat ditemukan pada singkong, jagung, talas, sagu, ubi jalar, padi, dan sebagainya. Namun, apabila sumber pati tersebut digunakan maka tidak efisien karena sumber pati tersebut merupakan bahan makanan yang masih dibutuhkan untuk keberlangsungan hidup makhluk hidup. Sehingga pada penelitian ini

sumber pati yang digunakan berasal dari onggok singkong yang merupakan limbah dari industri tapioka. Walaupun termasuk limbah, onggok singkong masih dapat digunakan karena mengandung serat kasar dan pati yang tinggi (Lamiya dan Mareta, 2010).

Untuk produksi bioetanol, pati onggok singkong perlu dihidrolisis agar menghasilkan glukosa yang merupakan bahan utama bioetanol. Hidrolisis pembentukan glukosa dilakukan dengan cara non-enzimatis dan enzimatis. Proses non-enzimatis dapat menggunakan katalis asam, namun katalis asam memiliki kelemahan yaitu memerlukan peralatan yang tahan korosi dan selama proses hidrolisisnya terbentuk senyawa inhibitor seperti furfural, 5-hydroxy-methylfurfural (HMF). Sedangkan proses hidrolisis secara enzimatis memiliki kelebihan yaitu lebih efektif dan spesifik, hasil hidrolisis dapat dikendalikan, mencegah adanya reaksi samping, serta ramah lingkungan (Taherzadeh and Karimi, 2008). Hal inilah yang menjadi alasan peneliti untuk menghidrolisis pati onggok singkong secara enzimatis menggunakan enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148.

Enzim α -amilase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis molekul pati dengan cara memutus ikatan α -1,4-D-glukosa secara spesifik. Enzim ini bersifat sebagai endoamilase yaitu enzim yang memecah pati secara acak dari tengah atau bagian dalam molekul.

Enzim memiliki sifat yang tidak stabil terhadap perubahan pH dan suhu. Untuk meningkatkan kestabilan enzim, dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu modifikasi kimia, amobilisasi enzim, dan mutagenesis terarah (Nubarov *et al.*,

1987). Pada penelitian ini, untuk meningkatkan kestabilan enzim dilakukan dengan cara amobilisasi karena cara ini memiliki beberapa keuntungan yaitu dapat meningkatkan stabilitas enzim, memudahkan pengendalian kondisi reaksi, enzim dapat digunakan berulang, dan kemurnian enzim maupun produk lebih tinggi. Adapun metode amobilisasi diantaranya pengikatan pada matriks tidak larut (*carrier binding*), penjebakan (*entrapment*), dan ikatan silang (*cross linking*). Metode amobilisasi tergantung pada sifat matriks pengamobil yang digunakan. Matriks pengamobil yang digunakan pada penelitian ini adalah matriks bentonit.

Bentonit merupakan *clay* (tanah liat) yang sebagian besar terdiri dari montmorillonit dengan mineral-mineral seperti kwarsa, kalsit, dolomit, feldspars dan mineral lainnya. Bentonit telah diketahui dapat digunakan sebagai matriks anorganik dalam amobilisasi berbagai enzim, seperti enzim α -amilase (Tiarsa, 2017), protease (Wulandari, 2016), xilanase (Sutrisno dan Mahdi, 2014), pektinase (Rosmanansari dkk., 2013), dan lipase (Nopiani, 2015; Chrisnasari dkk., 2014). Pemilihan bentonit pada amobilisasi ini didasarkan pada beberapa pertimbangan yaitu tidak larut dalam air, pH berkisar 4-7 (pH asam) sesuai pH optimum enzim α -amilase, memiliki daya tukar ion yang besar, mengandung kation bivalen (Ca^{2+}) yang dapat menstabilkan enzim, tersedia cukup berlimpah di alam termasuk Indonesia, memiliki kestabilan mekanik dan termal, tidak mengganggu reaksi enzimatik yang dikehendaki, luas permukaan partikel yang besar sehingga dapat mengikat enzim dalam jumlah besar, rigid, murah, stabil (*inert*), dan non-toksik (Sedaghat *et al.*, 2009). Berdasarkan beberapa pertimbangan tersebut, metode amobilisasi enzim yang digunakan adalah *carrier binding* secara adsorpsi fisik.

B. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengisolasi enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148.
2. Memurnikan enzim α -amilase yang diperoleh dan mengkarakterisasi hasil pemurnian enzim tersebut.
3. Meningkatkan kestabilan enzim α -amilase hasil pemurnian dengan amobilisasi enzim dan mengkarakterisasi hasil amobilisasi enzim tersebut.
4. Mengkonversi pati onggok menjadi glukosa menggunakan enzim α -amilase amobil.
5. Memperoleh kadar bioetanol dari proses fermentasi glukosa dari hasil konversi pati onggok.

C. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat pada penelitian ini adalah mendapatkan informasi mengenai produksi bioetanol pada sumber pati onggok yang dihidrolisis dengan enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 yang telah diamobilisasi menggunakan matriks bentonit.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim adalah golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup, dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia yang terjadi dalam sel maupun di luar sel (Wirahadikusumah, 2001). Berdasarkan cara menghasilkannya, enzim dibagi menjadi dua, yaitu enzim ekstraseluler dan enzim intraseluler. Enzim ekstraseluler dapat diperoleh dalam keadaan murni pada biakan cair dengan cara pemisahan dan pemurnian yang tidak begitu rumit (Smith, 1990). Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dari pada reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis (Poedjiadi, 1994). Enzim mempunyai berat molekul yang beraneka ragam berkisar 10^4 – 10^7 kDa (Dryer, 1993).

Menurut Soedigdo (1988), berdasarkan tempat bekerjanya enzim dapat dibedakan dalam dua golongan, yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endoenzim disebut juga enzim intraseluler, dihasilkan di dalam sel yaitu pada bagian membran sitoplasma dan melakukan metabolisme di dalam sel. Eksoenzim (enzim ekstraseluler) merupakan enzim yang dihasilkan sel kemudian dikeluarkan melalui dinding sel sehingga terdapat bebas dalam media yang mengelilingi sel dan bereaksi memecah bahan organik tanpa tergantung pada sel yang melepaskannya.

Berdasarkan biosintesisnya, enzim dibedakan menjadi enzim konstitutif dan enzim induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu tersedia di dalam sel mikroba dalam jumlah yang relatif konstan, sedangkan enzim induktif adalah enzim yang ada dalam jumlah sel yang tidak tetap, tergantung pada adanya induser atau rangsangan substrat. Enzim induktif ini jumlahnya akan bertambah sampai beberapa ribu kali bahkan lebih apabila dalam medium mengandung substrat yang menginduksi, terutama bila substrat penginduksi merupakan satu-satunya sumber karbon (Kurnia, 2010).

1. Penggolongan Enzim

Penamaan dan klasifikasi enzim secara sistematis, telah dikemukakan oleh suatu badan internasional yaitu CEIUB (*Commission on enzymes of the International Union of Biochemistry*). Klasifikasi enzim secara internasional meliputi : nama golongan dan macam reaksi yang dikatalisisnya (Wirahadikusumah, 2001).

Menurut Poedjadi (1994), enzim digolongkan menjadi enam golongan berdasarkan pada jenis reaksi yang dikatalisis, keenam golongan enzim tersebut yaitu :

a. Oksido-reduktase

Enzim yang berperan dalam reaksi oksidasi-reduksi. Enzim yang termasuk dalam golongan ini ada dua yaitu dehidrogenase dan oksidase. Contoh enzim dehidrogenase yaitu alkohol dehidrogenase dan glutamat dehidrogenase. Contoh enzim oksidase yaitu glukosa oksidase dan glisin oksidase.

b. Transferase

Enzim yang berperan dalam reaksi pemindahan gugus tertentu. Contoh enzim yang termasuk golongan ini adalah metiltransferase, hidroksimetiltransferase, dan aminotransferase.

c. Hidrolase

Enzim yang berperan dalam reaksi hidrolisis. Ada tiga jenis enzim hidrolase, yaitu jenis yang memecah ikatan ester, memecah glikosida, dan yang memecah ikatan peptida. Contoh enzim hidrolase yaitu esterase, lipase, amilase, aminopeptidase, karboksipeptidase, pepsin, tripsin, dan kimotripsin.

d. Liase

Enzim yang termasuk golongan ini mempunyai peranan penting didalam reaksi pemisahan suatu gugus dari suatu substrat (bukan cara hidrolisis) atau sebaliknya. Contoh enzim golongan ini yaitu dekarboksilase, aldolase, dan hidratase.

e. Isomerase

Enzim yang termasuk dalam golongan ini bekerja pada reaksi perubahan intramolekular misalnya reaksi perubahan glukosa menjadi fruktosa. Contoh : ribulosafosfat epimerase dan glukosafosfat isomerase.

f. Ligase

Enzim yang berperan pada reaksi penggabungan dua molekul, oleh karenanya enzim-enzim tersebut juga dinamakan *sintetase*. Ikatan yang terbentuk adalah ikatan C-O, C-S, C-N, atau C-C. Contoh : glutamin dan piruvat karboksilase.

2. Mekanisme Enzim

Terikatnya substrat pada sisi aktif enzim menyebabkan berubahnya keadaan substrat sehingga berada dalam keadaan transisi dan akibatnya molekul substrat mengalami perubahan konformasi transisi yang diperlukan agar dapat diubah menjadi produk. Beberapa ion logam yang merupakan kofaktor juga membantu terjadinya ikatan substrat dengan enzim (Wheeler, 1994). Jika enzim telah melakukan pembentukan ikatan antara enzim dengan substrat dengan membentuk molekul kompleks enzim substrat, pembentukan molekul ini sangat dipengaruhi oleh bentuk sisi aktif enzim dan kespesifikan substrat.

Menurut Shahib (2005), ada dua teori yang mendukung dalam penjelasan pembentukan kompleks enzim substrat, teori pertama yang diajukan oleh Fisher yaitu teori Kunci dan Gembok (*Lock and Key*) yang menjelaskan bahwa adanya kespesifikan enzim terhadap substrat tertentu yang bentuknya sesuai dengan sisi aktif enzim. Teori kedua adalah teori yang diajukan oleh Koshland yaitu teori Kecocokan induksi (*Induced Fit*) yang menjelaskan bahwa substrat akan menginduksi suatu perubahan bentuk sisi aktif enzim sehingga dapat dengan mudah berikatan.

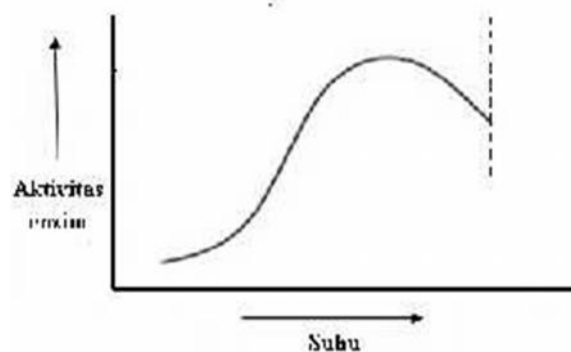
3. Sifat Katalitik Enzim

Menurut Page (1997), enzim memiliki sifat-sifat katalitik yaitu (1) enzim mampu meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu, dan pH; (2) enzim berfungsi dengan selektivitas tinggi terhadap substrat (substansi yang mengalami perubahan kimia setelah bercampur dengan enzim) dan jenis reaksi yang dikatalisis; (3) enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang tinggi dibanding dengan katalis biasa.

4. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

a. Suhu

Peningkatan suhu akan meningkatkan energi kinetik molekul sehingga kecepatan reaksi turut meningkat. Namun, dalam suhu yang terlalu tinggi, peningkatan energi tersebut dapat memecah ikatan hidrogen ataupun hidrofobik yang berperan dalam menjaga konformasi molekul enzim. Perubahan konformasi akan merusak sisi aktif enzim sehingga mengalami denaturasi. Enzim bekerja optimum pada suhu tertentu yang disebut suhu optimum (Wirahadikusumah, 2001). Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 1.

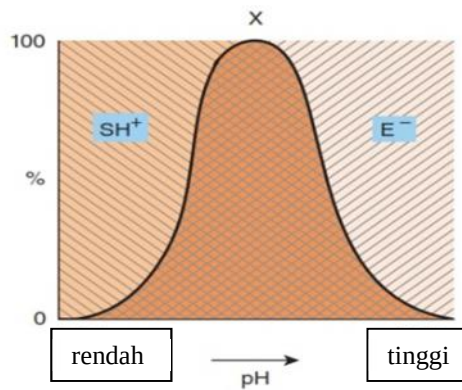


Gambar 1. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu (Rodwell, 1987).

b. pH

pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Daya katalisis enzim menjadi rendah pada pH rendah maupun tinggi, karena terjadi denaturasi protein enzim. Enzim mempunyai gugus aktif yang bermuatan positif (+) dan negatif (-). Aktivitas enzim akan optimum kalau terdapat keseimbangan antara kedua muatan. Pada keadaan asam cenderung bermuatan positif, dan pada keadaan basa cenderung bermuatan negatif, sehingga aktivitas enzim menjadi berkurang atau bahkan

menjadi tidak aktif. pH optimum untuk masing-masing enzim tidak selalu sama (Orten *and* Neuhaus, 1970). Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Rodwell, 1987).

c. Konsentrasi Enzim

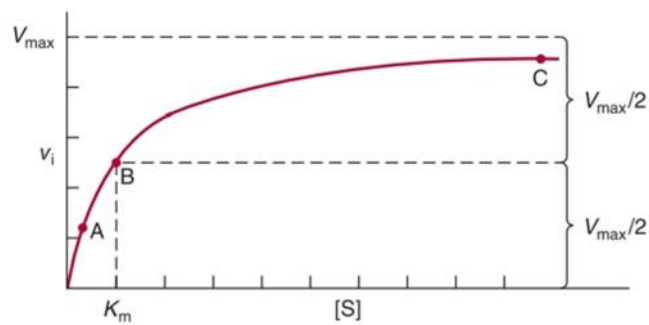
Kecepatan laju reaksi enzimatik berhubungan langsung antara konsentrasi enzim dengan substrat (Orten *and* Neuhaus, 1970). Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik, laju reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994).

d. Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi enzimatik pada umumnya tergantung pada konsentrasi substrat.

Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat.

Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi (Lehninger, 2005). Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan substrat dengan aktivitas enzim (Rodwell, 1987).

e. Aktivator dan inhibitor

Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik.

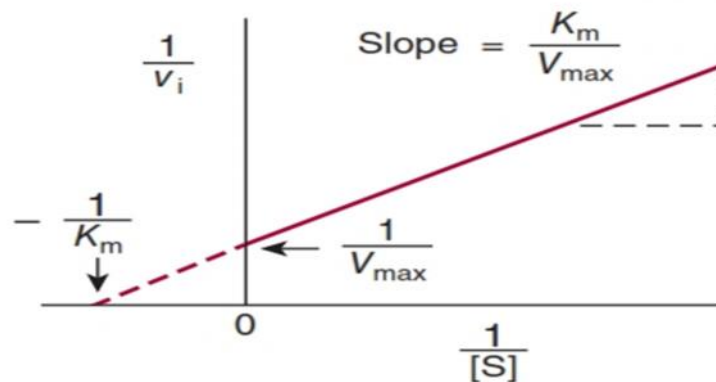
Komponen kimia yang membentuk enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu, Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 1981).

Menurut Wirahadikusumah (2001), inhibitor merupakan suatu zat kimia tertentu yang dapat menghambat aktivitas enzim. Pada umumnya cara kerja inhibitor adalah dengan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat berikatan dengan substrat dan fungsi katalitik enzim tersebut akan terganggu (Winarno, 1989).

5. Kinetika Enzim

Untuk mengetahui konsentrasi substrat yang dapat menghasilkan laju reaksi maksimum, diperlukan penentuan tetapan Michaelis-Menten (K_M).

K_M merupakan konstanta yang menunjukkan afinitas enzim terhadap substrat. Semakin kecil harga K_M maka interaksi enzim dan substrat semakin baik dan laju reaksi semakin cepat. Bila konsentrasi substrat cukup besar sehingga semua enzim terikat kepadanya dalam bentuk kompleks enzim-substrat, maka akan didapat laju reaksi maksimum, V_{maks} (Wirahadikusumah, 2001). Nilai K_M dapat ditentukan dengan mengekstrapolasikan data eksperimental ke dalam grafik persamaan Lineweaver-Burk, seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik Lineweaver-Burk (Rodwell, 1987).

Persamaan Lineweaver-Burk merupakan persamaan kebalikan berganda yang linier dari persamaan Michaelis-Menten.

Persamaan Michaelis-Menten,

$$V_0 = \frac{V_m[S]}{K_M + [S]}$$

Persamaan Lineweaver-Burk,

$$\frac{1}{V_o} = \left(\frac{K_m}{V_m}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

(Wirahadikusumah, 2001).

Amobilisasi enzim dapat meningkatkan maupun menurunkan nilai K_M enzim. Peningkatan nilai K_M pada enzim hasil amobilisasi berimplikasi bahwa konsentrasi substrat yang lebih tinggi dibutuhkan untuk mencapai laju reaksi maksimum ataupun laju reaksi yang sama pada enzim murni. Perubahan konformasi pada molekul enzim dapat meningkatkan nilai K_M dikarenakan menurunnya daya gabung antara enzim dan substrat. Perubahan konformasi enzim tersebut dapat disebabkan oleh perubahan kimiawi pada proses pengikatan kovalen enzim dan matriks bentonit serta ukuran partikel enzim yang terlalu besar sehingga mempengaruhi difusi substrat (Suhartono, 1989).

B. Stabilitas Enzim

Menurut Kazan *et al.* (1997), stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa), oleh pengaruh suhu dan kondisi-kondisi non fisiologis lainnya. Dalam melakukan aktivitasnya, enzim dipengaruhi oleh lingkungan. Pengaruh tersebut dapat mengganggu stabilitas enzim sehingga menjadi masalah yang sering dihadapi dalam industri. Stabilitas merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim dalam aplikasinya sebagai biokatalis.

Stabilitas enzim dapat didefinisikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam, basa), pengaruh temperatur dan pH ekstrim. Terdapat dua prinsip utama untuk memperoleh enzim yang

mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami kurang atau tidak stabil. Menurut Illanes (1999), peningkatan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan cara amobilisasi enzim, modifikasi kimia, *protein engineering*, dan memperlakukan enzim pada kondisi air yang terbatas (dalam pelarut organik).

1. Pengaruh Temperatur Tinggi (Stabilitas Termal)

Enzim merupakan makromolekul yang peka terhadap lingkungannya. Dengan demikian harus ditangani dengan sangat hati-hati agar sifat-sifatnya dapat dipertahankan, kecuali enzim termostabil yang dapat aktif pada suhu tinggi.

Umumnya, semakin tinggi temperatur, semakin naik laju reaksi baik yang tidak dikatalisis maupun yang dikatalisis oleh enzim. Namun demikian, enzim merupakan senyawa protein yang sangat peka terhadap perubahan temperatur.

Semakin tinggi temperatur akan terjadi perubahan struktur enzim yang diikuti oleh hilangnya aktivitas katalitik dari enzim tersebut. Di Indonesia, temperatur optimum bagi proses enzimatis dilakukan pada temperatur kamar. Hampir semua enzim memiliki aktivitas optimum pada temperatur sekitar 30°C dan denaturasi dimulai pada temperatur 45°C (Winarno, 1989).

2. Pengaruh pH (Stabilitas Terhadap pH)

Umumnya enzim bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya. Perubahan aktivitas enzim akibat perubahan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat, serta perubahan kemampuan peningkatan dan pengaruh laju reaksi. Pada umumnya enzim

menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran pH yang disebut pH optimum, yang umumnya antara pH 4,5 mempunyai kisaran pH optimum yang sangat sempit. Di sekitar pH optimum enzim mempunyai stabilitas yang tinggi. Dalam hal ini, enzim yang sama seringkali pH optimumnya berbeda tergantung dari sumber enzim (Mangunwidjaja, 1994).

3. Pengaruh Kadar Air

Kadar air memiliki peranan penting pada kedua tahap di atas. Oleh karena itu, dengan menggunakan air seperti pada kondisi mikroakueus, reaksi inaktivasi oleh panas dapat diperlambat dan stabilitas termal enzim akan meningkat. Stabilitas termal enzim akan jauh lebih tinggi dalam kondisi kering dibandingkan dalam kondisi basah. Adanya air sebagai pelumas membuat konformasi suatu molekul enzim menjadi sangat fleksibel, sehingga bila air dihilangkan molekul enzim akan menjadi lebih kaku (Virdianingsih, 2002).

C. Amilase

Enzim amilase merupakan enzim yang mempunyai aktivitas memecah molekul pati dan glikogen (Judoamidjojo *et al.*, 1989). Menurut Winarno (1989), enzim amilase dapat dikelompokkan menjadi tiga golongan enzim yaitu :

1. α -amilase (α - 1,4 glukon-4-glukanhidrolase)

Enzim α -amilase menghidrolisis ikatan α -1,4 glikosidik amilosa, amilopektin dan glikogen. Enzim ini bersifat sebagai endoamilase, yaitu enzim yang memecah pati secara acak dari tengah atau bagian dalam molekul. Berat molekul α -amilase rata-rata $\pm$ 50 KD. Enzim ini mempunyai rantai peptida tunggal pada gugusan

proteinnya dan setiap molekul mengandung satu gram atom Ca. Adanya kalsium yang berikatan dengan molekul protein enzim, membuat enzim α -amilase bersifat relatif tahan terhadap suhu, pH, dan senyawa seperti urea (Suhartono, 1989).

Hidrolisis amilosa oleh α -amilase terjadi melalui dua tahap, pertama adalah degradasi menjadi dekstrin yang terjadi secara acak. Degradasi ini terjadi sangat cepat diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat. Tahap kedua relatif sangat lambat dengan pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir (Suhartono, 1989).

2. β -amilase (β -1,4 glukon maltohidrolase)

β -amilase (β -1,4 glukon maltohidrolase), memecah pati dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosa dari ujung non pereduksi pada rantai polisakarida. Bila tiba pada ikatan α -1,6 glukosida seperti yang dijumpai pada amilopektin atau glikogen, aktivitas enzim ini akan terhenti. Enzim ini bekerja pada ikatan α -1,4 glukosida dan memiliki pH optimum antara 5-6. β -amilase tidak dihasilkan pada jaringan hewan, kecuali jika mikroorganisme terdapat dalam saluran pencernaannya. Beberapa mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim β -amilase yaitu *B. polymyxa*, *B. cerens*, *B. megaterium*, *Streptomyces sp*, *Pseudomonas sp*, dan *R. japonicus* (Winarno, 1986).

3. Gamma amilase (γ -amilase)

Glukoamilase (α -1,4-D-glukan glukohidrolase) memecah ikatan α -1,4 dalam amilosa, amilopektin, dan glikogen dari ujung gula non pereduksi. Enzim ini dapat juga menghidrolisis ikatan α -1,6 dan α -1,3, meskipun pemecahan ikatan tersebut sangat lambat. pH optimum enzim ini adalah 4-5. Pemutusan ikatan akhir α (1-4) glikosida pada ujung non reduksi dari amilosa dan amilopektin,

untuk menghasilkan unit glukosa, γ -amilase sangat efisien pada lingkungan yang bersifat asam dan bekerja pada pH optimum 3 (Judoamidjojo *et al.*, 1989).

D. *Bacillus subtilis*

Bacillus sp merupakan bakteri berbentuk batang, tergolong bakteri gram positif, motil, menghasilkan spora yang biasanya resisten pada panas, bersifat aerob (beberapa spesies bersifat anaerob fakultatif), katalase positif, dan oksidasi bervariasi. Tiap spesies berbeda dalam penggunaan gula, sebagian melakukan fermentasi dan sebagian tidak (Barrow *and* Feltham, 1993). Ditambahkan genus *Bacillus* mempunyai sifat fisiologis yang menarik karena tiap-tiap jenis mempunyai kemampuan yang berbeda-beda, diantaranya : (1) mampu mendegradasi senyawa organik seperti protein, pati, selulosa, hidrokarbon dan agar; (2) mampu menghasilkan antibiotik; (3) berperan dalam nitrifikasi dan denitrifikasi; (4) pengikat nitrogen; (7) bersifat kemolitotrof, aerob atau fakultatif anaerob, asidofilik, psikrofilik, atau termofilik (Schelege dan Schmidt, 1994).

Menurut Hadioetomo (1993), klasifikasi genus *Bacillus* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Procaryotae
Divisi	: Bacteria
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Family	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>

Media fermentasi bakteri penghasil enzim α -amilase memerlukan komposisi unsur nutrisi, diantaranya karbon (C) sebagai unsur penyusun biomolekul (karbohidrat, lipid, protein, dan asam nukleat) dalam membran sel dan nukleus; nitrogen (N) digunakan dalam sintesis protein dan asam nukleat; fosfor (P) digunakan dalam sintesis gugus fosfat pada asam nukleat maupun fosfolipid; sulfur (S) digunakan untuk membentuk jembatan disulfida (S-S) dalam struktur tiga dimensi protein globular; serta magnesium (Mg) yang merupakan mikronutrien sebagai ko-faktor enzim dalam metabolisme karbohidrat (Thieman *and* Palladino, 2009).

E. Onggok

Onggok merupakan limbah padat industri tapioka yang berupa ampas hasil ekstraksi dari pengolahan tepung tapioka. Dalam industri tapioka dihasilkan 75% onggok tapioka dari tota bahan baku yang digunakan. Kandungan onggok (%) menurut Tjiptadi (1982) yaitu 16,86% air, 6,42 % protein, 0,25% lemak, 8,5% abu, 8,14% serat, dan 62,97% pati. Sedangkan komposisi kimia (%) pada onggok menurut Hendri (1999) yaitu 14,32% air, 0,8 % protein, 0,25% lemak, 21,29% serat, dan 60,6% pati. Komponen penting yang terdapat dalam onggok adalah pati dan serat kasar. Pati dan serat kasar dapat diuraikan secara enzimatis sebagai bahan baku bioetanol.

F. Pemurnian Enzim

Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang bekerja di luar sel, sedangkan enzim intraseluler

merupakan enzim yang bekerja di dalam sel. Untuk memproduksi enzim dalam jumlah besar dan mempunyai aktivitas yang tinggi, perlu diperhatikan faktor-faktor penting seperti kondisi pertumbuhan, cara isolasi, serta jenis substrat yang digunakan. Kondisi pertumbuhan yang menunjang produksi enzim secara maksimal adalah pH, suhu inkubasi, waktu inkubasi, dan komposisi media pertumbuhan harus mengandung sumber energi, sumber karbon, sumber nitrogen dan mineral. Enzim dapat diperoleh dengan mengisolasi dari sumbernya. Enzim yang telah diisolasi ini dapat dimanfaatkan lebih lanjut dalam bidang industri maupun kesehatan (Scopes, 1982).

Pemurnian enzim bertujuan untuk memisahkan enzim yang diinginkan dari enzim lain yang tidak diinginkan. Ada tiga hal penting yang harus diperhatikan dalam pemurnian enzim : 1) kualitas, perlu tindakan untuk mempertahankan aktivitas enzim dengan mengurangi proteolisis dan denaturasi, 2) kuantitas, perlu diperhatikan jumlah pemakaian akhir protein murni, dan 3) ekonomis, perlu dipertimbangkan biaya apabila diterapkan dalam skala laboratorium maupun industri. Pemurnian enzim umumnya dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu : fraksinasi dengan garam atau pelarut organik, sentrifugasi, dialisis, dan pemisahan dengan kromatografi kolom (Scopes, 1982). Adapun langkah-langkah pemurnian enzim sebagai berikut :

1. Sentrifuga

Enzim α -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 Ammonium Sulfat

Enzim sebagian besar berada dalam bentuk cairan sel sebagai protein terlarut. Kelarutan enzim tersebut merupakan interaksi polar dengan pelarut dan gaya tolak-menolak antara molekul yang bermuatan sama (Scopes, 1982). Pada konsentrasi rendah, ion-ion akan melingkupi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul protein tersebut (*salting in*), sehingga protein melarut (Suhartono, 1989). Semakin tinggi konsentrasi garam, maka kelarutan protein enzim akan semakin rendah (kelarutan protein enzim dalam air lebih rendah daripada kelarutan garam dalam air) yang dikenal dengan istilah *salting out*. Garam yang sering digunakan untuk mengendapkan protein dan enzim adalah Ammonium sulfat.

Kelebihan Ammonium sulfat dibandingkan garam-garam yang lain yaitu mempunyai kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai daya pengendap yang efektif, mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, dapat digunakan pada berbagai pH, dan harganya murah (Scopes, 1982). Berdasarkan penelitian Yandri *et al.* (2010), aktivitas spesifik

enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148 hasil pemurnian melalui fraksinasi dengan Ammonium sulfat memberikan hasil lebih baik sebesar 1534 U/mg, dibandingkan dengan ekstrak kasarnya sebesar 269,6 U/mg.

3. Dialisis

Dialisis merupakan metode yang biasa digunakan untuk memisahkan garam dari larutan protein. Proses yang terjadi karena adanya perbedaan tekanan osmosis antara cairan yang ada di dalam membran dan yang di luar. Prosesnya, molekul protein atau enzim yang berukuran besar akan tertahan dalam kantung dialisis sedangkan molekul-molekul kecil seperti garam anorganik akan keluar melalui pori-pori membran. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantong dialisis tidak seimbang. 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).

G. 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 ΔG_i (Ferialiana, 2011).

1. Metode Fuwa

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan Metode Fuwa (Fuwa, 1954), yaitu berdasarkan pengurangan jumlah substrat pati yang terhidrolisis dan menghasilkan warna biru setelah penambahan iodin. Warna tersebut akan menyerap cahaya monokromatis pada λ_{maks} 610 nm (Fuwa, 1954; Fessenden dan Fessenden, 1986). Uji Fuwa merupakan uji yang paling spesifik untuk mengidentifikasi aktivitas enzim amilase karena waktu reaksi yang singkat yaitu 10 menit inkubasi dimana pati sebagai substratnya. Semakin kecil absorbansi sampel maka semakin baik aktivitas dari enzim tersebut.

2. Metode Mandels

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.*, 2009). Semakin tinggi absorbansi sampel semakin baik aktivitasnya.

H. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

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 λ 280 nm (Boyer, 2012). Pada metode Lowry, ion Cu (II) bereaksi dengan ikatan peptida pada protein (enzim) membentuk senyawa kompleks. Selanjutnya, kompleks Cu^{2+} 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).

Metode spektrofotometri UV-Vis diaplikasikan pada metode Fuwa, Mandels, dan Lowry. Prinsip metode spektrofotometri UV-Vis adalah ketika cahaya polikromatis dengan berbagai panjang gelombang mengenai suatu larutan berwarna, maka cahaya monokromatis dengan panjang gelombang tertentu saja yang akan diserap. Jika zat menyerap cahaya tampak (*visible*) dan UV maka akan terjadi perpindahan elektron dari keadaan dasar menuju keadaan tereksitasi. Perpindahan elektron ini disebut transisi elektronik. Cahaya yang diserap diukur sebagai absorbansi (A), yang dinyatakan dengan hukum Lambert-Beer yaitu “jumlah radiasi cahaya tampak yang diserap oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi linier dari konsentrasi zat dan tebal larutan” (Harvey, 2000).

I. Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim adalah proses pengikatan enzim secara fisik pada suatu matriks tertentu yang tidak larut dalam air. Enzim amobil dapat didefinisikan sebagai enzim yang secara fisik ditempatkan pada suatu ruang tertentu sehingga dapat menahan aktivitas katalitiknya, oleh karena itu dapat digunakan secara berulang (Chibata, 1978). Keuntungan teknik amobilisasi diantaranya dapat meningkatkan stabilitas enzim, memudahkan pengendalian kondisi reaksi, enzim dapat digunakan berulang, dan kemurnian enzim maupun produk lebih tinggi. Namun, kekurangan teknik amobilisasi yaitu terjadinya penurunan aktivitas katalitik enzim dan terjadinya pergeseran pH atau suhu optimum dari enzim pada beberapa kasus (Sirisha *et al.*, 2016). Amobilisasi enzim dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok yaitu :

1. Metode Pengikatan

Metode pengikatan (*carrier-binding*) yang didasarkan pada pengikatan enzim dengan *carrier* atau matriks yang tidak larut dalam air. Aktivitas enzim amobil dipengaruhi oleh ukuran partikel dan luas permukaan matriks. Pengikatan dapat dilakukan dengan cara :

- a. Adsorpsi fisik yaitu enzim diadsorpsi pada permukaan matriks melalui ikatan hidrofobik, ikatan hidrogen, dan gaya Van der Waals. Namun, kekuatan ikatan antara enzim dan matriks cukup lemah dan rentan terhadap perubahan pH. Jika pH atau kekuatan ion berubah, maka akan terjadi kebocoran matriks. Matriks yang dapat digunakan, contohnya : bentonit, silika gel, zeolit, kitosan, dan alumina. Enzim dan matriks dapat dipisahkan kembali melalui filtrasi maupun sentrifugasi (Suhartono, 1989). Menurut penelitian Sedaghat *et al.*, (2009), amobilisasi enzim α -amilase dari *B. subtilis* menggunakan Na-bentonit termodifikasi oleh CTMAB memiliki kestabilan yang tinggi.
- b. Ikatan ionik antara gugus karboksil enzim bermuatan negatif dengan gugus amina suatu matriks bermuatan positif pada matriks yang tidak larut dalam air. Kelebihan dan kekurangan cara ini sama dengan cara adsorpsi fisik. Cara ikatan ion dapat dilakukan pada bahan pendukung yang mengandung residu penukar ion, baik penukar anion maupun penukar kation. Ikatan yang terbentuk relatif lebih kuat daripada adsorpsi sehingga kemungkinan perubahan konformasi lebih besar. Bahan pendukung yang dapat digunakan adalah DEAE selulosa dan karboksil metal selulosa (CMC).

c. Ikatan kovalen antara gugus fungsi enzim yaitu α atau β -amino; α , β , atau γ -karboksil; sulfohidril; hidroksil; imidazol; dan fenolik dengan matriks yang mengandung gugus reaktif seperti diazonium; asam azida; isosianat; dan halida. Ikatan yang terbentuk cukup kuat dalam mencegah kebocoran matriks. Namun, jika konformasi berubah maka aktivitas enzim akan hilang. Matriks yang digunakan pun sulit diregenerasi.

2. Metode Ikatan Silang

Cara ikatan silang dapat terbentuk antara molekul enzim yang berikatan kovalen satu sama lain oleh zat berikatan silang seperti glutaraldehid, yang membentuk struktur tiga dimensi yang tidak larut dalam air. Reagen pengikat silang harus memiliki dua atau lebih gugus fungsi. Reagen pembentuk ikatan silang yang sering digunakan adalah glutaraldehid, turunan isosianat, bisdiazobenzidina, N,N-etilen bismaleimida, dan N,N-polimetilen bisodoaseomida. Kerugian dalam pemakaian cara ini adalah dapat terjadinya inaktivasi enzim akibat pembentukan ikatan antara pusat aktif enzim dengan zat pengikat silang (Wiseman, 1985).

3. Metode Penjebakan

Metode penjebakan (*entrapment*) yaitu penggabungan enzim ke dalam kisi-kisi gel maupun polimer semipermeabel (mikrokapsul). Matriks gel yang dapat digunakan, antara lain: poliakrilamida, κ -karagenan, dan alginat. Polimer yang umum digunakan yaitu selulosa asetat dan amilum. Keunggulan metode ini yaitu tidak terjadinya perubahan konformasi dan inaktivasi enzim karena enzim tidak berikatan dengan matriks gel. Namun, kemampuan pembentukan kompleks enzim-substrat cukup rendah apalagi jika berat molekul terlalu besar karena terhalang kisi gel (Sirisha *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian Sankalia *et al.*

(2006), enzim α -amilase dapat diamobilisasi menggunakan matriks κ -karagenan melalui metode *entrapment*.

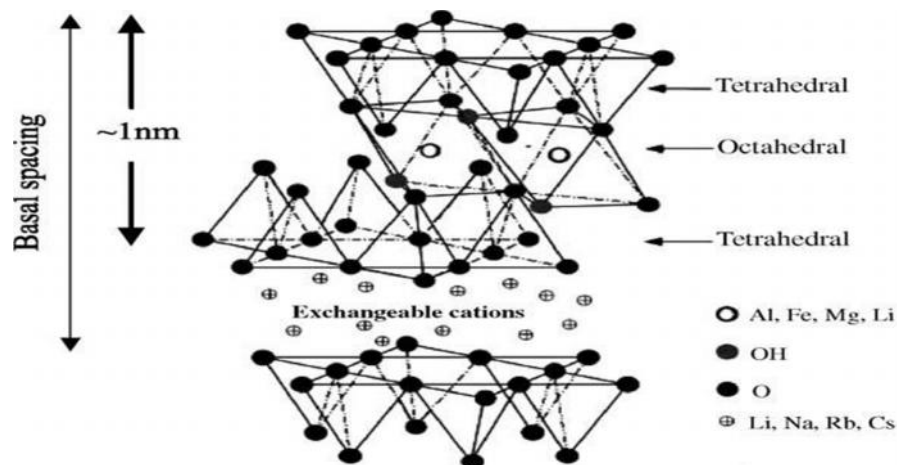
J. Bentonit

Bentonit adalah istilah lempung atau tanah liat (*clay*) yang sebagian besar terdiri dari montmorillonit dengan kadar 85-95 % bersifat plastik dan koloidal tinggi. Berdasarkan sifat fisiknya bentonit dibedakan atas Na-Bentonit dan Ca-Bentonit. Na-bentonit memiliki kandungan Na^+ yang besar ada antar lapisnya, memiliki sifat mengembang akan tersuspensi bila didispersikan ke dalam air. Pada Ca-Bentonit, kandungan Ca^{2+} dan Mg^{2+} relatif lebih banyak bila dibandingkan dengan kandungan Na^+ . Ca-bentonit bersifat sedikit menyerap air dan jika didispersikan ke dalam air akan cepat mengendap atau tidak terbentuk suspensi (Riyanto, 1992).

Struktur bentonit terdiri dari dua lapisan tetrahedral dan satu lapisan oktahedral. Dua lapisan tetrahedral akan saling bergabung pada ujung kisi silikat dengan hidroksil pada lapisan oktahedral, sehingga terbentuk tiga susunan lapisan tetrahedral-oktahedral-tetrahedral (TOT). Diantara lapisan oktahedral dan tetrahedral terdapat kation *monovalent* maupun *bivalent*, seperti Na^+ , Ca^{2+} , dan Mg^{2+} , disebut juga *interlayer exchangeable cations* (Ohtsuka, 1997).

Struktur utama bentonit selalu bermuatan negatif walaupun pada lapisan oktahedral ada kelebihan muatan positif yang akan dikompensasi oleh kekurangan muatan positif pada lapisan oktahedral. Hal ini terjadi karena adanya substitusi isomorfik ion-ion, yaitu pada lapisan tetrahedral terjadi substitusi ion Si^{4+} oleh Al^{3+} , sedangkan lapisan oktahedral terjadi substitusi ion Al^{3+} oleh Mg^{2+} dan Fe^{2+} .

Ruang dalam lapisan bentonit dapat mengembang dan diisi oleh molekul-molekul air dan kation-kation lain (Alexandre *and* Dubois, 2000). Struktur bentonit dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur kristal montmorillonit bentonit (Reza, 2012).

Amobilisasi enzim menggunakan bentonit dilakukan melalui metode *carrier binding* secara adsorpsi fisik, melibatkan pertukaran kation pada lapisan *interlayer* bentonit dengan RNH_3^+ yang berasal dari enzim. Selain itu, terdapat juga gaya Van der Waals sehingga interaksi yang terjadi antara bentonit dan enzim menghasilkan ikatan yang lemah dan enzim mudah terlepas kembali (Rosmanansari dkk., 2013). pH optimum enzim yang terikat pada matriks bentonit pada umumnya akan mengalami pergeseran ke arah asam dikarenakan bentonit mengandung banyak kation (polikationik) yang akan mengubah pH lingkungan enzim pada permukaan matriks (Wulandari, 2016).

Penggunaan bentonit sebagai bahan pendukung amobilisasi enzim didasarkan pada beberapa pertimbangan yaitu tidak larut dalam air, memiliki daya tukar ion yang besar, pH berkisar 4-7 (pH asam) sesuai pH optimum enzim α -amilase,

mengandung kation bivalen (Ca^{2+}) yang dapat menstabilkan enzim, tersedia cukup berlimpah di alam termasuk Indonesia, memiliki kestabilan mekanik dan termal, luas permukaan partikel yang besar sehingga dapat mengikat enzim dalam jumlah besar, tidak mengganggu reaksi enzimatik yang dikehendaki, rigid, murah, stabil (*inert*), dan non-toksik (Sedaghat *et al.*, 2009).

K. Bioetanol

Bioetanol merupakan etanol yang dihasilkan dari fermentasi glukosa (gula) yang dilanjutkan dengan proses destilasi. Produksi bioetanol saat ini terus dikembangkan baik dari pati maupun dari selulosa (Taherzadeh *and* Karimi, 2008), karena peranannya yang semakin penting, khususnya sebagai bahan bakar alternatif dan terbarukan. Meskipun bioetanol dapat dihasilkan dari dua jenis karbohidrat diatas, hingga saat ini pati masih menjadi bahan baku utama, karena karbohidrat ini lebih mudah dihidrolisis dibanding selulosa.

Pati merupakan golongan polisakarida yang terbentuk dari glukosa sebagai monomer dengan ikatan antar monomer adalah α -1,4. Pati memiliki sifat-sifat yang berbeda tergantung dari panjang rantai C-nya. Pati ditemukan dalam dua bentuk, yakni pati berantai lurus (amilosa) dan pati berantai cabang (amilopektin). Amilosa memberikan sifat keras sedangkan amilopektin menyebabkan sifat lengket. Hidrolisis dan fermentasi adalah dua tahap utama dalam produksi bioetanol. Hidrolisis merupakan tahap pengubahan atau penguraian karbohidrat menjadi gula reduksi. Hidrolisis pati menghasilkan gula reduksi merupakan reaksi bertahap, dan secara garis besar tahapan yang berlangsung adalah :

Pati → Dekstrin → Maltosa → Glukosa (Poedjiadi, 1994).

Hidrolisis pati menghasilkan gula reduksi dapat dilakukan dengan asam dan enzim. Hidrolisis asam merupakan suatu proses pemecahan molekul polisakarida oleh air dengan menggunakan bantuan katalis asam. Hidrolisis asam dapat dibagi dua kelompok yaitu hidrolisis asam pekat dan hidrolisis asam encer. Pada hidrolisis asam pekat dilakukan pada suhu yang rendah, memerlukan energi yang besar dan menghasilkan kadar gula reduksi yang tinggi serta bersifat korosi, sedangkan pada hidrolisis asam encer dilakukan pada suhu yang tinggi, serta menghasilkan kadar gula reduksi yang rendah (Taherzadeh *and* Karimi, 2008). Dari berbagai jenis asam, tiga asam yang sudah diteliti untuk hidrolisis pati adalah HCl, HNO₃, dan H₂SO₄.

Selain dengan hidrolisis asam, hidrolisis dilakukan dengan hidrolisis enzimatik. Pati dapat dipecah menjadi unit-unit yang lebih kecil yaitu dengan memotong ikatan-ikatan glikosidiknya. Salah satu enzim yang dapat memotong ikatan tersebut adalah enzim α -amilase. Enzim α -amilase adalah enzim yang kerjanya memutus ikatan α -1,4 secara acak di bagian dalam molekul baik pada amilosa maupun pada amilopektin. Sifat dan mekanisme kerja enzim α -amilase tergantung pada sumbernya. Umumnya α -amilase memotong ikatan di bagian tengah rantai sehingga menurunkan kemampuan pati mengikat zat warna iodium. Hidrolisis dengan α -amilase menyebabkan amilosa terurai menjadi maltosa dan maltotriosa. Pada tahap selanjutnya maltotriosa terurai kembali menjadi maltosa dan glukosa.

L. Fermentasi

Fermentasi adalah proses metabolik atau perubahan kimia yang berlangsung dalam substrat organik oleh aktivitas enzim yang dikeluarkan oleh mikroorganisme. Fermentasi alkohol merupakan suatu proses pengubahan gula reduksi menjadi bioetanol dengan bantuan mikroorganisme. Reaksi pembentukannya secara umum sebagai berikut :



Saat ini, jenis mikroorganisme yang sering digunakan dalam fermentasi alkohol adalah *Saccharomyces cerevisiae* karena jenis mikroorganisme ini dapat menghasilkan etanol dengan rendemen yang sangat tinggi, mudah ditemukan, memiliki laju pertumbuhan yang cepat dan stabil, serta membutuhkan nutrisi yang sederhana dan lebih mudah beradaptasi dengan lingkungan dibandingkan dengan jenis mikroorganisme lainnya (Walker, 2011).

Saccharomyces cerevisiae merupakan khamir sejati tergolong eukariot yang secara morfologi hanya membentuk blastospora berbentuk bulat lonjong silindris, oval atau bulat telur yang dipengaruhi oleh strainnya. Karakteristik khas dari *Saccharomyces cerevisiae* adalah kemampuannya untuk dapat memfermentasi berbagai karbohidrat. *Saccharomyces cerevisiae* berkembang biak dengan membelah diri melalui pertunasan. Reproduksi dapat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan serta jumlah nutrisi yang tersedia bagi pertumbuhan sel. Penampilan makroskopik mempunyai koloni berbentuk bulat, warna kuning muda, permukaan berkilau, licin, tekstur lunak dan memiliki sel bulat dengan

askospora 1-8 buah. Khamir dapat berkembang biak dalam gula sederhana seperti glukosa, maupun gula kompleks disakarida yaitu sukrosa. Dalam pertumbuhannya, khamir akan menghasilkan enzim yang mampu mengubah gula reduksi menjadi etanol.

Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi yaitu derajat keasaman atau pH, temperatur, oksigen, dan substrat. Pada proses fermentasi, pH sangat berpengaruh, karena mikroorganisme hanya dapat tumbuh pada kisaran pH tertentu sesuai jenis mikroorganismenya, misalnya untuk *Saccharomyces cerevisiae*, pertumbuhan yang optimal berlangsung pada pH 4,0-5,0 dalam media. Selain pH, suhu juga merupakan faktor penting dalam proses fermentasi, karena suhu sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan khamir. Secara umum suhu optimal untuk proses fermentasi adalah 30-40 °C. Selain itu, mikroorganisme juga memerlukan substrat yang mengandung nutrisi sesuai dengan kebutuhan yang diperlukan untuk pertumbuhannya. Proses fermentasi merupakan proses anaerobik, sehingga kadar oksigen sangat mempengaruhi proses fermentasi dan perlu dikontrol agar fermentasi dapat berlangsung secara optimal.

M. Kromatografi Gas

Kromatografi adalah teknik pemisahan yang didasarkan atas partisi sampel diantara suatu fasa gerak yang bisa berupa gas (kromatografi gas) ataupun cair (kromatografi cair) dan fasa diam yang juga bisa berupa cairan ataupun suatu padatan. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan polaritas dari fasa diam dan gerak. Dalam kromatografi gas, fasa yang bergerak adalah sebuah operator gas,

yang biasanya gas murni seperti helium atau yang tidak reaktif seperti gas nitrogen. Fasa diam merupakan tahap mikroskopis lapisan cair atau polimer yang mendukung gas murni, di dalam bagian dari sistem pipa-pipa kaca atau logam yang disebut kolom. Zat yang dipisahkan dilewatkan dalam kolom yang diisi dengan fasa tidak bergerak yang terdiri dari bahan halus yang cocok. Gas pembawa mengalir melalui kolom dengan kecepatan tetap, memisahkan zat dalam gas atau cairan ataupun dalam keadaan normal. Cara ini digunakan untuk percobaan identifikasi dan kemurnian atau untuk penetapan kadar.

Komponen dalam kromatografi gas terdiri dari gas pembawa, oven, pengatur tekanan gas, pengontrol aliran pembawa, injektor, kolom, detektor, dan pencatat. Gas pembawa yang sering digunakan pada kromatografi gas adalah gas nitrogen, helium, argon, hidrogen, dan karbon dioksida karena gas-gas tersebut tidak reaktif (Ratnaningsih, 2000). Gas pembawa akan mengemulsi komponen-komponen dari sampel melalui kolom yang mengandung fasa diam untuk proses pemisahan kemudian jumlah komponen sampel yang berhasil dipisahkan oleh kolom kromatografi gas akan dideteksi oleh detektor. Hasil kromatografi gas dapat dilihat dalam bentuk kromatogram, untuk tujuan kualitatif dilihat berdasarkan waktu retensinya sedangkan untuk tujuan kuantitatif dilihat berdasarkan luas puncak kromatogram.

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2018 - Juni 2018, bertempat di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis spektrofotometri UV-Vis dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis Kromatografi gas dilakukan di Laboratorium Organik Jurusan Kimia Universitas Gajah Mada.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (Ainsworth AA-160 Denver Instrument Company), spektrofotometer UV-Vis (Cary 100), kromatografi gas, inkubator (Precistern P Selecta), *autoclave* (S-90-N Electric Steroclave), *sentrifuse* (Sentrifus Fisher 225), tabung sentrifus, mikropipet (100 μ L-1000 μ L), *Laminar Air Flow* (9005-FL Crumair), *waterbath* (Memmert W 350), *shaker incubator* (Environ Shaker-Lab Line), *magnetic stirrer*, oven, bunsen, kompor, *freezer*, jarum ose, spatula, termometer, batang pengaduk, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur (5 mL-1000 mL), labu ukur (5

mL-500 mL), erlenmeyer (50 mL-2000 mL), *beaker glass* (100 mL-1000 mL), corong gelas, dan statif.

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dan *Saccharomyces cerevisiae* dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Fermentasi ITB.

Bahan-bahan yang digunakan adalah bentonit (Aldrich), kasa, *Nutrient Agar* (2 g/100 mL), pati (amilum), onggok singkong, ragi yang dibeli di pasar stasiun labuhan ratu, *yeast extract*, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, buffer fosfat (NaH_2PO_4 dan Na_2HPO_4), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, akuades, kapas lemak, pereaksi iodine (KI/I_2), HCl pekat, NaOH, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na/K tartarat, *folin-ciocelteau*, larutan Bovine Serum Albumin (BSA), larutan glukosa, *Carboxymethyl Cellulase* (CMC), *Dinitrosalicylic Acid* (DNS), fenol, HCl 7 %, NaOH 7 %, Na_2SO_3 , Na_2CO_3 , alkohol 70%, aluminium foil, kertas, tisu, karet gelang, kertas pH universal, es, dan kertas saring.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembiakan *B. subtilis* ITBCCB148 dan *S. cerevisiae*

Media agar miring *B. subtilis* ITBCCB148 dibuat dengan melarutkan 1 g NA dan 0,5 g pati ke dalam 50 mL akuades. Pembiakan dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Setelah agar mengeras dan bebas kontaminan, diambil satu tarikan ose biakan murni *B. subtilis* ITBCCB148 lalu digoreskan secara zig-zag ke permukaan media agar miring (Hadjoetomo, 1993). Biakan baru *B. subtilis* ITBCCB148 kemudian ditumbuhkan dalam inkubator ± 3 hari.

Media *S. cerevisiae* dibuat dengan melarutkan 0,5 g *yeast extract*, 1 g *pepton*, 2 g glukosa, dan 3 g agar ke dalam 100 mL akuades. Pembiakan dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Setelah agar mengeras dan bebas kontaminan, diambil satu tusukan ose biakan murni *S. cerevisiae* lalu ditusukkan ke permukaan media agar miring (Nisa dkk., 2013). Biakan baru *S. cerevisiae* kemudian ditumbuhkan dalam inkubator ± 3 hari.

2. Produksi Enzim α -amilase

Media inokulum dan media fermentasi terdiri dari 0,5% pati; 0,5% *yeast extract*; 0,05% KH_2PO_4 ; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam buffer fosfat 0,2 M (pH 6,5) sambil dipanaskan (Tiarsa, 2017). Media inokulum dibuat dalam 100 mL, sedangkan media fermentasi dalam 5000 mL. Setelah itu, media disterilisasi dalam *autoclave* selama 15 menit, lalu didiamkan dalam kondisi aseptis ± 12 jam. Selanjutnya, dipindahkan 3 tarikan ose biakan dari media agar miring ke dalam media inokulum secara aseptis. Inokulum diinkubasi sambil dikocok dalam *shaker incubator* selama 24 jam. Kemudian, dipindahkan ke media fermentasi sebanyak 2% dari volume media fermentasi. Selanjutnya, dikocok dalam *shaker incubator* selama 72 jam (Yandri *et al.*, 2010).

3. Isolasi Enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148

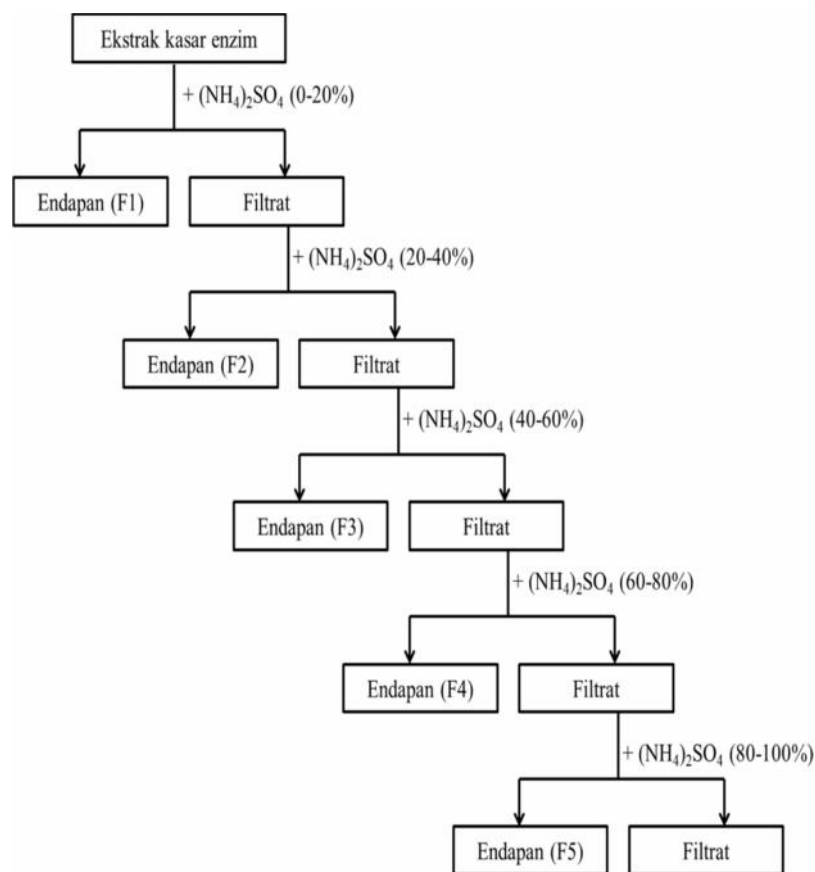
Hasil fermentasi disentrifugasi dingin selama 20 menit dengan kecepatan 5000 rpm (Yandri *et al.*, 2010). Filtrat atau supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim α -amilase, selanjutnya diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa, metode Mandels, dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

4. Pemurnian Enzim α -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148

a. Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh kemudian diendapkan dari larutannya dengan ammonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-20); (20-40); (40-60); (60-80); dan (80-100)%.

Untuk skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Skema fraksinasi bertingkat dengan $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$.

Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat, kemudian dipisahkan dari filtratnya melalui sentrifugasi pada kecepatan

5000 rpm selama 20 menit. Endapan atau pellet yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 6,5 dan diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa, metode Mandels, dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

b. Dialisis

Endapan enzim dari tiap fraksi hasil fraksinasi yang memiliki aktivitas tertinggi kemudian dimurnikan dengan cara dialisis melalui membran semipermeabel (kantong selofan) dan menggunakan buffer fosfat pH 6,5 0,01 M selama 24 jam pada suhu dingin (Feraliana, 2011). Selama dialisis, dilakukan pergantian bufer selama 4 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Hal ini juga digunakan untuk mencegah kantong selofan tersebut pecah (Pohl, 1990). Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Fuwa, metode Mandels, dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

5. Uji Aktivitas Unit (AU) Enzim α -amilase Metode Fuwa

a. Pembuatan Pereaksi

Pembuatan pereaksi iodin yaitu dengan cara melarutkan 1 g KI dalam 5 mL akuades di dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan 0,1 g I_2 . Kemudian ditambahkan akuades hingga batas meniskus.

Pembuatan larutan pati 0,1% yaitu dengan cara melarutkan 0,1 g pati dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga larut.

Pembuatan larutan HCl 1 N yaitu pengenceran HCl pekat 12 N menjadi 1 N, dengan cara sebanyak 4,17 mL HCl pekat dilarutkan dalam akuades hingga batas meniskus pada labu ukur 50 mL.

b. Uji Aktivitas Unit

Sebanyak 0,25 mL enzim ditambahkan 0,25 mL larutan pati 0,1%, kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Untuk kontrol, pati ditambahkan setelah enzim diinaktivasi dengan HCl 1N. Setelah diinkubasi, reaksi enzim dan substrat pati dihentikan dengan penambahan 0,25 mL HCl 1 N, selanjutnya ditambahkan 0,25 mL pereaksi iodin dan 4 mL akuades. Campuran diaduk rata dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm (Fuwa, 1954).

6. Uji Aktivitas Unit (AU) Enzim α -amilase Metode Mandels**a. Pembuatan Pereaksi**

Pembuatan pereaksi DNS yaitu dimasukkan 1 g DNS ke dalam labu ukur 100 mL, selanjutnya ditambahkan 1 g NaOH lalu dikocok hingga larut, kemudian ditambahkan 1 mL larutan Na(K)-tartarat 40%, 0,2 g fenol dan 0,05 g Na₂SO₃ kemudian dilarutkan dengan 100 mL aquades hingga tanda batas.

b. Uji Aktivitas Unit

Sebanyak 0,5 mL enzim ditambahkan 0,5 mL larutan pati 0,1% lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C. Untuk kontrol, pati ditambahkan setelah inkubasi. Setelah itu, ditambahkan 2 mL pereaksi DNS dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air. Kemudian, serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 510 nm (Mandels *et al.*, 2009). Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

7. Uji Kadar Protein Metode Lowry

a. Pembuatan Pereaksi

Pereaksi Lowry terdiri atas 4 macam, yang meliputi pereaksi A,B,C, dan D.

Pereaksi A dapat dibuat dengan cara melarutkan 2 g Na_2CO_3 dengan 100 mL

NaOH 0,1 N. Pereaksi B dapat dibuat dengan cara menambahkan 5 ml

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (w/v) ke dalam 5 mL larutan Na(K)-tartarat 1%. Pereaksi C

dapat dibuat dengan cara menambahkan 2 mL pereaksi B dan 100 mL pereaksi A.

Pereaksi D dapat dibuat dengan cara mengencerkan reagen *folin-ciocelteau*

dengan akuades 1:1. Larutan standar yang digunakan yaitu larutan BSA dengan

kadar 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

b. Uji Kadar Protein

Sebanyak 0,1 mL enzim, 0,9 mL aquades, dan 5 mL pereaksi C dicampur lalu

dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan 0,5 mL

pereaksi D dan diaduk sempurna. Untuk kontrol 0,1 mL enzim diganti dengan

1 mL aquades. Larutan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Setelah

itu absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 750 nm

(Ferialiana, 2011; Lowry *et al.*, 1951). Kadar protein ditentukan dengan kurva

standar larutan BSA yang diukur pada λ 280 nm berdasarkan persamaan regresi

linier.

8. Amobilisasi Enzim menggunakan Bentonit

Amobilisasi enzim dilakukan menggunakan metode pengikatan (*carrier-binding*)

dengan adsorpsi fisik.

a. Penentuan pH Buffer Pengikatan dan Pelepasan Enzim Amilase pada Bentonit

Sebanyak 0,25 g serbuk bentonit dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, lalu distabilkan menggunakan buffer fosfat dengan variasi pH yaitu 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; dan 7,5. Kemudian dipisahkan melalui sentrifugasi lalu ditambahkan 0,5 mL enzim hasil dialisis dan 2 mL buffer fosfat sesuai variasi pH masing-masing. Campuran tersebut diaduk lalu dipisahkan melalui sentrifugasi. Supernatan atau filtrat yang diperoleh ditentukan aktivitasnya dengan metode Mandels. pH buffer yang dapat memberi aktivitas enzim terendah saat pengikatan enzim-matriks sekaligus memberi aktivitas yang tinggi saat pelepasan enzim-matriks akan digunakan sebagai pH buffer pengikatan dan pelepasan enzim-matriks (Tiarsa, 2017; Yandri *et al.*, 2010).

b. Amobilisasi Enzim

Enzim yang telah terikat dalam matriks bentonit pada pH optimum pengikatan dan pelepasan, lalu ditambahkan substrat pati dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Kemudian, enzim amobil dipisahkan dari matriksnya melalui sentrifugasi selama 45 menit dan diuji aktivitasnya menggunakan metode Mandels.

9. Karakterisasi Enzim α -amilase Murni dan Amobil

a. Penentuan Suhu Optimum

Suhu optimum ditentukan, dengan menggunakan variasi suhu yaitu 50; 55; 60; 65; 70; dan 75 °C. Kemudian, diuji dan dibandingkan aktivitas sisa (%) enzim murni dan amobil menggunakan metode Mandels.

b. Penentuan Nilai K_M dan V_{maks}

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim murni dan amobil dapat ditentukan dari persamaan *Lineweaver-burk* pada hubungan antara laju reaksi enzim terhadap konsentrasi substrat. Untuk konsentrasi substrat divariasikan yaitu 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1% pada suhu 60°C selama 30 menit. Selanjutnya, diukur aktivitas sisa (%) enzim dengan metode Mandels.

c. Uji Stabilitas Termal Enzim

Uji stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa (%) enzim setelah diinkubasi dengan variasi waktu inkubasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, dan 80 menit pada suhu 60°C.

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas unit enzim pada } t_i}{\text{Aktivitas unit enzim pada } t_o} \times 100\%$$

(Yandri *et al.*, 2010).

d. Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_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_o ($[E]_o$) 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 (ΔG_i) enzim murni dan enzim amobil, diturunkan dari persamaan termodinamika :

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

Keterangan :

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

T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

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

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

e. **Penentuan Berulang Enzim Amobil**

Enzim amobil yang telah digunakan (perlakuan dengan substrat) dicuci dengan buffer fosfat 0,1 M pH pengikatan 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 (Yandri *et al.*, 2010).

10. Konversi Pati Onggok

a. **Preparasi Sampel**

Onggok dengan variasi konsentrasi 1, 5, 7, 8, dan 10% masing-masing ditambahkan 100 mL akuades. Kemudian larutan onggok dipanaskan selama 15 menit sampai menjadi bubur sambil diaduk (Juariah dkk., 2004).

b. Konversi Pati Onggok menjadi Glukosa

Hidrolisis pati onggok menjadi glukosa dengan teknik sakarifikasi menggunakan α -amilase. Sampel hasil preparasi diambil 50 mL dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Setelah itu, sampel didinginkan sampai mencapai 40 °C. Matriks bentonit ditambahkan enzim α -amilase sebanyak 5 mL, ditambahkan 2 mL buffer fosfat yang sesuai. Setelah itu didinginkan dalam *freezer* selama 10 menit dan disentrifuga. Matriks enzim-bentonit ditambahkan 50 mL substrat onggok dan diinkubasi (variasi 30 dan 60 menit) pada suhu 60 °C. Pada konsentrasi onggok dilakukan variasi yaitu Filtrat dan matriks enzim-bentonit dipisahkan dengan sentrifuga. Kemudian filtrat hasil sentrifuga disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 15 psi dan pada suhu 121 °C selama 15 menit (Sari, 2013). Hasil tersebut akan digunakan sebagai proses fermentasi bioetanol.

c. Penentuan Gula Reduksi dalam Sampel

Sebanyak 0,5 mL sampel gula reduksi dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2 mL pereaksi DNS lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu 100 °C. Selanjutnya sampel didinginkan pada suhu ruang. Sampel dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 510 nm menggunakan metode Mandels. Kadar gula reduksi dalam sampel ditentukan dengan kurva standar glukosa (Sari, 2013).

11. Produksi Bioetanol

a. Inokulum

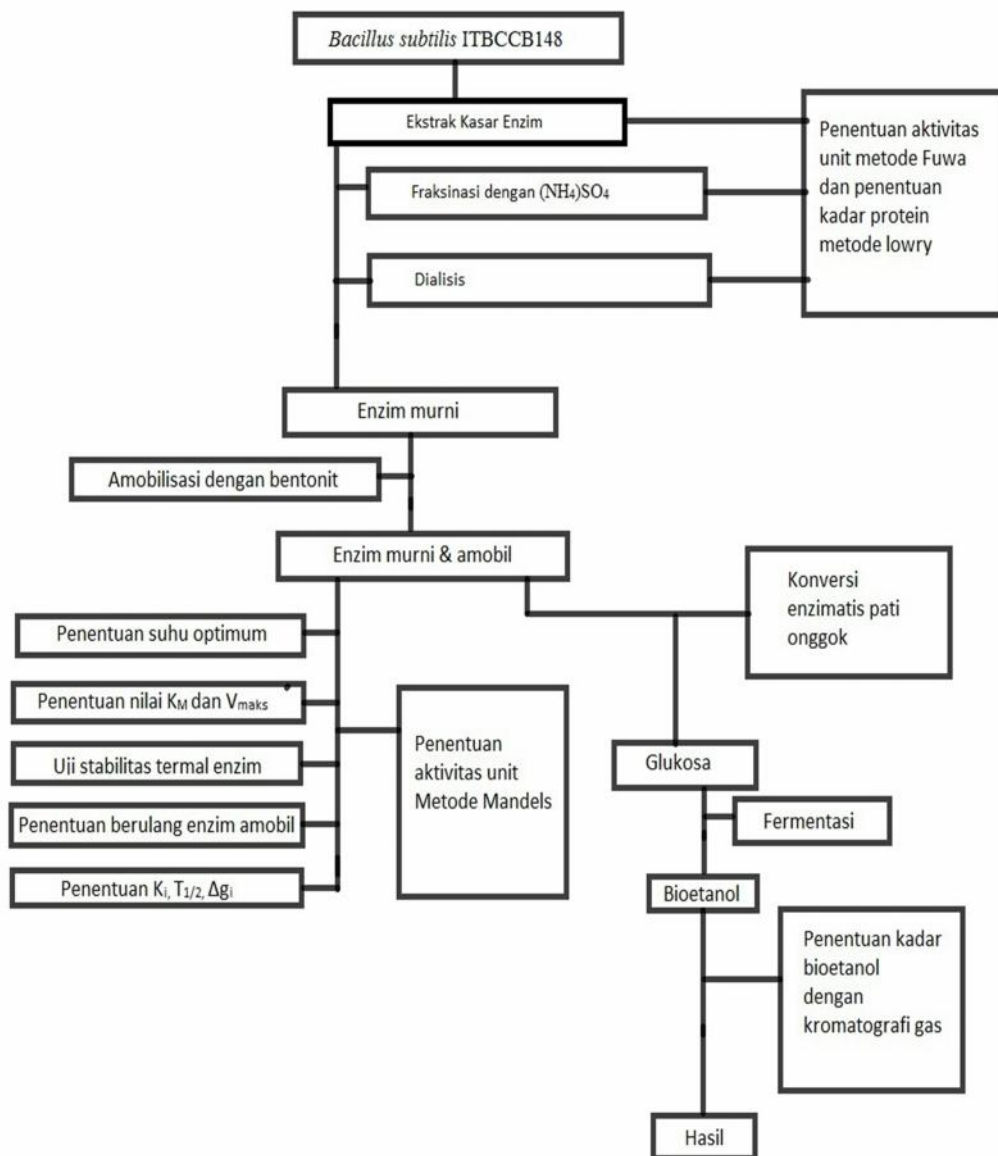
Media inokulum dibuat dengan memasukkan 0,5 % *yeast extract*, $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 0,2 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 %, dan glukosa 2 % ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan

akuades sebanyak 100 mL. Campuran dipanaskan sampai mendidih lalu ditutup dengan kapas atau sumbat dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 15 psi dan pada suhu 121 °C dalam selama 15 menit. Selanjutnya didiamkan dalam keadaan aseptis selama semalam. Media inokulum ditambahkan kultur biakan murni *S. cerevisiae* dan ragi berturut-turut yaitu 2 ose dan 1% ragi. Kemudian didiamkan kembali dalam keadaan aseptis selama 24 jam (Yandri *et al.*, 2010).

b. Fermentasi

Media Fermentasi yang digunakan adalah glukosa hasil sakarifikasi masing-masing sebanyak 50 mL. Larutan disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 15 psi dan pada suhu 121 °C dalam waktu 15 menit. Kemudian larutan glukosa didiamkan dalam keadaan aseptis selama 24 jam. Larutan glukosa diatur menjadi pH 4,5. Apabila belum mencapai pH yang dikehendaki maka dapat ditambahkan larutan HCl 7 % atau NaOH 7%. Setelah itu, ditambahkan media inokulum sebanyak 10 % dari volume inokulum pada masing-masing fermentasi, Selanjutnya, fermentasi didiamkan dalam shaker inkubator selama 7 hari. Pemisahan etanol dari mikroorganisme dan ragi pada media fermentasi dilakukan melalui proses sentrifugasi pada 5000 rpm selama 20 menit. Untuk mengetahui keberadaan alkohol, maka hasil bioetanol akan dianalisis menggunakan kromatografi gas (Elevri dan Putra, 2006).

Skema singkat mengenai prosedur penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Skema penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Aktivitas spesifik enzim α -amilase hasil pemurnian hingga tahap dialisis sebesar 22.388,82 U/mg dan kemurniannya meningkat hingga 32,61 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim dengan perolehan 24,18%.
2. Enzim α -amilase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 55°C, $K_M = 4,8$ mg mL⁻¹ substrat, $V_{maks} = 50$ μ mol mL⁻¹ menit⁻¹, dan aktivitas sisa pada uji stabilitas termal dalam suhu 60°C selama 80 menit sebesar 28 %.
3. Enzim α -amilase hasil amobilisasi memiliki suhu optimum 60°C, $K_M = 9,81$ mg mL⁻¹ substrat, $V_{maks} = 34,01$ μ mol mL⁻¹ menit⁻¹, dan aktivitas sisa pada uji stabilitas termal dalam suhu 60°C selama 80 menit sebesar 61%.
4. Enzim amobil dapat digunakan berulang hingga 6 (enam) kali pengulangan.
5. Uji stabilitas enzim hasil pemurnian pada suhu 60°C memiliki nilai $t_{1/2} = 49,5$ menit, $k_i = 0,014$ menit⁻¹, dan $\Delta G_i = 98,655$ kJ mol⁻¹.
6. Uji stabilitas enzim hasil amobilisasi pada suhu 60°C memiliki nilai $t_{1/2} = 138,6$ menit, $k_i = 0,005$ menit⁻¹, dan ΔG_i yaitu 107,876 kJ mol⁻¹.

7. Hasil fermentasi oleh *Saccharomyces cereviciae* pada pati onggok yang dikonversi dengan enzim α -amilase sebagai bioetanol diperoleh dengan kadar 0,215%.
8. Hasil fermentasi oleh ragi pada pati onggok yang dikonversi dengan enzim α -amilase sebagai bioetanol diperoleh dengan kadar 0,247%

B. Saran

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

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M., and Dubois, P. 2000. Polymer-layered Silicate Nanocomposites: Preparation, Properties and uses of A New Class of Materials. *Material Science and Engineering*. **28**: 1-12.
- Barrow, G.I. and R.K.A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge University Press. New York.
- Boyer, R.F. 2012. *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques Second Edition*. Pearson Education, Inc. USA.
- Chang, M.Y. and R.S. Juang. 2004. Activities, Stabilities and Reaction Kinetics of Three Free and Chitosan-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.
- Chibata, I. 1978. *Immobilized Enzyme. Research and Development*. Halsted Press Book. New York. pp 298.
- Chrisnasari, R., R.K. Widi, B.A. Halim, dan M.G.M. Purwanto. 2014. Imobilisasi Enzim Lipase pada Ca-Bentonit serta Aplikasinya pada Produksi Asam Lemak Omega-3 dari Limbah Minyak Ikan. *Prosiding. Program Studi Biologi Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya*. Surabaya.
- Dryer, R.L. 1993. *Biokimia Jilid 1*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Elevri, P.S. dan S.R. Putra. 2006. Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Diamobilisasi dengan Agar Batang. *J. Akta Kimindo*. **1** (2): 105-114.
- Faatih, M. 2009. Isolasi dan Digesti DNA Kromosom. *J. Saintek*. **10** (1): 61-67.
- Feraliana. 2011. Amobilisasi Enzim α -Amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan menggunakan Karboksi Metil Sephadex C-50 (CM-Sephadex C50). *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 : 443-444.
- Fuwa, H. 1954. A New Method for Microdetermination of Amylase Activity by The Use of Amylase as The Substrate. *J. Biochem.* **41** (5): 583-603.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium.* Gramedia. Jakarta.
- Harvey, D. 2000. *Modern Analytical Chemistry.* The McGraw-Hill Companies, Inc. USA.
- Hendri, J. 1999. Kondisi Optimum Pembuatan Selulosa Nitrat dari Onggok. *J. Sains dan Teknologi.* **5** (1): 5-10.
- Illanes, A. 1999. Stability of Biocatalysts. *Electronic Journal of Biotechnology.* Universitas Catolica de Valparaiso. Chile. **2** (1).
- Juariah, S., A. Susilowati, dan R. Setyaningsih. 2004. Fermentasi Etanol dari Limbah Padat Tapioka (Onggok) oleh *Aspergillus niger* dan *Zymomonas mobilis*. *Bioteknologi.* **1** (1): 7-12.
- Judoamidjojo, R.M., Gumbira S.E., dan Hartoto L. 1989. *Biokonversi.* Depdikbud Dirjen Dikti. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Kazan, D. H. Ertan and A. Erarslan. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* Penicillin G Acylase Against Thermal Inactivation by Cross-linking with Dextran Dialdehyde Polymers. *App. Micro. Biotech.* **48**: 191-197.
- Krajewska, B. 2004. Application of Chitin and Chitosan - Based Materials for Enzyme Immobilization : a review. *Enzyme and Microbial Technology.* **35**: 126-139.
- Kurnia, D.R.D. 2010. Studi Uji Aktivitas Enzim Lipase dari *Aspergillus Niger* sebagai Biokatalisi pada Proses Gliserolisis untuk Menghasilkan Monoasilgliserol. *Tesis.* Universitas Diponegoro. Semarang.
- Lamiya dan Mareta. 2010. Penyiapan Bahan Baku dalam Proses Fermentasi untuk Pakan Ternak. *Laporan.* Universitas Diponegoro. Semarang.
- Lehninger, A.L. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia.* Alih bahasa oleh Maggy Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein Mesurement with The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1): 265-275.

- Mandels, M., D.E. Eveleigh, R. Andreotti, and C. Roche. 2009. Measurement of Saccharifying Cellulose. *J. Biotech. Biofuel.* **2** (21): 1-8.
- Mangunwidjaja, D. dan A. Suryani. 1994. *Teknologi Bioproses*. Penebar Swadaya. Jakarta. 177-180.
- Martoharsono, S. 1981. *Biokimia*. UGM Press. Yogyakarta.
- Nisa, K., Wuryanti, dan Taslimah. 2013. Isolasi, Karakterisasi dan Amobilisasi α -amilase dari *Aspergillus niger* FNCC 6018. Jurusan Kimia. FMIPA. Universitas Diponegoro. Semarang. **1**: 141-149.
- 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.
- Nubarov, N.S., V.V. Mozheav, V.A. Siksni and K. Martinek. 1987. Enzyme Stabilization of α -Chymotrypsin by Reductive Alkylation with Glyoxylic Acid. *Biotechnol. Lett.* **9**: 725-730.
- Ohtsuka, K. 1997. Preparation and Properties of Two-Dimensional Microporous Pillared Interlayered Solids. *J. Chem. Mater.* **9** (1): 2039-2050.
- Orten, J.M. and O.W. Neuhaus. 1970. *Biochemistry* C.V. Mosby Company. Saint Louis. 430-435.
- Page, D.S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta. UI-Press. 155: 158-160.
- Pohl, T. 1990. *Concentration of Protein Removal of Salute dalam M.P. Deutscher, Methods of Enzymology: Guide to Protein Purification*. Academic Press. New York.
- Ratnaningsih, D. 2000. *Pengetahuan Umum Tentang Kromatografi Gas Spektrometri Massa (GCMS)*. Puser Pedal-Bapedal. Jakarta.
- Riyanto, A. 1992. *Bahan Galian Industri Bentonit*. PPTM. Bandung.
- Reza, Syah. 2012. Preparasi dan Karakterisasi Bentonit Tapanuli Terinterkalasi Surfaktan Kationik ODTMABr dan Aplikasinya sebagai Adsorben Paraklorofenol. *Skripsi*. Program Studi Kimia Fakultas MIPA Universitas Indonesia. Depok.
- Rodwell, V.W. 1987. *Harper's Review of Biochemistry*. EGC Kedokteran. Jakarta.

- Rosmanansari, N.S.D., A. Roosdiana, dan Sutrisno. 2013. Optimasi Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus subtilis* menggunakan Bentonit. *J. Kim. Student.* **1** (2): 243-249.
- Sankalia, M.G., R.C. Mashru, J.M. Sankalia, and V.B. Sutariya. 2006. Stability Improvement of Alpha-amylase Entrapped in Kappa-carrageenan Beads: Physicochemical Characterization and Optimization using Composite Index. *Int. J. Pharm.* **312** (1): 1-14.
- 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 starchy residue from *Mandioca* processing. *Int. J. Sci. Res.* **4** (10): 2277-8179.
- Sari, J.R. 2013. Optimalisasi Produksi Gula Reduksi dari Onggok sebagai Bahan Baku Bioetanol dengan Praperlakuan *Ultrasonikasi*. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Schelegel, H.G. dan K. Schmidt. 1994. Mikrobiologi Umum. UGM. Yogyakarta.
- Scopes, R.K. 1982. *Protein Purification*. Springer Verlag. New York.
- Sedaghat, M.E., H. Aghaei, and S. Soleimani-Zad. 2009. Enzyme Immobilization. Part 3: Immobilization of α -amylase on Na-bentonite and Modified Bentonite. *J. Clay.* **46** (1): 125-130.
- Shahib, M.N. 2005. *Biologi Molekuler Medik I*. Universitas Padjajaran Press. Bandung.
- Sirisha, V.L., A. Jain, and A. Jain. 2016. *Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes*. Elsevier Inc. India.
- Smith, J.E. 1990. *Prinsip Bioteknologi*. PT Gramedia. Jakarta.
- Soedigdo. 1988. *Metode Penelitian Biokimia*. PAU Bioteknologi ITB. Bandung.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sutrisno, M. dan C. Mahdi. 2014. Optimasi Amobilisasi Xilanase dari *Trichoderma viride* menggunakan Matriks Bentonit. *J. Kim. Student.* **2** (1): 435-440.

- Taherzadeh, M.J., and Karimi K. 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *J. Mol Science*. 9: 1621-1651.
- Thieman, W.J. and M.A. Palladino. 2009. *Introduction to Biotechnology, Second Edition*. Pearson Education, Inc. New York.
- Tiarsa, E.R. 2017. Amobilisasi Enzim α -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan Bentonit. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Tjiptadi. 1982. Telaah Pembuatan Glukosa dan Sifat Limbah Cairnya dengan Bahan Ubi Kayu secara Hidrolisa Asam dalam Rangka Meningkatkan Teknik Pengolahannya. *Tesis*. IPB. Bogor : 152.
- Virdianingsih, R. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari *Bacillus pumilus* y1 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Walker, G. 2011. Fuel Alcohol: Current Production and Future Challenges (125th Anniversary Review). *J. The Institute of Brewing*. 117: 3-22.
- Wheeler, B. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Winarno, F.G. 1989. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta : 40-45.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB Press. Bandung : 61-62.
- Wiseman, A. 1985. *Handbook of Enzymes Biotechnology 2nd ed*. Ellis Harwood Lim. Chicester.
- Wulandari, A.F. 2016. Amobilisasi Enzim Protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan Bentonit. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Yandri, A.S. dan P. Wulandari. 2009. Pengaruh Penambahan Sorbitol terhadap Stabilitas Termal Enzim α -amilase dari *Rhizopus oryzae*. *J. Sains MIPA*. **15** (2): 111-118.
- Yandri, A.S., T. Suhartati, and S. Hadi. 2010. Purification and Characterization of Extracellular α -amilase Enzyme from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Eur. J. Sci. Res*. **39** (1): 64-74.