

**KONVERSI ENZIMATIS TONGKOL JAGUNG MENJADI GLUKOSA
MENGUNAKAN ENZIM SELULASE DARI JAMUR *Aspergillus niger*
L-51 YANG DIAMOBILISASI DENGAN BENTONIT**

(Skripsi)

Oleh

ERIKA LIANDINI



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

ABSTRACT

ENZIMATIC CONVERSION OF CORN COBS TO GLUCOSE USING CELLULASE FROM *Aspergillus niger* L-51 MUSHROOM WHICH IS IMMOBILIZED WITH BENTONITE

By

Erika Liandini

Corn cobs are one of cellulosic agricultural waste which has big potential to convert into glucose by enzymatic saccharification using cellulose. The aim of this work is to observe the conversion of corn cobs into glucose using bentonite immobilized cellulose that obtains from *Aspergillus niger* L-51. The scope of this work are production, isolation, and purification of cellulose continuing by immobilized cellulose apply to hydrolyze corn cobs. Purification of cellulose using ammonium sulfate could increase the activity into 20 times compare with crude one. The crude one has activity at 5.0120 U/mg since the purified one at 99.889 U/mg. The purified cellulose has an optimum temperature at 55 °C; K_M is 22.4059 mg/mL substrate, V_{maks} is 1.1455 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{minute}^{-1}$, k_i value is 0.0073 minute^{-1} , half life ($t_{1/2}$) 95 minute, and ΔG_i is 103.5396 kJ/mol. On the other hand, the immobilized cellulose has an optimum temperature at 70 °C, K_M is 76.5089 mg/mL, V_{maks} is 2.7174 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{minute}^{-1}$, k_i value is 0.0063 minute^{-1} , half life ($t_{1/2}$) 110 minute, and ΔG_i is 103.935 kJ/mol. Using the data of k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i from purified cellulose and immobilized cellulose, it confirmed that the immobilized cellulose more stable than purified one. Application of immobilized cellulose to hydrolyze corn cobs substrate for 72 hours result glucose at 4.9783 mg/mL so far.

Key word: *Aspergillus niger* L-51, cellulase enzyme, immobilization, bentonite, hydrolysis, corn cobs.

ABSTRAK

KONVERSI ENZIMATIS TONGKOL JAGUNG MENJADI GLUKOSA MENGUNAKAN ENZIM SELULASE DARI JAMUR *Aspergillus niger* L-51 YANG DIAMOBILISASI DENGAN BENTONIT

Oleh

Erika Liandini

Tongkol jagung merupakan limbah pertanian yang mengandung selulosa yang dapat diubah glukosa melalui hidrolisis enzimatis menggunakan enzim selulase. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari proses konversi secara enzimatis tongkol jagung menjadi glukosa menggunakan enzim selulase dari jamur *Aspergillus niger* L-51 yang diamobilisasi dengan bentonit. Tahap penelitian ini meliputi produksi, isolasi, pemurnian, amobilisasi enzim selulase, dan hidrolisis tongkol jagung. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim hasil pemurnian meningkat 20 kali dengan aktivitas sebesar 99,889 U/mg dibandingkan dengan enzim ekstrak kasar yang memiliki aktivitas sebesar 5,0120 U/mg. Enzim selulase hasil pemurnian mempunyai suhu optimum 55 °C; K_M sebesar 22,4059 mg/mL substrat, V_{maks} sebesar 1,1455 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, nilai k_i sebesar 0,0073 menit^{-1} , waktu paruh ($t_{1/2}$) 95 menit, dan ΔG_i sebesar 103,5396 kJ/mol. Enzim hasil amobilisasi mempunyai pH optimum 7, suhu optimum 70 °C, K_M sebesar 76,5089 mg/mL, dan V_{maks} sebesar 2,7174 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, nilai k_i sebesar 0,0063 menit^{-1} , waktu paruh ($t_{1/2}$) 110 menit, dan ΔG_i sebesar 103,935 kJ/mol. Nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i yang diperoleh menunjukkan bahwa enzim hasil amobilisasi lebih stabil dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian sehingga digunakan untuk tahap hidrolisis. Hidrolisis tongkol jagung didapatkan kadar glukosa tertinggi pada waktu inkubasi selama 72 jam dengan kadar glukosa sebesar 4,9783 mg/mL.

Kata kunci: *Aspergillus niger* L-51, enzim selulase, amobilisasi, bentonit, hidrolisis, tongkol jagung.

**KONVERSI ENZIMATIS TONGKOL JAGUNG MENJADI GLUKOSA
MENGUNAKAN ENZIM SELULASE DARI JAMUR *Aspergillus niger*
L-51 YANG DIAMOBILISASI DENGAN BENTONIT**

Oleh

Erika Liandini

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

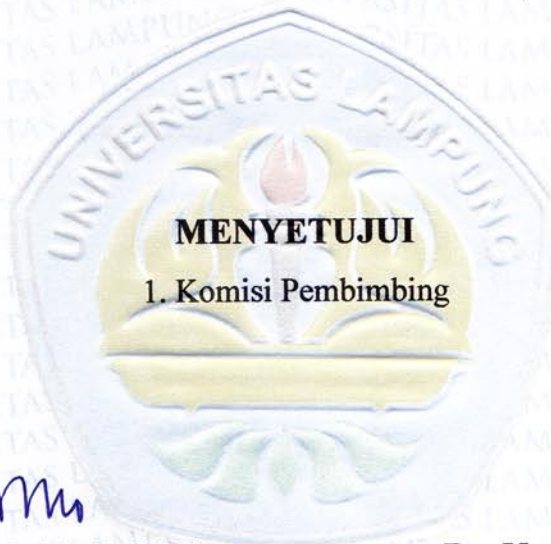
Judul Skripsi : **KONVERSI ENZIMATIS TONGKOL JAGUNG
MENJADI GLUKOSA MENGGUNAKAN ENZIM
SELULASE DARI JAMUR *Aspergillus niger* L-51
YANG DIAMOBILISASI DENGAN BENTONIT**

Nama Mahasiswa : **Erika Liandini**

No. Pokok Mahasiswa : 1417011034

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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



Dr. Nurhasanah, M.Si.
NIP 19741211 198002 2 001

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

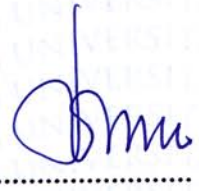


Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T.
NIP 19740705 200003 1 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

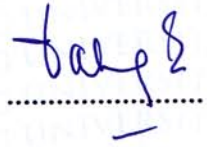
Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**



Sekretaris : **Dr. Nurhasanah, M.Si.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.**



2. a.n. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kerjasama



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



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **17 Januari 2019**

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan dikota Bandar Lampung pada tanggal 12 April 1997, sebagai anak bungsu dari tujuh bersaudara, putri dari Bapak Rakidin dan Ibu Suliah.

Penulis memulai pendidikan formal pada tahun 2002 di SDN 1 Kangkung dan lulus di tahun 2008. Kemudian penulis melanjutkan pendidikannya di SMP Negeri 15 Bandar Lampung dan lulus pada tahun 2011. Setelah itu, penulis melanjutkan pendidikan di SMA Tamansiswa Telukbetung dan lulus pada tahun 2014. Pada tahun 2014, penulis terdaftar sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Unila melalui jalur SBMPTN. Penulis aktif di organisasi Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) FMIPAUnila sebagai Kader Muda Himaki (KAMI) periode 2014/2015 dan anggota Biro Usaha Mandiri HIMAKI periode 2016. Pada tahun 2017, penulis telah melaksanakan Praktek Kerja Lapangan di Laboratoium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unila dan melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) selama 40 hari di Desa Triharjo Kecamatan Merbau Mataram Lampung Selatan. Selama menjadi Mahasiswa, penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia jurusan S1 Kimia semester Ganjil periode 2017/2018, praktikum Biokimia jurusan S1 Kimia semester Genap periode 2017/2018, praktikum Biokimia Umum jurusan S1 Biologi semester Genap periode 2017/2018, dan praktikum Teknik Penelitian dan Rekayasa Biokimia jurusan S1 Kimia periode 2018/2019.

MOTTO

“Mengawali setiap kegiatan dengan mengucapkan Bismillah dan mengakhirinya dengan mengucapkan Alhamdulillah menjadikan manusia lebih banyak bersyukur”

“Selalu melibatkan Allah SWT dalam setiap langkah tidak akan mengecewakan kita”

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillah Puji Syukur Atas Kehadirat Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang

Kupersembahkan karya sederhanaaku sebagai wujud kasih sayang, bakti, dan tanggung jawab kepada :

Kedua orang tuaku yang telah merawatku dengan penuh kasih sayang, yang selalu memberikan do'a terbaik, nasihat, dukungan, serta senantiasa berjuang untukku.

Kakak-kakakku yang selalu memberikan dukungan dan semangat untukku.

Para Ibu dan Bapak Dosen yang selama ini telah memberikan banyak ilmu pengetahuan, pelajaran, arahan, serta bimbingannya kepadaku.

Seluruh sahabat dan teman - teman terdekatku yang selama ini telah memberikan banyak dukungan, bantuan dan motivasi kepadaku.

Serta

Almamater yang tercinta

SANWACANA

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillahirobbil'alamin. Segala puji dan syukur penulis hanturkan atas kehadiran Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang, karena atas rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “ Konversi Enzimatis Tongkol Jagung menjadi Glukosa Menggunakan Enzim Selulase dari Jamur *Aspergillus niger* L-51 yang Diamobilisasi dengan Bentonit” dengan baik.

Shalawat serta salam tak lupa penulis hanturkan kepada Baginda Rasulullah SAW beserta keluarga dan sahabatnya yang dinantikan syafa'atnya di Yaumul Akhir kelas. Aamiin Ya Rabbal'alamin.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Selama menempuh pendidikan di Jurusan Kimia FMIPA Unila hingga penyusunan skripsi ini penulis tidak lepas dari dukungan, bantuan, serta motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Warsito, D.E.A., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam di Universitas Lampung, yang telah memberikan bantuan kepada penulis dalam penyelesaian skripsi ini.

2. Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M. T., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila yang telah memberikan bantuan kepada penulis dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Prof. Dr. Ir. Yandri A. S., M. S., selaku Dosen Pembimbing yang senantiasa memberikan bimbingan, arahan, saran, kritikan, motivasi, serta dukungan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
4. Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si, selaku Dosen Pembahas II yang telah memberikan bimbingan, arahan, saran, dukungan serta memberikan ilmunya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi dengan baik.
5. Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S., selaku Dosen Pembimbing Akademik dan Pembahas yang telah memberikan masukan berupa kritik dan saran, motivasi, arahan, serta dukungan kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
6. Bapak dan Ibu dosen terbaik Unila khususnya Jurusan Kimia FMIPA yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan, wawasan, motivasi, serta pengalaman-pengalaman yang menginspirasi.
7. Seluruh staff karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung, Terkhusus Pak Jon Isman sebagai Laboran Biokimia serta Pak Gani sebagai staff Administrasi terimakasih atas segala bantuannya selama ini kepada penulis.

8. Tercinta dan tersayang Ibu Suliah dan Bapak Rakidin, terima kasih atas segala kasih sayang, nasihat, bantuan, do'a yang terbaik serta segala perjuangan sehingga penulis sampai ketahap ini.
9. Saudara kandungku tersayang Sukaesih, S.E., Nurhayati S.Si., Juheriah, S.E., Caswanto, Hariyanto, S.Pd., Cipto Soedarno yang telah memberikan dukungannya kepada Adik bungsunya.
10. Saudara Iparku terkece Mas diding, Ka Lomba, Ka Yudha, dan Mba Wiwik yang telah memberikan semangat dan dukungannya.
11. Keponakan-keponakanku Sa'diyaturohimah, Rofiqoh, M. Mansyur Alghifari, Pelangi Ayesha Putri Guru, Pesona Semesta Putra Guru, Inayatul Khoiriyah, Uswatun Shidiqiyah, Perisai Benua Putra Guru, Filzah Mahira Yuri, dan M. Ali Bahrudin yang penulis sayangi.
12. Sahabatku tersayang "SMP Squad", Aftiyah Sulistiyah, Heni Nur Effendi, In Inayah, dan Safitri yang sudah memberikan semangat dan dukungannya, serta sabar menghadapi penulis yang cerewet, bawel dan suka marah-marah ini.
13. Sahabatku Jezzta Putri dan Firda Martha Rosadi, terimakasih sudah menjadi teman yang sepemikiran, sejalan, semoga kita sukses bareng. Aamiin.
14. Sahabat laki-laki paling baik Kholid dan Fikri yang sudah bersedia untuk direpotkan.
15. Sahabatku tercinta "Benzene" Audina Uci Pertiwi, Ayisa Ramadona, Dellania Frida Yulita, Elisabeth Yulinda Ari Puspita, dan Rizka Ari Wandari yang sudah mewarnai hari-hariku dikampus dan diluar kampus tercinta ini.
16. Teman MABA Riza Mufarida Akhsin, Kartika Dewi Rachmawati, Marliani Syaputri, Ulfah Lutfiani yang sudah menjadi bagian hidupku.

17. Teman-teman Yandri's *research* Rica Aulia, Riza Mufarida Akhsin, Bunga Lantri Dwinta, dan Ni Putu Rahma yang telah memberikan masukan, motivasi, dukungan kepada penulis.
18. Partner terbaik sepanjang masa 'Rica Aulia', terimakasih telah menjadi bagian terindah dalam hidupku, menjalani penelitian dari PKL hingga penelitian untuk skripsi bersama, menjadikan penelitian ini sedikit lebih ringan dengan kegagalan yang dibalas dengan kebahagiaan.
19. Teman-teman *peergroup* Biokimia Bidari Maulid Diana, Asrul Fanani, Leony Fransiska, Agung Setio Wibowo, Luthfi Hijrianto, dan Angga Hidayatullah yang telah memberikan canda dan tawa dalam Laboratorium Biokimia.
20. Kakak-kakak *peergroup* Biokimia terbaik, Surtini, S.Si., Ayu Imani, S.Si., Monika Damayanti, S.Si., Melia Tri A., S.Si., Riyan Wahyudi, S.Si., Meta Fosfi, S.Si., Rizky Putri Yana., S.Si., Syathira Assegaf., S.Si, Fifi Ardhyanti., S.Si, dan Kak Aziez yang telah memberikan saran, bantuan, motivasi, kehidupan menyenangkan yang telah diberikan selama penelitian di Laboratorium Biokimia.
21. Adik-adik *peergroup* Biokimia 2015, semangat dalam menjalankan penelitiannya, jangan mudah menyerah ketika gagal, ambil pelajarannya yang didapat.
22. Asrul, Bidari, Elisabeth., Rizka, Andino, Della, Ayi, Aftiyah, Jezzta, dan Fikri yang sudah menyediakan waktunya untuk membantu dan menemani selama penulis penelitian di luar jam kerja.
23. Keluarga Kimia 2014 " Chemistry'14" yang telah memberikan warna-warni kehidupan dunia perkuliahan.

24. Dona Mailani P., S.Si., yang sudah memberikan motivasi, semangat, dukungan, serta mendengarkan curhatan penulis.
25. Teman KKN Hesty Wahyu Handani yang masih menjalankan penelitian semoga cepat selesai. Aamiin.

Penulis berharap semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis selama ini. Aamiin Ya Rabbal'alamin. Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih sangat jauh dari kata sempurna, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan memiliki nilai guna khususnya rekan-rekan mahasiswa dan pembaca pada umumnya. Aamiin.

Bandar Lampung, Januari 2019
Penulis

Erika Liandini

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	3
C. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Tongkol Jagung.....	5
B. Selulosa	7
C. Hidrolisis Enzimatik	8
D. Enzim	9
E. Enzim Selulase.....	18
<i>F. Aspergillus niger</i>	20
G. Isolasi dan Pemurnian Enzim.....	22
H. Amobilisasi Enzim.....	27
I. Penentuan Aktivitas Selulase dengan Metode Mandels	31
J. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry.....	31
K. Bentonit.....	32
III. METODE PENELITIAN	
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	36

B. Alat dan Bahan.....	36
C. Prosedur Penelitian	37
1. Pembuatan media inokulum.....	37
2. Pembuatan media fermentasi	38
3. Isolasi enzim selulase.....	38
4. Pemurnian enzim selulase.....	39
5. Uji aktivitas enzim selulase metode Mandels	41
6. Penentuan kadar protein metode Lowry	42
7. Amobilisasi enzim selulase menggunakan bentonit	43
8. Karakterisasi enzim.....	44
9. Konversi enzimatik selulosa dari tongkol jagung	46

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Enzim Selulase dari Jamur <i>Aspergillus niger</i>	49
B. Hail Pemurnian Enzim Selulase dari <i>Aspergillus niger</i>	50
C. Penentuan pH Pengikatan untuk Proses Amobil	53
D. Karakter Enzim Selulase Hasil Pemurnian dan Amobil	54
1. Suhu optimum enzim selulase hasil pemurnian dan enzim selulase amobil.....	54
2. Stabilitas termal enzim selulase hasil pemurnian dan enzim selulase amobil.....	56
3. Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim selulase hasil pemurnian dan enzim selulase hasil amobil	57
4. Aktivitas sisa enzim amobil hasil pengulangan	59
E. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Perubahan ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Amobil	61
F. Hasil Konversi Enzimatik Tongkol Jagung menjadi Glukosa.....	62

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan	65
B. Saran	66

DAFTAR PUSTAKA	67
-----------------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Aktivitas dan kemurnian enzim selulase hasil isolasi dan hasil pemurnian dari <i>Aspergillus niger</i> L-51	53
2. Nilai konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energy akibat denaturasi (ΔG_i) enzim selulase hasil pemurnian dan hasil amobil	61
3. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas unit enzim selulase	73
4. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas unit enzim selulase	73
5. Hubungan antara suhu ($^{\circ}\text{C}$) aktivitas enzim selulase hasil amobil	74
6. Hubungan antara suhu ($^{\circ}\text{C}$) aktivitas enzim selulase hasil pemurnian	74
7. Hubungan antara aktivitas unit (U/mL) enzim selulase hasil pemurnian selama inaktivasi termal 90 menit	75
8. Hubungan antara aktivitas unit (U/mL) enzim selulase hasil amobil selama inaktivasi termal 90 menit	75
9. Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil amobil pada suhu 50°C	76
10. Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil pemurnian pada suhu 50°C	76
11. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim selulase hasil pemurnian berdasarkan persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	79
12. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim selulase hasil amobilisasi berdasarkan persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	79

13. Hubungan antara pengulangan enzim selulase hasil amobilisasi dengan aktivitas unit (U/mL)..... 80
14. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi untuk menentukan kurva standar glukosa..... 81
15. Absorbansi Bovine Serum Albumin (BSA) pada berbagai konsentrasi untuk menentukan kurva standar protein 83
16. Hubungan antara waktu inkubasi dan kadar glukosa hasil hidrolisis enzimatis tongkol jagung oleh enzim selulase yang diamobilisasi dengan bentonit dengan konsentrasi substrat tongkol jagung 3% 85
17. Hubungan antara waktu inkubasi dan kadar glukosa hasil hidrolisis enzimatis tongkol jagung oleh enzim selulase yang diamobilisasi dengan bentonit dengan konsentrasi substrat tongkol jagung 5% 85

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tongkol jagung	6
2. Struktur selulosa.....	7
3. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim	12
4. Hubungan konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi enzimatik	13
5. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu	14
6. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH	15
7. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase	20
8. Dialisis	24
9. Struktur bentonit	32
10. Skema proses fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat.....	40
11. Skema prosedur penelitian	48
12. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas unit enzim selulase dari <i>Aspergillus niger</i> L-51	51
13. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas unit enzim selulase dari <i>Aspergillus niger</i> L-51	52
14. Aktivitas unit enzim selulase pada beberapa pH pengikatan	54
15. Suhu optimum enzim selulase hasil pemurnian dan enzim selulase hasil amobil	55
16. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobil.....	57

17. Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobil.....	59
18. Pemakaian berulang enzim hasil amobil.....	60
19. Hubungan $\ln (E_i/E_0)$ enzim hasil pemurnian dan hasil amobil untuk penentuan nilai k_i , waktu paruh, dan ΔG_i	61
20. Hubungan antara waktu inkubasi dan kadar glukosa.....	63
21. Kurva standar glukosa	81
22. Kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA)	83

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data aktivitas enzim selulase hasil fraksinasi dengan ammonium sulfat	73
2. Data aktivitas enzim selulase hasil pemurnian dan hasil amobil pada variasi suhu	74
3. Data aktivitas enzim selulase hasil pemurnian dan hasil amobil selama inaktivasi termal 90 menit	75
4. Data untuk penentuan nilai k_i enzim selulase hasil pemurnian dan hasil amobil pada suhu 50 °C	76
5. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim selulase hasil pemurnian	77
6. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$ enzim selulase hasil amobil	78
7. Data penentuan K_M dan V_{maks} enzim selulase hasil pemurnian dan hasil amobil	79
8. Data aktivitas enzim selulase amobil hasil pengulangan enzim selulase hasil amobil	80
9. Data absorbansi glukosa dan kurva standar glukosa.....	81
10. Persamaan untuk menghitung aktivitas unit enzim selulase metode Mandels.....	82
11. Data absorbansi Bovine Serum Albumin (BSA) dan kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA).....	83
12. Persamaan untuk menghitung kadar glukosa protein enzim metode Lowry	
13. Data kadar glukosa hasil hidrolisis tongkol jagung pada konsentrasi 3% dan 5%	85

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Bahan lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman dengan komponen utama lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Ketersediaannya yang cukup melimpah, terutama sebagai limbah pertanian, perkebunan, dan kehutanan, menjadikan bahan ini berpotensi sebagai salah satu sumber energi melalui proses konversi, baik proses fisika, kimia maupun biologis (Hermiati dkk., 2010).

Kemajuan dalam teknologi konversi telah membuat biomassa lignoselulosa sebagai sumber potensial untuk produksi bahan bakar etanol. Limbah pertanian dan hasil hutan (lunak dan kayu keras) adalah bahan lignoselulosa utama, yang ditemukan dalam kelimpahan di seluruh dunia terutama terdiri dari selulosa, hemiselulosa, lignin dan pektin. Konversi selulosa dan hemiselulosa ke gula yang sesuai memberikan stok pakan untuk produksi berbagai bahan kimia dengan nilai tambah yang berbeda bersama dengan bahan bakar etanol (Devi *et al.*, 2011).

Materi dengan kandungan lignoselulosa telah diketahui sebagai bahan baku yang sangat potensial untuk menghasilkan bahan bakar alternatif ramah lingkungan serta senyawa-senyawa kimia. Limbah dari kegiatan pertanian adalah salah satu sumber materi berlignoselulosa. Berdasarkan kandungannya tersebut, limbah pertanian sangat berpotensi untuk menghasilkan senyawa gula sederhana yang

dapat diproses lebih lanjut untuk menghasilkan bahan bakar alternatif (Mardina dkk., 2013; Zheng *et al.*, 2009). Salah satu jenis limbah pertanian yang dapat diubah menjadi glukosa adalah tongkol jagung.

Tongkol jagung merupakan bagian dari tanaman jagung yang sudah tidak mengandung biji. Tongkol jagung mengandung selulosa yang cukup banyak. Menurut Rosmiati (2008) dalam Lestari dkk. (2015) tongkol jagung mengandung selulosa 48%, pentosan 36%, lignin 10%, abu 4%, dan air 2%. Kandungan selulosa pada tongkol jagung yang tinggi dan hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak mengakibatkan pemanfaatan limbah pertanian ini kurang maksimal. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan pengolahan limbah tongkol jagung dengan cara menghidrolisis kandungan selulosa menjadi glukosa sehingga pemanfaatan limbah tongkol jagung maksimal dan memiliki nilai ekonomis yang tinggi.

Hidrolisis selulosa menjadi glukosa dapat dilakukan menggunakan katalis asam atau secara enzimatik. Pada penelitian ini hidrolisis selulosa dilakukan menggunakan metode hidrolisis enzimatik. Hal ini karena metode hidrolisis secara enzimatik lebih sering digunakan dan lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan katalis asam. Hidrolisis enzimatik dapat dilakukan menggunakan jamur atau bakteri yang menghasilkan enzim selulase. Kelompok jamur yang dapat menghasilkan enzim selulase adalah jamur *Aspergillus niger* (Umbreit, 1967; Oktariani, 2017).

Enzim selulase mampu menguraikan selulosa dengan cara memutus ikatan β -1,4-glikosidik menghasilkan oligosakarida turunan selulosa untuk diubah menjadi

glukosa (Umbreit, 1967; Oktariani, 2017). Namun, kerja enzim sangat dipengaruhi oleh temperatur, pH, serta konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim. Apabila kerja enzim pada kondisi ekstrim, hal ini dapat mempengaruhi aktivitas enzim dalam menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Oleh karena itu, untuk menstabilkan kerja enzim dilakukan amobilisasi enzim.

Amobilisasi enzim adalah proses menahan pergerakan molekul enzim pada tempat tertentu dalam suatu ruang reaksi kimia yang dikatalisisnya. Enzim amobil adalah suatu enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak (Winarno, 1986). Penggunaan enzim amobil dalam industri memiliki beberapa kelebihan yaitu dapat digunakan berulang, dapat mengurangi biaya, produk tidak dipengaruhi oleh enzim, memudahkan pengendalian enzim, tahan pada kondisi ekstrim, dapat digunakan untuk uji analisis, meningkatkan daya guna, dan memungkinkan proses sinambung (Payne *et al.*, 1992; Oktariani, 2017). Enzim selulase dari *Aspergillus niger* ini diharapkan mampu menghidrolisis selulosa dari tongkol jagung menjadi glukosa.

B. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengisolasi enzim selulase dari jamur *Aspergillus niger* L-51.
2. Memurnikan enzim selulase dari *Aspergillus niger* L-51 dengan metode fraksinasi dan dialisis.

3. Memperoleh enzim selulase dengan stabilitas tinggi melalui amobilisasi menggunakan bentonit alam.
4. Memperoleh glukosa dengan cara menghidrolisis selulosa dari tongkol jagung oleh enzim selulase.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi dan pengetahuan mengenai cara mengisolasi dan memurnikan enzim selulase dari jamur *Aspergillus niger* L-51.
2. Memberikan informasi dan pengetahuan mengenai cara untuk meningkatkan stabilitas enzim selulase dengan amobilisasi menggunakan bentonit, sehingga diperoleh aktivitas terbaik.
3. Memberikan informasi dan pengetahuan mengenai cara menghidrolisis selulosa dari tongkol jagung menggunakan enzim selulase dari salah satu jamur penghasil selulase yaitu *Aspergillus niger*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tongkol Jagung

Tongkol pada jagung adalah bagian dalam organ betina tempat bulir duduk menempel. Istilah ini juga dipakai untuk menyebut seluruh bagian jagung betina (buah jagung). Tongkol terbungkus oleh kulit buah jagung. Secara morfologi, tongkol jagung adalah tangkai utama malai yang termodifikasi. Mulai organ jantan pada jagung dapat memunculkan bulir pada kondisi tertentu. Tongkol jagung muda, disebut juga *babycorn*, dapat dimakan dan dijadikan sayuran. Tongkol yang tua ringan namun kuat, dan menjadi sumber furfural, sejenis monosakarida dengan lima atom karbon.

Tongkol jagung merupakan salah satu limbah lignoselulosik yang banyak tersedia di Indonesia. Limbah lignoselulosa adalah limbah pertanian yang mengandung selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Masing-masing senyawa tersebut merupakan senyawa-senyawa yang potensial dapat dikonversi menjadi senyawa lain secara biologi. Selulose merupakan sumber karbon yang dapat digunakan mikroorganisme sebagai substrat dalam proses fermentasi untuk menghasilkan produk yang mempunyai nilai ekonomi tinggi (Fachry dkk., 2013). Tongkol jagung dapat dilihat pada Gambar 1.

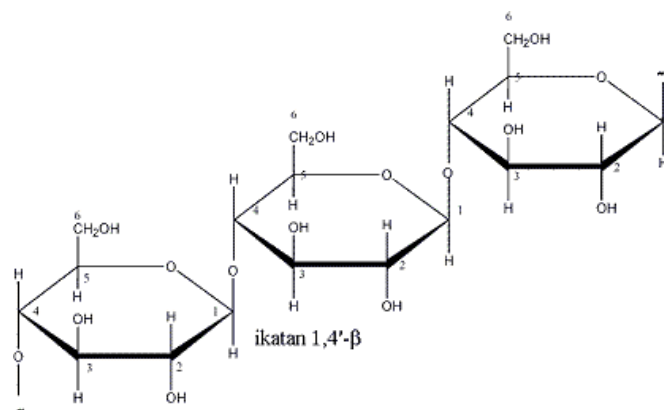


Gambar 1. Tongkol jagung (Ejiyurshal, 2017).

Karakteristik kimia dan fisika dari tongkol jagung sangat cocok untuk pembuatan tenaga alternative (bioetanol), kadar senyawa kompleks lignin dalam tongkol jagung adalah 6,7-13,9%, untuk hemiselulose 39,8% , dan selulose 32,3-45,6%. Selulose hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni, melainkan selalu berikatan dengan bahan lain yaitu lignin dan hemiselulose. Limbah buah jagung yaitu tongkol jagung, dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku industri dengan proses *biomass refining* berdasarkan sparasi fraksi-fraksi kimianya. Tongkol jagung adalah tempat pembentukan lembaga dan gudang penyimpanan makanan untuk pertumbuhan biji. Jagung mengandung kurang lebih 30 % tongkol jagung sedangkan sisanya adalah kulit dan biji. Limbah pertanian (termasuk onkol jagung), mengandung selulosa (40-60%), hemiselulosa (20-30%) dan lignin (15-30%). Komposisi kimia tersebut membuat tongkol jagung dapat digunakan sebagai sumber energi, bahan pakan ternak dan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan mikroorganism (Shofiyanto, 2008; Fachry dkk., 2013).

B. Selulosa

Selulosa merupakan jenis polisakarida yang paling melimpah dan merupakan konstituen utama pada setiap struktur tanaman serta di produksi juga oleh sebagian binatang dan sebagian kecil dari bakteri (Gozan, 2014). Selulosa merupakan senyawa organik yang paling melimpah di bumi, diperkirakan sekitar 10^{11} ton selulosa dibiosintesis per tahun (Fessenden dan Fessenden, 1992). Selulosa adalah polimer linier dari molekul D-glukosa yang merupakan ikatan bersama rantai β -1,4-glikosidik. Struktur selulosa dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur selulosa (Maula, 2012).

Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan asam atau enzim. Hidrolisis menggunakan asam biasanya dilakukan pada temperatur tinggi. Proses ini relatif mahal karena kebutuhan energi yang cukup tinggi. Baru pada tahun 1980-an, mulai dikembangkan hidrolisis selulosa dengan menggunakan enzim selulase (Gokhan, 2002; Aulia, 2017).

C. Hidrolisis Enzimatik

Hidrolisis enzimatik memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan hidrolisis asam, diantaranya dapat menurunkan resiko korosi pada alat proses serta mengurangi kehilangan energi pada bahan bakar produksi (Gozan, 2014). Selain itu, keuntungan lain dari hidrolisis enzimatik yaitu tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (suhu dan tekanan rendah, pH netral), serta proses enzimatik merupakan proses yang ramah lingkungan (Gunam dkk., 2011; Habibah, 2015).

Kekurangan dari hidrolisis enzimatik ini adalah lajunya akan menurun seiring meningkatnya konsentrasi glukosa di dalam reaktor. Inhibisi oleh glukosa ini pada akhirnya akan menghentikan proses hidrolisis kecuali ada mekanisme khusus untuk mengambil glukosa yang terbentuk (Gozan, 2014). Selain itu, hidrolisis enzimatik memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan hidrolisis kimiawi (Gunam dkk., 2011; Habibah, 2015).

Enzim yang digunakan untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa adalah enzim selulase karena strukturnya yang rigid, selulosa kristalin resistan terhadap aksi individual selulase. Enzim Selulosa dapat berasal dari jamur *Aspergillus niger*. Konversi efektif dari selulosa menjadi monosakarida hanya dimungkinkan oleh kerja sinergis dari ketiga subgrup selulase yaitu :

- a. Endo- β -1,4-D-glukanase yang memecah ikatan internal glukosidik yang berada di antara glukosa yang utuh.

- b. Exo- β -1,4-D-glukanase/Exo- β -1,4-D-selobiohidrolase yang memecah dimer selubiosa dari rantai glukosa dan melepaskan ke dalam larutan.
- c. B-glukosidase yang menyempurnakan hidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan memecah selubiosa menjadi monomer glukosa (Gozan, 2014).

D. Enzim

Enzim adalah biokatalis yang memiliki spesifikasi tinggi dan bekerja dengan kecepatan perubahan yang tinggi pada kondisi fisik yang lunak dalam larutan cair. Enzim tersebut terjadi secara alami di dalam semua organisme hidup, tetapi juga dapat terjadi di alam sebagai enzim ekstraseluler yang dikeluarkan oleh organisme ke dalam lingkungan (Smith, 1990). Enzim mengubah kecepatan suatu reaksi kimia tetapi tidak mempengaruhi kesetimbangan akhir reaksi. Enzim memiliki suatu spesifikasi yang terbatas, misalnya enzim hanya akan mengkatalis suatu reaksi yang memiliki nilai kecil atau hanya satu reaksi saja.

Fungsi enzim ialah sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 hingga 10^{11} kali lebih cepat dari pada reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis. Enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia. Reaksi kimia yang membutuhkan energi disebut reaksi endergik dan yang menghasilkan energi disebut reaksi ekserogenik. Suatu enzim mempunyai ukuran yang lebih besar dari pada substrat, sehingga tidak seluruh bagian enzim yang bekerja untuk mengikat substrat.

Hubungan enzim dengan substrat hanya terjadi pada bagian atau tempat tertentu saja. Tempat untuk menghubungkan antara enzim dengan substrat disebut sebagai

bagian aktif (*active side*). Hubungan antara kompleks enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim-substrat. Kompleks ini merupakan kompleks yang aktif, yang bersifat sementara dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi.

Menurut Michaelis dan Menten, kecepatan reaksi tergantung pada konsentrasi kompleks enzim-substrat [ES], karena apabila tergantung pada konsentrasi substrat [S], maka penambahan konsentrasi substrat akan menghasilkan penambahan kecepatan reaksi yang apabila digambarkan akan merupakan garis lurus. Secara umum reaksi dengan enzim dituliskan sebagai berikut:



k_1, k_2 , dan k_3 masing-masing ialah tetapan kecepatan reaksi pembentukan kompleks ES, tetapan (konstanta) kecepatan reaksi pembentukan kembali E dan S, dan tetapan (konstanta) kecepatan reaksi penguraian kompleks ES menjadi enzim dan hasil reaksi (Poedjiadi dan Supriyanti, 2007).

Klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut :

1. Menurut Wirahadikusumah (2001), berdasarkan fungsinya enzim dapat dibedakan menjadi enam kelas dan tiap kelas mempunyai beberapa subkelas. Dalam tiap subkelas, nama resmi dan nomor klasifikasi dari tiap enzim melukiskan reaksi yang dikatalisis berdasarkan IUPAC yaitu:
 - a. Oksidoreduktase, mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi. Contoh : NAD-oksido reduktase (CEIUB); Alkohol dehidrogenase (Trivial).

- b. Transferase, mengkatalisis perpindahan gugus molekul dari suatu molekul molekul yang lain, seperti gugus amino, karbonil, metal, asil, glikosil atau fosforil. Contoh: Glukosa-6-transferase (CEIUB); Glukokinase (trivial).
 - c. Hidrolase, berperan dalam reaksi hidrolisis. Contoh: α -1-4-glukan 4-glukanohidrolase (CEIUB); α -amilase (trivial).
 - d. Liase, mengkatalisis reaksi adisi atau pemecahan ikatan rangkap dua. Contoh: 2-Asam oksalokarboksi-liase (CEIUB); piruvat dekarboksilase (trivial).
 - e. Isomerase, mengkatalisis reaksi isomerisasi. Contoh: Alaninrasemase (CEIUB); alanin rasemase (trivial).
 - f. Ligase, mengkatalisis pembentukan ikatan dengan bantuan pemecahan ikatan dalam ATP. Contoh: Karbon dioksida ligase (CEIUB); piruvat karboksilase (trivial).
2. Menurut Lehninger (2005), klasifikasi enzim berdasarkan cara terbentuknya dibedakan menjadi dua, yaitu:
- a. Enzim konstitutif, yaitu enzim yang jumlahnya dipengaruhi kadar substratnya, misalnya enzim amilase.
 - b. Enzim adaptif, yaitu enzim yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat, contohnya enzim β -galaktosidase yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung laktosa.

Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim

1. Konsentrasi Enzim

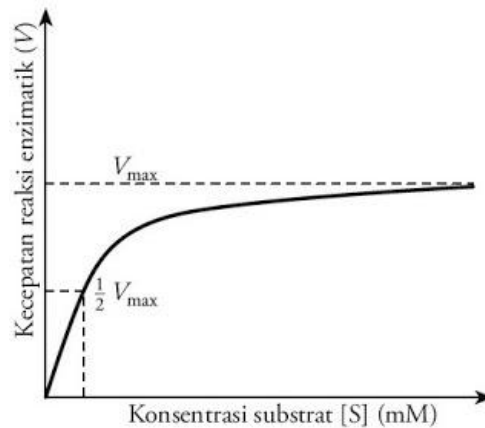
Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim (Page,1997).

2. Konsentrasi substrat

Pada konsentrasi yang tetap, penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Namun, pada batas konsentrasi tertentu substrat diperbesar. Keadaan ini telah diterangkan oleh Michaelis-Menten dengan hipotesis mereka tentang terjadinya kompleks enzim-substrat (Poedjiadi dan Supriyanti, 2007). Hubungan konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi enzimatik dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi enzimatik (Khaerina, 2012).

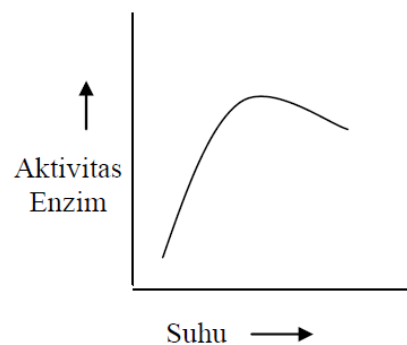
Pada konsentrasi substrat rendah, bagian aktif enzim ini hanya menampung substrat sedikit. Bila konsentrasi substrat diperbesar, semakin banyak substrat yang dapat berhubungan dengan enzim pada bagian aktif tersebut. Maka konsentrasi kompleks enzim substrat makin besar dan hal ini menyebabkan makin besarnya kecepatan reaksi. Pada batas konsentrasi tertentu, semua bagian aktif telah dipenuhi oleh substrat atau telah jenuh dengan substrat sehingga dapat disimpulkan bahwa bertambahnya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambahnya konsentrasi kompleks enzim substrat sehingga jumlah reaksi pun tidak bertambah besar.

3. Suhu

Suhu merupakan salah satu penyebab utama ketidakaktifan (inaktivasi) enzim didalam bioreaktor. Inaktivasi enzim akibat panas ini disebabkan oleh keseragaman molekul protein. Apabila enzim berikatan secara kovalen dengan

suatu zat padat pendukung, maka molekul protein menjadi lebih kaku dan kurang mampu membenteng sehingga terjadi inaktivasi.

Pada suhu rendah, reaksi kimia berlangsung lambat, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Enzim merupakan suatu protein, maka kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Apabila terjadi proses denaturasi, maka bagian aktif enzim akan terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya akan menurun (Poedjiadi dan Supriyanti, 2007). Hubungan aktivitas enzim dengan suhu dapat dilihat pada Gambar 5.

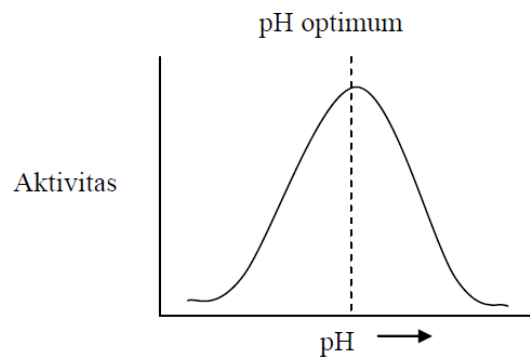


Gambar 5. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu (Poedjiadi dan Supriatin,2007).

Kenaikkan suhu sebelum terjadinya denaturasi dapat menaikkan kecepatan reaksi. Oleh karena ada pengaruh yang berlawanan, maka akan terjadi suatu titik optimum yaitu suhu yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim tertentu.

4. Pengaruh pH

Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif atau ion bermuatan ganda (zwitter ion). Perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Proses denaturasi enzim terjadi pada pH rendah atau pH tinggi yang menyebabkan menurunnya aktivitas enzim (Poedjiadi dan Supriyanti, 2007). Hubungan kecepatan reaksi dengan pH dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Page,1997).

Enzim yang aktif pada batas pH tertentu serta plot aktivitas terhadap pH selalu memberikan bentuk kurva menyerupai lonceng. Nilai pH pada aktivitas maksimum dikenal sebagai pH optimum yang khas untuk enzim dan nilai pH ini stabil selama masa percobaan berlangsung (Bintang, 2010).

5. Pengaruh Inhibitor

Hambatan atau inhibisi pada suatu reaksi yang menggunakan enzim sebagai katalis dapat terjadi apabila penggabungan substrat pada bagian aktif enzim mengalami hambatan. Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut dinamakan inhibitor. Hambatan yang dilakukan oleh inhibitor dapat berupa hambatan tidak reversibel atau hambatan reversibel. Hambatan tidak reversibel pada umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih yang terdapat pada molekul enzim. Hambatan reversibel dapat berupa hambatan bersaing atau hambatan tidak bersaing (Poedjiadi dan Supriyanti, 2007). Inhibitor irreversibel seperti organofosfor, senyawa Hg, sianida, CO, dan HS akan bereaksi membentuk ikatan kovalen pada gugus fungsi seperti OH, SH, atau dengan logam pada gugus prostetik dalam sisi aktif enzim, sehingga menghambat laju reaksi secara tetap namun tergantung pada jumlah inhibitor. Pengaruh inhibitor reversibel tidak dapat dilepaskan secara fisik seperti dialisis (Bintang, 2010).

Hambatan bersaing disebabkan karena ada molekul yang mirip dengan substrat, yang dapat pula membentuk kompleks enzim inhibitor (EI).

Pembentukan kompleks EI sama dengan pembentukan kompleks ES yaitu melalui penggabungan inhibitor dengan enzim pada bagian aktif enzim.

Pengaruh inhibitor bersaing tidak tergantung pada konsentrasi inhibitor saja, tetapi juga pada konsentrasi substrat. Pengaruh inhibitor dapat dihilangkan dengan cara menambah substrat dalam konsentrasi besar. Pada konsentrasi

substrat yang sangat besar, peluang terbentuknya kompleks ES juga makin besar.

Hambatan tidak bersaing tidak dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi substrat dan inhibitor yang melakukannya disebut inhibitor tidak bersaing. Dalam hal ini, inhibitor dapat bergabung dengan enzim pada suatu bagian enzim di luar bagian aktif enzim. Penggabungan inhibitor dengan enzim bebas menghasilkan kompleks EI, sedangkan penggabungan dengan kompleks ES menghasilkan kompleks ESI. Keduanya bersifat inaktif yang tidak dapat menghasilkan hasil reaksi yang diharapkan (Poedjiadi dan Supriyanti, 2007).

Pada produksi enzim, pertumbuhan mikroorganisme harus dilakukan pada kondisi tertentu sehingga produksi enzim akan maksimal. Enzim ekstraseluler mempunyai keuntungan yang lebih besar daripada enzim intraseluler, karena produksinya tidak memerlukan teknik penghancuran sel yang mahal. Selain itu, enzim ekstraseluler berada pada bentuk yang relatif murni dalam biakan cair, sedangkan enzim intraseluler memerlukan cara pemisahan dan pemurnian yang lebih rumit. Pada produksi enzim, mikroorganisme yang digunakan harus stabil dan mampu tumbuh dengan baik pada substrat yang murah, tidak menghasilkan zat yang beracun, dan bebas dari aktivitas antibiotika (Smith, 1990).

Pada umumnya, enzim ekstraseluler diproduksi dalam proses diskontinu yang membutuhkan waktu 30 sampai 50 jam. Waktu optimum untuk menghentikan proses fermentasi terdapat di antara titik produktivitas maksimum dan titik berlangsungnya aktivitas maksimum (Smith, 1990).

Teori interaksi tiga-sisi (*three-point interaction*) yaitu daerah penempelan substrat, daerah katalitik, dan sisi lain yang memungkinkan interaksi dengan komponen lain di dalam sel. Setiap substrat menempel dengan enzim pada sisi tertentu untuk membentuk substrat enzim kompleks. Gugus aktif ditempatkan berdekatan satu sama lain dan juga berdekatan dengan sisi katalitik. Letak daerah penempelan substrat dengan sisi katalitik dari suatu struktur tiga dimensi enzim umumnya berdekatan dan biasa disebut sebagai sisi aktif (Gozan, 2014).

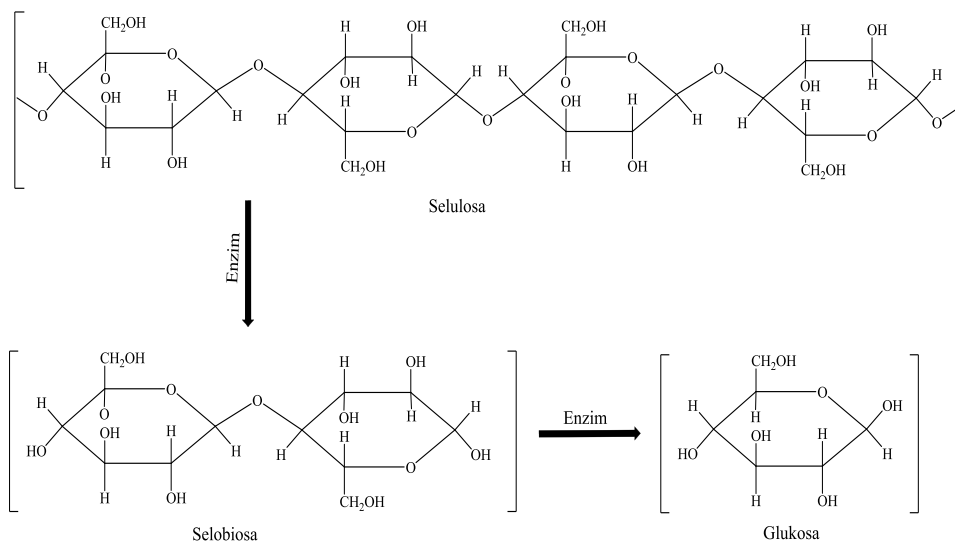
Menurut hipotesis *lock and key* Fisher, sisi aktif mempunyai sifat struktural yang kokoh dan struktur enzim tidak berubah selama proses pengikatan berlangsung. Koshland dalam hipotesis "*Induced fit*" mengemukakan bahwa sisi aktif enzim menyesuaikan diri dengan substrat selama pembentukan kompleks enzim-substrat (Gozan, 2014).

E. Enzim Selulase

Selulase adalah enzim kompleks yang memecah selulosa terutama menjadi glukosa. Selulase terutama diproduksi oleh bakteri simbiotik dalam lambang hewan memamah biak pada golongan herbivora. Selulase dapat dihasilkan dari mikroorganisme di antaranya yaitu *Trichoderma harzianum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. pilulifemm*, dan *T. aureoviride*. Mikroorganisme lainnya yang dapat memproduksi enzim selulase adalah *Aspergillus terreus*. Tiga jenis enzim selulase yang membentuk enzim selulase kompleks adalah sebagai berikut:

1. Endoselulase, yaitu enzim yang memecah ikatan internal untuk memutuskan struktur kristalin pada selulosa dan membuka rantai polisakarida.
2. Eksoselulase, yaitu enzim yang membelah 2-4 unit dari akhir rantai yang diproduksi oleh endoselulase menghasilkan tetrasakarida atau disakarida.
3. Selobiosa atau beta-glukosidase, yaitu enzim yang menghidrolisis produk eksoselulase menjadi monosakarida.

Enzim selulase biasanya merupakan campuran dari beberapa enzim, sedikitnya ada tiga kelompok enzim yang terlibat dalam proses hidrolisis selulosa, yaitu endoglukanase (endo- β -1,4 glukukanase) yang bekerja pada wilayah serat selulosa yang mempunyai kristalinitas rendah untuk memecah selulosa secara acak dan membentuk ujung rantai yang bebas, eksoglukanase (ekso- β -1,4 glukukanase) atau selobiohidrolase yang mendegradasi lebih lanjut molekul tersebut dengan memindahkan unit-unit selobiosa dari ujung-ujung rantai yang bebas, dan β -1,4 glukosidase atau selobiase yang menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Gozan, 2014). Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase (Ejiyurshal, 2017).

F. *Aspergillus niger*

Kapang *Aspergillus niger* adalah mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim selulase. *Aspergillus niger* mempunyai miselium bersekat-sekat. Pembrokanya secara vegetatif dengan konidia, sedangkan secara generatif dengan spora yang terbentuk di dalam askus. *Aspergillus niger* memiliki sifat sporofit, dalam bentuk koloni menghasilkan warna coklat-kekuningan, kehijau-hijauan dan kehitam-hitaman. *Aspergillus niger* dapat berfungsi untuk menyederhanakan amilum (Dwidjoseputro, 1990).

Aspergillus niger mempunyai ukuran diameter 4-5 cm dan terdiri dari suatu lapisan basal yang kompak berwarna putih hingga kuning dan suatu lapisan konidiofor yang lebat yang berwarna coklat tua hingga hitam. Kepala konidiofor berwarna hitam dan berbentuk bulat, vesikula bulat hingga semi bulat dan

berdiameter 50-100 μm , konidia berbentuk bulat hingga semi bulat, berukuran 3,5-4,5 μm . *Aspergillus niger* umumnya memiliki spora berwarna coklat dan memiliki ornamentasi berupa tonjolan dan duri-duri yang tidak beraturan. Habitat spesies ini kosmopolit di daerah tropis dan subtropis dan mudah diisolasi dari tanah, udara, air dan lain sebagainya (Gandjar, 1999).

Pada tahap isolasi jamur, teknik goresan tidak efektif untuk jamur benang dan juga tidak dianjurkan. Isolasi tergantung pada pengambilan sejumlah kecil sampel hifa atau spora, dianggap murni oleh mata, lensa pembesar, atau stereomikroskop, dan sampel diletakkan pada media agar sebagai inokulum titik. Kemurnian dinampakkan oleh keseragaman koloni yang terbentuk setelah inkubasi. Tempat paling sederhana untuk memulai isolasi jamur adalah media perhitungan dengan sebaran koloni yang baik. Saat isolasi menggunakan jarum preparat, disterilkan dengan pemanasan, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri hingga dingin baru kemudian digunakan untuk mengambil spora atau miselium dan inokulasi. Jika kultur murni telah didapat, inokulasi ke dalam medium yang sesuai, dan diinkubasi sampai siap diidentifikasi. Jamur selalu diinokulasikan pada satu titik di tengah-tengah agar miring. Hal ini dilakukan untuk memperoleh perkembangan koloni dan sporulasi yang baik.

Pada penyimpanan dalam waktu pendek umumnya jamur disimpan pada agar miring yang secara tradisional ditutup kapas dan secara modern dilakukan dengan menggunakan tabung dengan penutupnya yang dapat tetap kering selama penyimpanan. Selama inkubasi, demi pertumbuhan jamur, tutup harus

dikendorkan karena jamur membutuhkan oksigen untuk pertumbuhan dan sporulasinya (Hidayat dkk., 2006).

G. Isolasi dan 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. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan ekstraksi enzim intraseluler, karena tidak memerlukan pemecahan sel dan enzim yang dikeluarkan dari sel mudah dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar dan Chan, 1986). Pemurnian enzim adalah salah satu cara untuk memisahkan protein enzim dari protein jenis lain dan kontaminan. Menurut Judoamidjojo dkk. (1990) proses pengisolasian dan pemurnian enzim berlangsung beberapa tahapan sebagai berikut:

1. Sentrifugasi

Proses ini bertujuan untuk memisahkan enzim dari sisa-sisa dinding sel, molekul yang memiliki berat molekul tinggi dapat mengendap di dasar tabung dengan cepat bila disentrifugasi dengan kecepatan tinggi. Kecepatan pengendapan molekul bergantung pada beberapa faktor, yaitu berat molekul, bentuk molekul dan viskositas larutan. Proses ini akan menimbulkan panas, sehingga dapat mendenaturasi enzim. Denaturasi enzim dapat diminimalisir dengan cara sentrifugasi pada suhu 2-4 °C (sentrifugasi dingin). Sel-sel mikroba biasanya

mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Scopes, 1982; Walsh & Headon, 1994; Wulandari, 2016).

2. Fraksinasi

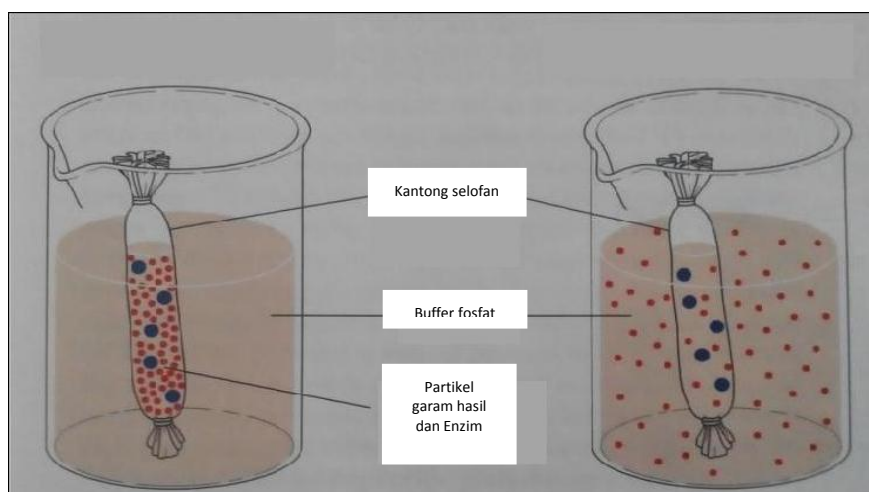
Cara pemurnian enzim yang umum dilakukan adalah dengan proses pengendapan bertahap atau biasa disebut sebagai fraksinasi. Fraksinasi yang sering dilakukan adalah dengan senyawa elektrolit menggunakan garam ammonium sulfat, natrium klorida atau natrium sulfat. Menurut Wirahadikusumah (2001), meningkatnya kekuatan ion akan menyebabkan kelarutan enzim semakin besar yang disebut dengan *salting in*. Kandungan ion yang semakin tinggi akan menyebabkan kelarutan enzim menurun dan mengendap disebut dengan *salting out*.

Ammonium sulfat sering dipakai untuk mengendapkan enzim karena kelebihanannya, yaitu kebanyakan enzim tahan terhadap garam tersebut (tidak terdenaturasi), memiliki kelarutan yang besar, mempunyai daya pengendapan yang cukup besar dan mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim. Perlakuan penambahan ammonium sulfat dilakukan dengan meningkatkan kejenuhan dari larutan enzim, dengan pembagian fraksi : (0-20)% jenuh, (20-40)% jenuh, (60-80)% jenuh, dan (80- 100)% jenuh. Pengendapan ini dikenal sebagai *salting out* (Judoamidjojo dkk., 1990).

3. Dialisis

Metode dialisis digunakan untuk memisahkan molekul-molekul yang besar dari molekul-molekul yang kecil. Suatu membran yang semipermeabel membiarkan molekul-molekul kecil melaluinya, tetapi mencegah molekul-molekul besar

melalui membran tersebut. Pada suatu percobaan, campuran dari molekul-molekul yang besar dan kecil ditempatkan dalam kantung dialisis yang dicelupkan ke dalam pelarut berair dalam jumlah lebih banyak. Molekul-molekul yang berukuran kecil akan keluar melalui membran semipermeabel ke dalam pelarut atau buffer, sampai tercapai kesetimbangan antara cairan di dalam dan di luar kantung. Campuran dari molekul ini dapat dibebaskan dari molekul kecil dengan melakukan dialisis terhadap air yang mengalir, atau dengan berulang kali mengganti pelarutnya. Cara kerja proses dialisis ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Dialisis (Voet *and* Voet, 2004)

Pada proses dialisis, larutan enzim dimasukkan ke dalam kantung dialisis yang terbuat dari membran *semipermeable* (selofan). Jika kantung yang berisi larutan enzim dimasukkan ke dalam larutan buffer, maka molekul protein kecil yang ada di dalam larutan protein atau enzim seperti garam anorganik akan keluar melewati pori-pori membran, sedangkan molekul enzim yang berukuran besar tetap tertahan

dalam kantung dialisis. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantung dialisis tidak seimbang. Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan buffer dengan konsentrasi rendah di luar kantung dialisis (Lehninger, 2005). Setelah tercapai keseimbangan, larutan di luar kantung dialisis dapat dikurangi. Proses ini dapat dilakukan secara kontinu sampai ion-ion didalam kantung dialisis dapat diabaikan (Boyer, 1993).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan dialisis adalah sebagai berikut:

1. Membran

Selofan merupakan bahan yang umum digunakan sebagai membran dalam proses dialisis. Selofan ini berupa tabung yang dibuat oleh *Visking Division* dari *Union Carbide*. Membran selofan mengandung sejumlah kecil senyawa-senyawa sulfur, ion logam, dan beberapa enzim. Oleh karena itu, dianjurkan agar selofan dididihkan selama 30 menit dalam alkali EDTA (Na_2CO_3 10 g/L, EDTA 1 mmol/L) untuk mencegah hilangnya aktivitas molekul-molekul yang didialisis. Setelah didinginkan, tabung-tabung tersebut dicuci dengan akuades, kemudian salah satu ujungnya diikat dengan benang rami. Tabung yang berbentuk kantung diisi dengan bahan yang akan didialisis, dan ujung yang satunya lagi diikat. Dialisis paling baik dilakukan dengan tabung yang baru saja disiapkan, karena bila sudah basah kantung akan peka terhadap serangan mikroorganisme. Jika harus disimpan, maka kantung selofan harus disimpan dalam larutan yang telah ditambahkan sedikit asam benzoat sebagai pengawet (Bintang, 2010).

2. Pelarut

Pada umumnya, kecepatan dialisis akan maksimal jika menggunakan pelarut aquades, meskipun kecepatan dialisis suatu larutan ditentukan oleh pH dan kekuatan ionisasi zat terlarut yang diperlukan untuk menstabilkan molekul-molekul yang didialisis. Selama dialisis terjadi, proses osmosis menyebabkan masuknya air ke dalam kantung dialisis, sehingga kantung dialisis selalu terisi penuh sebelumnya untuk menghindari terjadinya pengenceran yang berlebih dari molekul-molekul yang ada di kantung dialisis (Bintang, 2010).

3. Sifat-sifat fisik

Kecepatan dialisis juga tergantung pada suhu, sehingga semakin tinggi suhu di sekitarnya, maka semakin tinggi pula kecepatan dialisisnya. Jika suhu ditingkatkan, maka viskositas dari pelarut berkurang, sehingga kecepatan dialisis meningkat. Sebaliknya, banyak makromolekul yang sensitif terhadap suhu, sehingga jika dialisis protein dilakukan pada suhu rendah (dalam kondisi dingin). Pemisahan antara molekul-molekul yang besar dan kecil dapat pula dipengaruhi oleh tekanan atau perubahan yang terjadi pada membran (Bintang, 2010).

4. Keseimbangan membran Donnan

Bila suatu larutan makromolekul seperti protein dipisahkan dari suatu larutan garam dengan membran semipermeabel, maka protein yang bermuatan listrik tidak dapat menembus membran tersebut, akan tetapi ion-ionnya dengan muatan berlawanan cenderung dapat menembus membran. Hal ini

mengakibatkan distribusi yang tidak merata dari ion-ion dan akan terjadi suatu perbedaan potensial listrik melalui membran (Bintang, 2010).

H. Amobilisasi Enzim

Amobilisasi adalah proses pengendalian pergerakan dan pertumbuhan secara total atau sebagian pada enzim, sel, atau organel. Metode amobilisasi yang ideal harus mudah pengerjaan dan tidak merusak substansi yang mengalami amobilisasi. Faktor-faktor seperti suhu, perubahan pH, dan bahan penyangga selama proses berlangsung harus ditetapkan kondisi optimumnya. Bahan penyangga bersifat inert dan teraktivasi (Bintang, 2010).

Enzim yang telah di isolasi belum cukup stabil pada saat pengoperasiannya. Enzim sebagai molekul bebas yang larut dalam air sulit untuk dipisahkan dari substrat dan produk, selain itu enzim sulit digunakan secara berulang-ulang. Oleh karena itu, untuk mengatasi kekurangan enzim tersebut dilakukan proses imobilisasi enzim. Amobilisasi biasanya dapat dianggap sebagai perubahan enzim dari yang larut dalam air, keadaan 'bergerak' menjadi keadaan 'tidak bergerak' tidak larut dalam air. Amobilisasi mencegah difusi enzim ke dalam campuran reaksi dan mempermudah memperoleh kembali enzim tersebut dari aliran produk dengan teknik pemisahan padat/cair yang sederhana. Produk hasil reaksi terlepas dari enzim sehingga enzim tersebut memungkinkan untuk dapat dipakai kembali. Enzim tak gerak dapat digunakan secara menguntungkan dalam bioreaktor yang dioperasikan secara kontinu (Smith, 1990).

Pada prakteknya, amobilisasi enzim dapat dicapai dengan mengikat enzim secara kovalen ke permukaan bahan yang tak larut dalam air, pengikatan-silang dengan bahan yang cocok untuk menghasilkan partikel yang larut, penjebakan di dalam suatu matrik atau gel yang permeabel terhadap enzim, substrat dan produk, dengan enkapsulasi, dan dengan adsorpsi pada zat pendukung (Smith, 1990).

Ada beberapa metode dialisis yang dapat digunakan dalam proses dialisis, diantaranya yaitu:

1. Pengikatan enzim secara kovalen pada zat padat pendukung

Metode yang digunakan untuk mencapai terjadinya pengikatan didasarkan pada ikatan peptida dan protein. Pembentukan ikatan kovalen memiliki keuntungan karena ikatan tersebut tidak akan putus akibat adanya pengaruh pH, kekuatan ion atau substrat. Namun ada kemungkinan enzim menjadi tidak aktif sebagian atau seluruhnya terjadi reaksi kimia selama pembentukan ikatan kovalen tersebut.

Terdapat banyak metode pengikatan secara kovalen dan prosedur amobilisasi, yang paling sedikit terdiri dari dua tahap yaitu aktivasi zat pendukung dan pengikatan enzim (Bintang, 2010). Zat pendukung yang biasa digunakan untuk mengikat enzim secara kovalen adalah diazonium, asam azida, isosianat, dan halide.

2. Penjebakan enzim dalam gel

Prinsip metode penjebakan adalah inklusi sel atau enzim di dalam jaringan rigid yang berfungsi untuk mencegah sel atau enzim berdifusi keluar medium namun substrat masih tetap masuk ke dalam butiran gel (Bintang, 2010). Metode ini

sangat lunak dan tidak mungkin merusak aktivitas enzim. Enzim dapat ditambahkan ke dalam larutan monomer sebelum pembentukan gel. Pembentukan gel akan terjadi baik dengan perubahan suhu atau dengan penambahan suatu zat kimia menginduksi gel. Enzim tersebut tetap berada dalam bentuk aslinya tanpa risiko adanya penutupan bagian yang aktif pada gugus atau molekul enzim oleh ikatan kimia. Namun, kelemahan utama dari bentuk amobilisasi ini adalah hilangnya enzim terus-menerus melalui pori dan penghambatan reaksi enzimatik oleh pengaturan difusi dari pemindahan substrat dan produk. Bahan penjebak enzim termasuk silika gel, karet silikon, pati, dan poliakrilamida (Smith, 1990).

3. Enkapsulasi enzim

Membran yang digunakan tidak permeabel terhadap enzim dan makromolekul yang lain, tetapi permeabel terhadap substrat dan produk yang mempunyai berat molekul tinggi. Jenis bahan yang digunakan termasuk kolodion, derivat selulosa, polistiren, dan nilon. Berbagai bahan ini dapat digunakan untuk membentuk membran yang tipis, berbentuk lingkaran semipermeabel yang membentuk mikrokapsul dengan inklusi enzim (Smith, 1990).

4. Adsorpsi enzim pada permukaan zat padat

Kondisi adsorpsi tidak melibatkan spesies yang reaktif dan tidak ada modifikasi enzim. Adsorban yang paling umum digunakan termasuk berbagai bahan organik dan anorganik seperti alumina, selulosa, tanah liat, kaca, hidroksilapatit, karbon, dan berbagai macam bahan silika. Pengikatan terhadap enzim bersifat reversibel, sehingga enzim yang teradsorpsi mungkin mengalami desorpsi dengan adanya substrat atau menaikkan kekuatan ion (Smith, 1990).

5. Pengikatan silang dengan bahan bergugus ganda

Bila reaksi dilakukan tanpa adanya zat padat pendukung, metode ini mengakibatkan pembentukan jaringan molekul enzim tiga dimensi. Pada prakteknya, enzim umumnya mengalami pengikatan silang (*crosslink*) setelah adsorpsi pada zat pembawa yang sesuai. Senyawa yang paling umum digunakan dalam metode ini adalah diamin alifatik, dimetil adipimat, dimetil suberimidat, dan glutaraldehida (Smith, 1990).

Amobilisasi dari suatu enzim dapat menghasilkan perubahan yang berarti pada sifatnya. Perubahan ini dapat dicirikan pada:

1. Perubahan kimia dan/atau keseragaman dalam struktur enzim.
2. Sifat heterogen katalisis oleh amobilisasi enzim.
3. Sifat fisik dan kimia dari zat pembawa yang digunakan (Smith, 1990).

Keuntungan teknik amobilisasi adalah lebih mudah dalam memisahkan produk yang dihasilkan, sistem yang lebih stabil, penggunaan kembali biokatalis dengan bentuk amobilisasi mempunyai waktu paruh lebih panjang dan rata-rata kerusakannya dapat diprediksi (Bintang, 2010).

I. Penentuan Aktivitas Selulase dengan Metode Mandels

Pengujian aktivitas selulase dilakukan dengan metode Mandels, yaitu berdasarkan pembentukan glukosa dari substrat *Carboxymethyl Cellulase* (CMC) oleh enzim selulase yang dideteksi dengan penambahan pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*) ke dalam larutan uji serta proses pemanasan, sehingga akan dihasilkan larutan berwarna kuning hingga merah pekat. Semakin pekat warna larutan sampel dibandingkan larutan kontrol, maka semakin tinggi aktivitasnya (Mandels *et al.*, 1976).

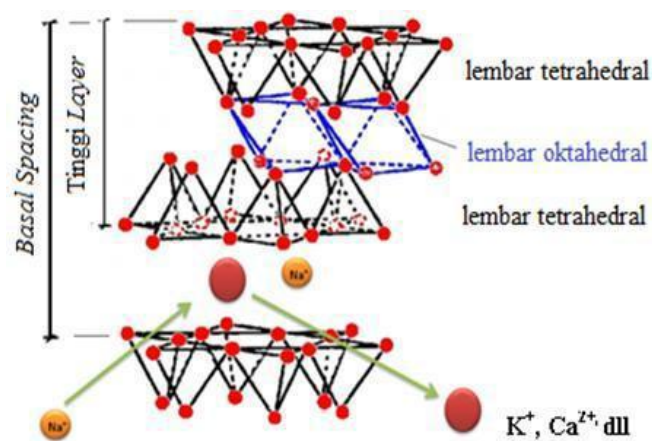
J. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Kandungan protein di dalam enzim sangat berpengaruh terhadap daya katalitik enzim tersebut. Pada umumnya dengan meningkatnya kadar protein dalam suatu enzim, maka daya katalitiknya akan meningkat. Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada setiap fraksi pemurnian (tidak hilang dalam proses pemurnian) dengan aktivitas yang baik. Metode ini bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) akan membentuk kompleks dengan protein. Ketika reagen *folin-ciocelteau* ditambahkan, maka reagen akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen *folin* menjadi heteromolibdenum dan mengubah warna kuning menjadi biru. Metode ini relatif sederhana dan dapat diandalkan serta biayanya relatif murah. Namun, kekurangan dari metode ini adalah sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Oleh karena itu, untuk

mengatasi hal tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan volume sampel dalam jumlah kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).

K. Bentonit

Salah satu bahan alam yang dapat digunakan pada pengelolaan limbah adalah bentonit. Bentonit banyak dimanfaatkan dalam beberapa bidang industri, misalnya industri sabun, zat pengisi aspal, farmasi, pengisi resin, semen dan kecantikan (Zulkarnain, 1991). Bentonit adalah *clay* (tanah liat) yang sebagian besar terdiri dari montmorillonit dengan mineral-mineral seperti kwarsa, kalsit, dolomit, feldspars dan mineral lainnya. Montmorillonit merupakan bagian dari kelompok *smectit* dengan komposisi kimia secara umum $(Mg,Ca)O \cdot Al_2O_3 \cdot 5SiO_2 \cdot nH_2O$ (Puslitbang, 2005). Struktur bentonit dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Struktur Bentonit (Ohtsuka,1997).

Adanya atom-atom yang terikat pada masing-masing lapisan struktur montmorillonite memungkinkan air atau molekul lain masuk di antara unit lapisan. Akibatnya kisi akan membesar pada arah vertikal. Selain itu, adanya pergantian atom Si oleh Al menyebabkan terjadinya penyebaran muatan negatif pada permukaan bentonit. Bagian inilah yang disebut sisi aktif (*active site*) dari bentonit dimana bagian ini dapat menyerap kation dari senyawa-senyawa organik atau dari ion-ion senyawa logam (Puslitbang, 2005).

Pada saat kondisi kering bentonit mempunyai sifat fisik berupa partikel butiran yang halus, kilap lilin, lunak, plastis, berwarna kuning muda hingga abu-abu, bila diraba terasa licin, dan bila dimasukkan ke dalam air akan menyerap air. Massa jenis bentonit 2,2 – 2,8 g/L, indeks bias 1,547 – 1,557, dan titik lebur 1330–1430 °C. Komposisi standar bentonit, yaitu 55,40% SiO₂; 20,10% Al₂O₃; 3,7% Fe₂O₃; 0,49% CaO; 2,49% MgO; 2,76% Na₂O₃; 0,60% K₂O, 13,5 % habis terbakar (Puslitbang, 2005).

Pemilihan bentonit sebagai bahan pendukung amobilisasi enzim didasarkan beberapa pertimbangan dasar, yaitu tidak larut dalam air, memiliki daya tukar ion yang besar, pH berkisar 4-7 (pH asam) sesuai pH optimum enzim selulase, mengandung kation bivalen (Ca²⁺) yang dapat menstabilkan enzim, murah, 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, stabil (*inert*), dan non-toksik (Sedaghat *et al.*, 2009).

Sebelum digunakan dalam berbagai aplikasi, bentonit harus diaktifkan dan diolah terlebih dahulu. Aktivasi bentonit, tidak mengubah susunan kimia, melainkan susunan fisiknya (daya serap, luas permukaan, kapasitas pertukaran kation, dan sifat plastis). Ada tiga cara yang dapat dilakukan untuk aktivasi bentonit, yaitu :

1. Secara pemanasan

Pada proses ini, bentonit dipanaskan pada temperatur 300-350 °C untuk memperluas permukaan butiran bentonit.

2. Aktivasi dengan asam

Aktivasi asam dilakukan dengan mereaksikan asam dengan bentonit sehingga terjadipertukaran antara mineral kation (Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) dengan ion H^+ . Secara bersamaan, asam juga mengekstrak alumina dari struktur bentonit sehingga meningkatkan luas permukaan internal bentonit. Tergantung dari tingkat aktivasinya, luas permukaan dapat meningkat hingga 4–5 kali lipat. Bentonit yang terdapat di alam secara umum memiliki luas permukaan berkisar antara 50–70 m^2/g , sedangkan bentonit hasil aktivasi asam dapat memiliki luas permukaan 120–320 m^2/g tergantung dari tingkat aktivasinya. Adanya peningkatnya luas permukaan pada bentonit menyebabkan kapasitas adsorpsi bertambah, sehingga bentonit jenis ini dapat digunakan sebagai bahan pengadsorpsi (adsorben) (Supeno, 2007).

3. Aktivasi dengan basa

Aktivasi basa dilakukan dengan cara menambahkan garam natrium. Pada proses ini terjadi penggantian ion antara ion kalsium dengan ion natrium, sehingga menghasilkan bentonit teraktivasi yang memiliki karakteristik seperti natural natrium bentonit, yaitu sifat koloidal di dalam air, kemampuan mengembang, dan sifat pengikat air. Pada proses aktivasi basa, luas permukaan bentonit tidak bertambah sehingga tidak dapat digunakan sebagai adsorben (Supeno, 2007).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai Agustus 2018 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.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, jarum ose, mikropipet *Eppendroff*, neraca analitik, lemari pendingin, pembakar spirtus, sentrifuga, *magnetik stirer*, *autoclave* model S-90N, oven, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, *waterbatch shaker incubator* HAAKE, *freeze dryer*, pH meter, penangas air, *waterbath incubator*, ayakan 100 mesh dan spektrofotometer *UV-VIS* Cary Win UV 32.

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , urea, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 ,

pepton, NaOH, glukosa, *Carboxymethyl Cellulose* (CMC), akuades, Na(K)-Tartarat, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , *reagen folin-ciocalteu*, pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*), fenol, Na_2SO_3 , HCl, Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, *Bovine Serum Albumin* (BSA), akuades, kantong selofan, tongkol jagung, dan bentonit. Adapun mikroorganisme yang digunakan adalah jamur *Aspergillus niger* L-51 penghasil enzim selulase dari Laboratorium Mikrobiologi Institut Teknologi Bandung.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan media inokulum

Media inokulum digunakan sebagai media adaptasi awal pertumbuhan dan media perkembangbiakan spora jamur pada media cair. Media inokulum dibuat dengan cara menimbang bahan-bahan yang terdiri dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,14 g; KH_2PO_4 0,2 g; urea 0,03 g; CaCl_2 0,03 g; MgSO_4 0,03 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0005 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,00014 g; CoCl_2 0,0002 g; pepton 0,075 g; CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) 0,75 g yang dilarutkan dalam *buffer* fosfat 0,2 M pH 5 sebanyak 100 mL dalam labu Erlenmeyer 250 mL dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah dingin, jamur *A. niger* diinokulasikan sebanyak 5 ose ke dalam media inokulum yang telah siap. Selanjutnya media inokulum dikocok dalam *waterbath shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 35°C selama 24 jam (Oktariani, 2017).

2. Pembuatan media fermentasi

Media fermentasi yang digunakan (gL^{-1}) terdiri dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g; KH_2PO_4 2,0 g; urea 0,3 g; CaCl_2 0,3 g; MgSO_4 0,3 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0014 g; CoCl_2 0,002 g; pepton 0,75 g; CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) 7,5 g yang dilarutkan dalam *buffer* fosfat 0,2 M pH 5 sebanyak 1000 mL dalam labu Erlenmeyer 2000 mL dan media fermentasi tersebut disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya dimasukkan larutan media inokulum sebanyak 2% total volume media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptis lalu dikocok dalam *waterbath shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 35°C selama 72 jam. Lalu diuji aktivitas enzim selulase dengan metode Mandels (Oktariani, 2017).

3. Isolasi enzim selulase

Isolasi enzim selulase dilakukan menggunakan metode sentrifugasi. Prinsip sentrifugasi berdasarkan kecepatan sedimentasi dengan cara pemusingan. Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (di bawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono *et al.*, 1992). Pemisahan enzim dari komponen sel lainnya digunakan metode sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim selulase dengan metode *Mandels*.

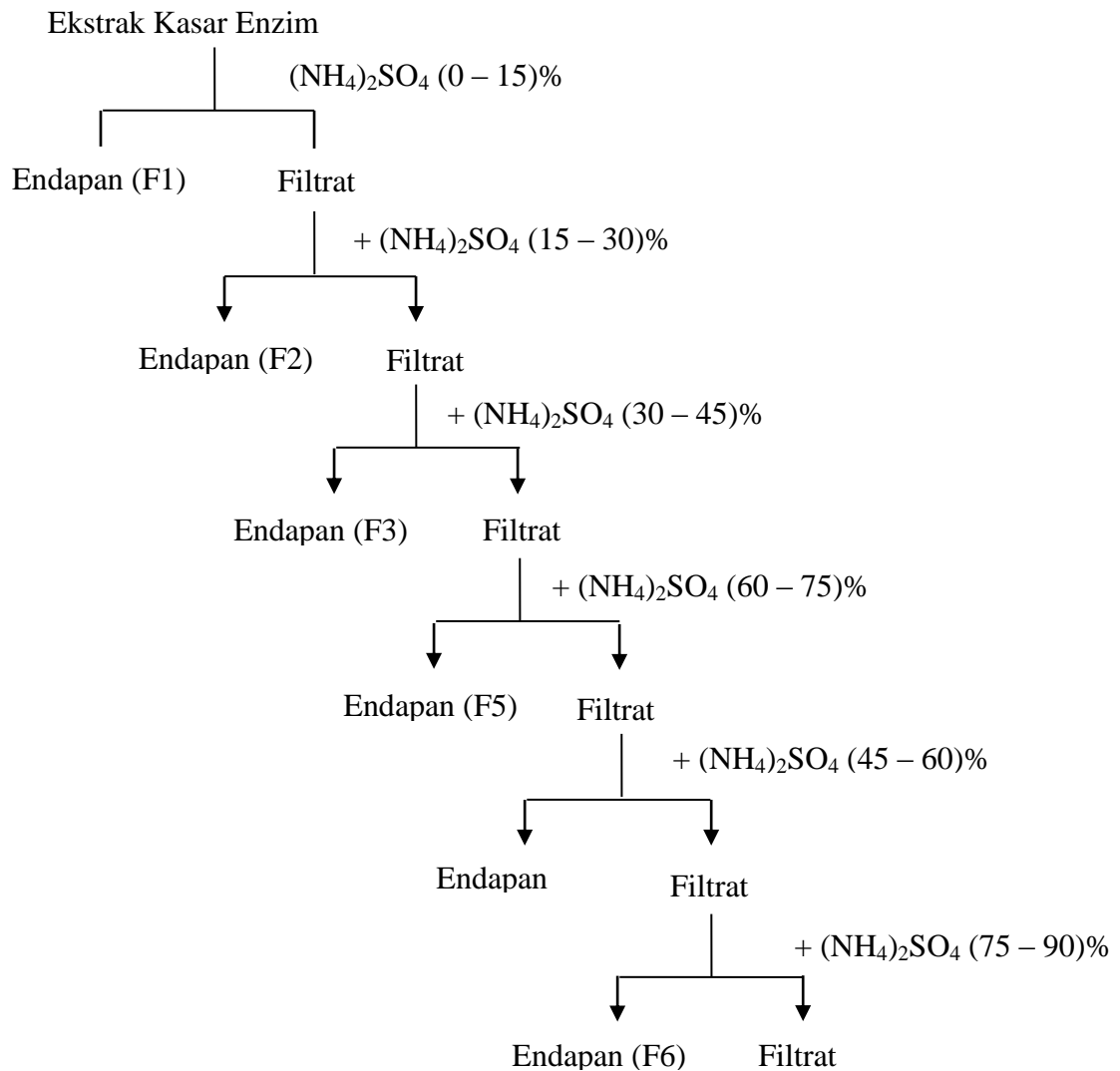
4. Pemurnian enzim selulase

Setelah enzim selulase diisolasi, selanjutnya enzim tersebut dimurnikan menggunakan metode fraksinasi dengan menggunakan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan dialisis.

a. Fraksinasi

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh selanjutnya diendapkan dengan menggunakan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada berbagai konsentrasi yaitu (0-15%); (15-30%); (30-45%); (45-60%); (60-75%); dan (75-90)%. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan ammonium sulfat, dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan atau dicuci dengan *buffer* fosfat 0,1 M pH 5 (Oktariani, 2017). Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 10.

Berikut ini merupakan skema fraksinasi menggunakan ammonium sulfat:



Gambar 10. Skema proses fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat.

b. Dialisis

Endapan enzim dari tiap fraksi hasil fraksinasi kemudian dimurnikan dengan cara dialisis menggunakan membran semipermeabel (kantong selofan).

Endapan tersebut dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis

menggunakan *buffer* fosfat 0,01 M pH 5 selama 24 jam pada suhu dingin (Pohl, 1990). Selama dialisis, dilakukan pergantian *buffer* selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi (Oktariani, 2017).

Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantong, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 pada enzim yang telah didialisis. Bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih. Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Mandels dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

4. Uji aktivitas enzim selulase metode Mandels

- a) Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas enzim selulase metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976)

Ke dalam labu takar 100 mL, dimasukkan 1 g DNS (*Dinitrosalisilic Acid*) yang sebelumnya telah dilarutkan dengan 10 mL akuades, selanjutnya ditambahkan 1 g NaOH lalu dikocok hingga larut, lalu ditambahkan 0,2 g fenol; 0,05 g Na_2SO_3 ; 0,4 g Na(K)-tartarat kemudian dilarutkan dengan 90 mL aquades hingga tanda batas.

- b) Uji aktivitas enzim selulase metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976)

Metode ini didasarkan pada glukosa yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1976). Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan membandingkan antara sampel [0,25 mL enzim ditambah 0,25 mL (larutan CMC 0,5% dalam *buffer* fosfat

pH 5,0] dan kontrol (0,25 mL enzim), yang masing-masing diinkubasi selama 60 menit dalam *waterbath incubator* pada suhu 50 °C. Kemudian kontrol ditambahkan dengan 0,25 mL (larutan CMC 0,5% dalam *buffer* fosfat pH 5,0) dan selanjutnya sampel dan kontrol ditambahkan 1 mL pereaksi DNS dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air. Kemudian masing-masing ditambahkan 1,5 mL akuades lalu didinginkan. Setelah dingin, serapannya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-VIS* pada λ 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

5. Penentuan kadar protein metode Lowry

- a) Pembuatan pereaksi untuk penentuan kadar protein enzim selulase metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951).
1. Pereaksi A : 2 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
 2. Pereaksi B : 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K) tartarat 1% .
 3. Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A.
 4. Pereaksi D : reagen *folin ciocelteau* diencerkan dengan akuades 1:1.
 5. Larutan standar : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

b) Penentuan kadar protein

Penentuan kadar protein ini bertujuan untuk mengukur aktivitas spesifik dari protein enzim selulase. Sebanyak 0,1 mL enzim selulase ditambahkan 0,9 mL akuades lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan diaduk rata. Kemudian dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kontrol, 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades, selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Pada saat menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

6. Amobilisasi enzim selulase menggunakan bentonit

a) Penetapan pH untuk proses pengikatan enzim selulase pada bentonit

Enzim selulase diikatkan pada matriks dengan variasi pH 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 dan 7,5 dengan menggunakan buffer fosfat 0,1 M. Kemudian matriks diisi dengan 0,5 mL enzim dan dielusi dengan buffer yang sesuai, diaduk 5-10 menit. Campuran tersebut dibiarkan hingga matriks mengendap. Selanjutnya supernatan didekantasi dan diuji aktivitas enzim dan kadar proteinnya (Oktariani, 2017).

b) Amobilisasi enzim selulase

0,25 g bentonit dielusi dengan buffer fosfat sebanyak 2 mL. Kemudian campuran diaduk dan disentrifugasi selama 30 menit. Endapan yang

diperoleh ditambahkan dengan 0,5 mL enzim selulase hasil pemurnian. Campuran didiamkan selama 10-15 menit pada suhu dingin. Selanjutnya, campuran disentrifugasi selama 30 menit. Filtrat yang diperoleh diambil sebanyak 0,5 mL sebagai kontrol dan endapannya ditambahkan 0,5 mL CMC 0,5% sebagai sampel. Sampel dan kontrol kemudian diinkubasi pada suhu 50 °C selama 60 menit. Sampel yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi selama 30 menit. Filtrat yang diendapkan diuji dengan metode Mandels (Oktariani, 2017).

c) Pemakaian berulang enzim amobil

Enzim amobil yang telah dipakai (direaksikan dengan substrat), dipakai kembali untuk direaksikan kembali dengan substrat dengan uji metode Mandels. Pemakaian berulang ini dilakukan hingga 5 kali (Oktariani, 2017).

7. Karakterisasi enzim

a) Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum enzim selulase ditentukan dengan memvariasikan suhu, yaitu 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75 dan 80 °C. Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mandels.

b) Penentuan K_M dan V_{maks}

Nilai *Michaelis-Menten* (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim selulase ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat (larutan

CMC) yaitu 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; dan 1,5 %, kemudian dilakukan pengukuran dengan metode *Mandels*, selanjutnya data aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva *Lineweaver-Burk* untuk penentuan K_M dan V_{maks} .

c) Uji stabilitas termal enzim (Yang *et al.*, 1996).

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan variasi waktu inkubasi. Waktu inkubasi dibutuhkan enzim untuk bereaksi dengan substrat secara optimum. Pada penelitian ini, uji stabilitas termal enzim dilakukan dengan variasi waktu inkubasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, dan 90 menit.

Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode *Mandels*.

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

Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim selulase hasil pemurnian dan hasil amobilisasi dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997). Dengan persamaan:

$$\ln (E_i/E_0) = - k_i t \quad (1)$$

Sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan:

$$\Delta G_i = - RT \ln (k_i h/k_B T) \quad (2)$$

Keterangan :

R = konstanta gas (8,315 J K⁻¹ mol⁻¹)

T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

h = konstanta Planck (6,63 x 10⁻³⁴J det)

k_B = konstanta Boltzmann (1,381⁻²³ x 10⁻¹JK)

8. Konversi enzimatik selulosa dari tongkol jagung

1. Delignifikasi (*Pretreatment*) tongkol jagung dengan larutan NaOH

Pretreatment tongkol jagung dengan larutan NaOH ini dimaksudkan untuk meningkatkan kemampuan area permukaan (porositas) selulosa sehingga dapat meningkatkan konversi selulosa menjadi glukosa (gula fermentasi) (Fachty dkk., 2013). Tongkol jagung dipotong menjadi potongan-potongan kecil, lalu dijemur dan dihaluskan. Kemudian diayak sehingga menjadi bubuk halus dengan ukuran 20-40 mesh. Sampel dengan berat 10 g direndam di dalam 100 mL larutan natrium hidroksida 10% (NaOH) pada suhu kamar (28 °C) selama 28 jam. Campuran disaring, dicuci berulang kali dengan menggunakan air suling sampai pH netral untuk menghilangkan sisa dari larutan NaOH. Sisa yang didapat kemudian dikeringkan hingga mencapai berat konstan pada suhu 110 °C (Fitriani dkk., 2013).

2. Hidrolisis Selulosa

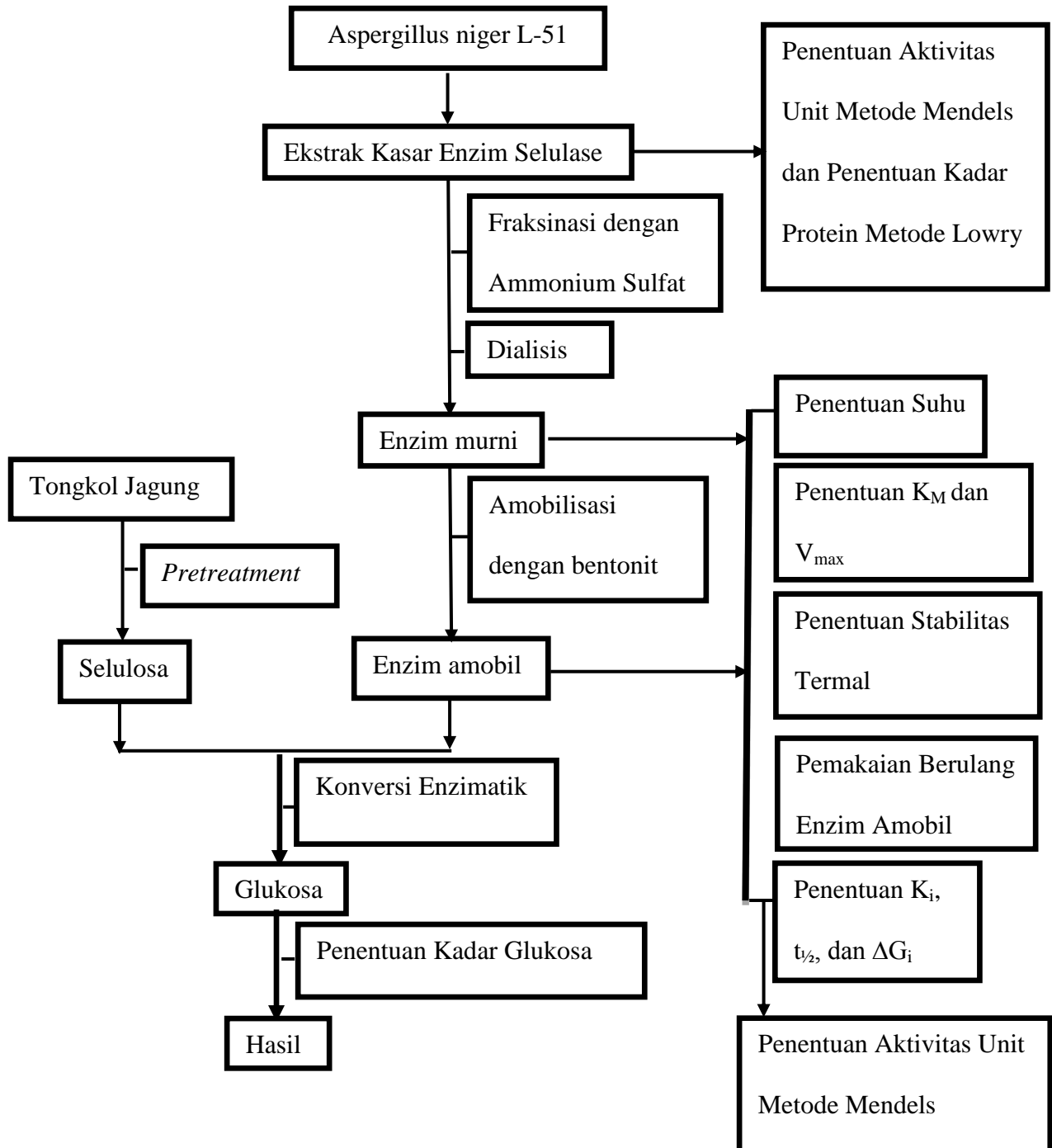
Sampel hasil delignifikasi dilarutkan dalam akuades dengan variasi konsentrasi 3% dan 5%. Sampel ditambahkan enzim amobil dengan perbandingan enzim dan sampel 1:10. Kemudian diinkubasi pada suhu 35 °C selama 12, 24, 36, 48, 60, dan 72 jam. Glukosa yang diinginkan didapat dengan cara sentrifugasi selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

3. Penentuan kadar glukosa

Sebanyak 0,25 mL sampel hasil konversi enzimatis dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen DNS lalu dipanaskan selama 10 menit dalam air mendidih. Setelah dingin, serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada λ 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

Skema prosedur penelitian dapat dilihat pada Gambar 11.

Skema prosedur penelitian



Gambar 11. Skema prosedur penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan hasil yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas spesifik enzim selulase hasil pemurnian sebesar 99,889 U/mg meningkat 20 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim selulase dengan aktivitas spesifik 5,0120 U/mg.
2. pH optimum enzim selulase hasil amobilisasi yang terikat pada matriks bentonit yaitu pada pH 7.
3. Enzim selulase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 55 °C sedangkan suhu enzim selulase hasil amobilisasi memiliki suhu optimum 70 °C.
4. Uji stabilitas termal enzim selulase hasil pemurnian selama 90 menit pada suhu dan pH optimum memiliki aktivitas sisa sebesar 58% sedangkan enzim selulase hasil amobilisasi memiliki aktivitas sisa sebesar 61%.
5. Enzim selulase hasil amobilisasi dapat dipakai sebanyak 3 kali pengulangan.
6. Enzim hasil pemurnian memiliki nilai $V_{maks} = 1,1455 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, $K_M = 22,4059 \text{ mg/mL}$ substrat, $t_{1/2} = 95$ menit, $\Delta G_i = 103,5396$, dan $k_i = 0,0073 \text{ menit}^{-1}$, sedangkan enzim hasil amobilisasi diperoleh harga $V_{maks} = 2,7174 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$, $K_M = 76,5089 \text{ mg/mL}$, $t_{1/2} = 110$ menit, $\Delta G_i = 103,935$, dan $k_i = 0,0063 \text{ menit}^{-1}$.

7. Pada proses hidrolisis tongkol jagung oleh enzim selulase, kadar glukosa tertinggi didapatkan, yaitu 4,9783 mg/mL pada waktu inkubasi selama 72 jam dengan konsentrasi substrat 5%.

B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menggunakan alternatif matriks pengamobil selain matriks bentonit. Enzim yang diperoleh dilakukan pemurnian lebih lanjut untuk mendapatkan aktivitas yang lebih besar. Pada karakterisasi stabilitas termal enzim dilakukan pada suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim amobil. Hasil delignifikasi tongkol jagung dilakukan pengujian kadar lignin dan hemiselulosa untuk mengetahui kadar lignin dan hemiselulosa dari hasil delignifikasi. Perlu dilakukan optimasi kondisi untuk konversi selulosa dari tongkol jagung menjadi glukosa meliputi variasi enzim, waktu inkubasi dan peningkatan suhu inkubasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aulia, F. P. 2017. Amobilisasi Enzim Selulase dari *Bacillus substilis* ITBCCB148 Menggunakan Bentonit. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Bandar Lampung. 14-15.
- Bintang, M. 2010. *BIOKIMIA Teknik Penelitian*. Erlangga. Jakarta. 49-81.
- Boyer, R. F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. Benjamin Cumming Publising Company. San Fransisco.
- Devi S., M. Suhag, A. Dhaka, and J. Singh. 2011. Biochemical Conversion Process of Producing Bioetanol from Lignosellulosic Biomass. *International Journal of Microbial Resource Technology*. **1**(1):28-32.
- Dwidjoseputro, D. 1990. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta. 152.
- Ejiyurshal. 2017. *Mengenal Kandungan Kimia Tongkol Jagung Bahan Baku Bioetanol*. [Http://ejiyurshal.blogspot.co.id/2017/09/mengenal-kandungan-kimia-tongkol-jagung.html](http://ejiyurshal.blogspot.co.id/2017/09/mengenal-kandungan-kimia-tongkol-jagung.html). Diakses pada 26 September 2017.
- Fachry, A. R., P. Astuti., dan T. G. Puspitasari. 2013. Pembuatan Bioetanol dari Limbah Tongkol Jagung dengan Variasi Konsentrasi Asam Klorida dan Waktu Fermentasi. *Jurnal Teknik Kimia*. **19**.60-69.
- Fessenden, R. J., dan J. S. Fessenden. 1992. *Kimia Organik Jilid II*. Erlangga. Jakarta. 353.
- Fitriani, S. Bahri, dan Nurhaeni. 2013. Produksi Bioetanol Tongkol Jagung (*Zea Mays*) dari Hasil Proses Delignifikasi. *Online Jurnal of Natural Science*, **2**, 66-74.

- Gandjar, I. 1999. *Pengenalan Kapang Topik Umum*. Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Gokhan, C. 2002. Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild-Type Strain. *Turkish Journal of Biology*. **26**(4): 209-213.
- Gozan, M. 2014. *Teknologi Bioetanol Generasi-Kedua*. Erlangga. Jakarta. 10-50.
- Gunam, I. B. Wayan, W. R. Aryanta, I. Bagus N., dan S. Darma. 2011. Produksi Selulase Kasar dari Kapang *Trichoderma viride* dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi. *Jurnal Biologi*. **XV**(2):29-33.
- Habibah, F. 2015. *Produksi Substrat Fermentasi Bioetanol dari Alga Merah *Gracilaria verrucosa* melalui Hidrolisis Enzimatik dan Kimiawi*. Universitas Negeri Semarang. Semarang. 11-13.
- Hermiati, E., D. Mangunwidjaja, T. C. Sunarti, O. Suparno, dan B. Prasetya. 2010. Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*. **29**(4): 121-130.
- Hidayat, N., Masdiana C. Padaga, dan Sri Suhartini. 2006. *Mikrobiologi Industri*. ANDI. Yogyakarta. 23-30.
- Judoamidjojo, M., A. D. Abdul, dan G. S. Endang. 1990. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Press. Jakarta.
- Kazan, D., H. Ertan, and A. Erarslan. 1997. Stabilization of *Escherchia coli* Penicilin G Acylase Against Thermal Inactivation by Cross-linking with Dextran Dialehyde Polymers, *Appl. Microbiol Biotechnol*. **48**: 191-197.
- Khaerina, H. *Kinetika Reaksi Enzimatik*. [Http://khaerinaf.blogspot.co.id/](http://khaerinaf.blogspot.co.id/). (Diakses pada 19 Oktober 2012).
- Lehninger, A. L. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta. 192.

- Lestari, E. M., E. Yenie, dan S. R. Muria. 2015. Pembuatan Bioetanol dari Limbah Tongkol Jagung Menggunakan Proses *Simultaneous Sacharification and Fermentation* (SSF) dengan Variasi Konsentrasi Enzim dan Waktu Fermentasi. *JOM FTEKNIK*, 2(2): 1-6.
- Lowry, O. H., N. J., Rosebrough, A. L., Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *J.Biol. Chem.* 193-265.
- Mardina, P., A. I. Talalangi, J. F. M. Sitinjak, A. Nugroho, dan M. R. Fahrizal. 2013. Pengaruh Proses Delignifikasi pada Produksi Glukosa dari Tongkol Jagung dengan Hidrolisis Asam Encer. *Konversi*. 2(2): 17-23.
- Maula, V. *Makalah Polisakarida*. [Http://ipina10.blogspot.co.id/2012/12/makalah-polisakarida.html](http://ipina10.blogspot.co.id/2012/12/makalah-polisakarida.html). Diakses pada 12 Desember 2012.
- Mendels, M., A. Raymond, and R. Charles. 1976. *Measurement of Saccharifying Cellulose. Biotechnology and Bioengineering*. Symp. John Wiley and Sons Inc. New York. 6. 21-23.
- Ohtsuka, K. 1997. Preparation and Properties of Two-Dimensional Microporous Pillared Interlayered Solids. *J. Chem. Mater.* 9(1): 2039-2050.
- Oktariani, S. D. 2017. Amobilisasi Enzim Selulase dari Jamur *Aspergillus niger* L-51. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung. 40-41.
- Page, D. S. 1997. *Prinsip-prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta. 113.
- Payne, G., Bringi V., Prince C., and Shuler M. 1992. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Hanser Publishers. Munich-Vienna. 465 halaman.
- Pelczar, M. J., dan Chan E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiolog*. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Poedjiadi, A. dan Titin S. 2007. *Dasar-Dasar Biokimia*. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 158-171.

- Puslitbang, T. 2005. *Bentonit Alam Terpilar Sebagai Material Katalis*. Direktorat Pembinaan Pengusahaan Mineral dan Batubara. Jakarta.
- Rosmiati. 2008. Pemanfaatan Bahan Buangan (limbah) tongkol jagung untuk Pembuatan Furfural dengan Metode Destilasi. *Tesis*. Pengolahan Sumber Daya Alam dan Lingkungan Universitas Sumatera Utara. Medan.
- 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.
- Shofiyanto, M. E. 2008. *Hidrolisa Tongkol Jagung oleh Bakteri Selulolitik untuk Produksi Bioetanol dalam Kultur Campuran*. Fakultas Teknologi Pertanian IPB. Bogor.
- Smith, J. E. 1990. *Prinsip Bioteknologi*. PT Gramedia. Jakarta. 130-154.
- Suhartono, M. T., A. Suswanto, dan H. Widjaja. 1992. *Diktat Struktur dan Biokimia Protein PA*. IPB. Bogor.
- Supeno, M. 2007. *Bentonit Terpilar Alam sebagai Material Katalis/ Co-Katalis Pembuatan Gas Hidrogen dan Oksigen dari Air, Disertasi*. Universitas Sumatra Utara. Medan.
- Umbreit, W. W. 1967. *Advances In Applied Microbiology*. Academic Press. San Fransisco.
- Voet, D. and J. G. Voet. 2004. *Biochemistry 3rd Edition*. Wiley John Willey & Sons, INC. 139.
- Walsh, G. dan D. R. Headon. 1994. *Protein Biotechnolog*. John Willey and Sons. New York.

- Winarno, F. G. 1986. *Enzim Pangan dan Gizi*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia : Protein, Enzim dan asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Wulandari, A. F. 2016. *Amobilisasi Enzim Protease dari Bacillus subtilis ITBCCB148 Menggunakan Bentonit. Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Bandar Lampung. 17.
- Yang, Z., D. Michael A. Robert, X. Y. Fang, and J. R. Alan. 1996. *Polyethylene Glucol-induced Stabilization of Subtilisin, Enzyme Microb . Tehnol.*
- Zheng, Y., Pan, Z., dan Zhang, R., 2009. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int. J. Agric. & Biol. Eng.* **2**(3), pp. 51-68.
- Zulkarnain, A K. 1991. *Kimia Analisis Kualitatif*. Departemen Perindustrian. Yogyakarta.