

**BIOKONVERSI PATI-SELULOSA PADA LIMBAH KULIT SINGKONG
MENJADI PRODUK INTERMEDIET MENGGUNAKAN ISOLAT
INDIGENOUS BAKTERI TERPILIH**

(Skripsi)

Oleh

WIDYA SUSANTI



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

ABSTRACT

BIOCONVERSION OF CELLULOSE-STARCH CONSIST IN CASSAVA PEEL WASTE INTO INTERMEDIATE PRODUCTS USING SELECTED INDIGENOUS BACTERIA

By

WIDYA SUSANTI

Cassava peel is one of agricultural waste that has not been utilized optimally. Cassava peel waste contains starch and cellulose which could be converted into reducing sugar through acid hydrolysis or fermentation process. This research has purpose to convert cassava peel waste into intermediate products using bioconversion process by selected indigenous bacteria. The steps of experiments were the characterization composition of cassava peel substrate, isolation of indigenous bacteria, screening of amylolytic and cellulolytic bacteria, determination of optimum time and pH in the production of amilase and cellulase enzymes, determination of enzyme specific activities and hydrolysis of biomass using selected isolates sequently. The results showed that cassava peel contained 67.5% cellulose 23.69% starch, and 9.39% other compounds. Isolation of indigenous bacteria obtained by one isolate, namely SCWB-13 which has an amylolytic and cellulolytic indexes at 5.33 and 3.4 respectively. Determination of optimum conditions showed amilase and cellulase optimum activity at pH 7 and fermentation time of 48 hours with the highest amilase enzyme unit activity of 20.61 U / mL and specific activity of 53.94 U / mg while the activity of cellulase enzyme units was 1.60 U / mL and specific activity 8,19 U / mg. Effectiveness of the hydrolysis of cassava peels on Nutrient Broth (NB) media and mineral media using 4% cassava peel flour showed in mineral media having a higher total glucose which is 1556.2 mg compared with NB media. The level of effectiveness of hydrolysis in mineral media was produced 77.8% in yield of glucose. Based on the results of the study concluded that the isolate SCWB-13 has a good ability in bioconversion of starch-cellulose on cassava peel.

Keywords: Bioconversion, cassava peel waste, indigenous bacteria, amilase, cellulases

ABSTRAK

BIOKONVERSI PATI-SELULOSA PADA LIMBAH KULIT SINGKONG MENJADI PRODUK INTERMEDIET MENGGUNAKAN ISOLAT *INDIGENOUS* BAKTERI TERPILIH

Oleh

WIDYA SUSANTI

Kulit singkong merupakan salah satu limbah pertanian yang belum dimanfaatkan secara optimal. Limbah kulit singkong mengandung amilum dan selulosa yang dapat dikonversi melalui proses hidrolisis asam atau fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkonversi limbah kulit singkong menjadi produk intermediet menggunakan bakteri *indigenus* terpilih. Tahapan penelitian yang dilakukan yaitu karakterisasi substrat kulit singkong, isolasi bakteri *indigenus*, penapisan bakteri amilolitik dan selulolitik, penentuan waktu dan pH optimum pada produksi enzim amilase dan selulase, penentuan aktivitas spesifik enzim dan hidrolisis biomassa menggunakan isolat terpilih. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kulit singkong mengandung 67,5%, selulosa 23,69% amilum, dan 9,39% senyawa lainnya. Hasil isolasi bakteri *indigenus* diperoleh satu isolat yaitu SCWB-13 yang memiliki indeks amilolitik 5,33 dan indeks selulolitik 3,4. Penentuan kondisi optimum menunjukkan aktivitas optimum amilase dan selulase pada pH 7 dan waktu fermentasi 48 jam dengan aktivitas unit enzim amilase tertinggi 20,61 U/mL dan aktivitas spesifiknya 53,94 U/mg sedangkan aktivitas unit enzim selulase tertingginya 1,60 U/mL dan aktivitas spesifik 8,19 U/mg. Efektivitas hidrolisis kulit singkong pada media Nutrient Broth (NB) dan media mineral menggunakan tepung kulit singkong 4% menunjukkan pada media mineral memiliki total glukosa yang lebih tinggi yaitu 1556,2 mg dibandingkan dengan media NB. Tingkat efektivitas hidrolisis dalam media mineral menghasilkan 77,8% *yield* glukosa. Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa isolat SCWB-13 memiliki kemampuan yang baik dalam biokonversi pati-selulosa pada kulit singkong.

Kata kunci: Biokonversi, limbah kulit singkong, bakteri *indigenus*, amilase, selulase

**BIOKONVERSI PATI-SELULOSA PADA LIMBAH KULIT SINGKONG
MENJADI PRODUK INTERMEDIET MENGGUNAKAN ISOLAT
INDIGENOUS BAKTERI TERPILIH**

Oleh

WIDYA SUSANTI

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh 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 : **BIOKONVERSI PATI-SELULOSA PADA LIMBAH KULIT SINGKONG MENJADI PRODUK INTERMEDIET MENGGUNAKAN ISOLAT *INDIGENOUS* BAKTERI TERPILIH**

Nama Mahasiswa : **Widya Susanti**

No. Pokok Mahasiswa : 1517011082

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

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 : Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.



Sekretaris : Dr. Nurhasanah, M.Si.



**Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Mita Rilyanti, M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Drs. Suratman, M.Sc.
NIP 19640604 199003 1 002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 05 Desember 2019

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertandatangan dibawah ini

Nama : Widya Susanti
Nomor Pokok Mahasiswa : 1517011082
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul **“Biokonversi Pati-Selulosa Pada Limbah Kulit Singkong Menjadi Produk Intermediet Menggunakan Isolat *Indigenous* Bakteri Terpilih”** adalah benar karya sendiri dan saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

Bandar Lampung, 15 Desember 2019

Menyatakan



Widya Susanti
NPM 1517011082

RIWAYAT HIDUP

Widya Susanti dilahirkan di Grugugan, pada tanggal 02 Februari 1997 sebagai anak ketiga dari empat bersaudara, pasangan bapak Mono dan ibu Tukini. Penulis telah menyelesaikan pendidikan mulai dari Sekolah Dasar di SD Negeri 3 Roworejo pada tahun 2009, selanjutnya penulis menyelesaikan pendidikan sekolah menengah pertama di SMP Negeri 1 Sukoharjo pada tahun 2012 dan menyelesaikan pendidikan sekolah menengah atas di SMA Negeri 1 Sukoharjo pada tahun 2015. Pada tahun 2015 penulis diterima sebagai mahasiswa jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Biokimia II angkatan 2016 tahun 2018, asisten mata kuliah Biokimia I jurusan Biologi angkatan 2018 tahun 2018. Penulis juga mengikuti beberapa aktivitas organisasi, dimulai dengan menjadi Kader Muda Himaki (KAMI) periode 2015-2016, Anggota Muda Rois (AMAR) Fmipa Unila 2015-2016, dan Garuda BEM Fmipa Unila 2015-2016. Pada periode 2016 penulis diamanahkan Bendahara Departemen Pemberdayaan Sumber Daya Mahasiswa (PSDM) BEM Fmipa Unila. Pada periode 2017 penulis diamanahkan sebagai Bendahara Umum Himaki dan. Periode pada tahun 2018 penulis mengemban amanah sebagai Ketua Komisi II DPM FMIPA Unila. Pada tahun 2018 penulis melaksanakan Kuliah

Kerja Nyata (KKN) Tematik di desa kecamatan Palas kabupaten Lampung Selatan. Pada tahun 2019 penulis diamanahkan menjadi Sekretaris Menteri Sosial Masyarakat BEM U KBM Unila 2019.

MOTO

“Jadilah seseorang yang berilmu atau jadilah seorang pembelajar. Atau cintailah keduanya, dan apabila telah kau dapati itu maka tebarkanlah kebermanfaatannya karena amal adalah wujud dari ilmu. Hiduplah untuk memberi manfaat sebanyak-banyaknya.

“Barangsiapa menghendaki keuntungan di akhirat akan Kami tambahkan keuntungan itu baginya, dan barang siapa menghendaki keuntungan di dunia Kami berikan kepadanya sebagian darinya (keuntungan dunia) tetapi dia tidak akan mendapat bagian di akhirat”

(QS. Asy-Syura:20)

“Tidak akan pernah didapati hasil yang baik selama hubungan dengan Allah juga tak baik, karena hidup di bumi butuh seni, dan seni untuk hidup di bumi adalah dengan mencintai langit yang tinggi”

(Widya Susanti)

PERSEMBAHAN

*Dengan mengucap Alhamdulillahilalamin kepada Allah
Subhanahu Wa Ta'alla*

*Kupersembahkan goresan tinta dalam karya kecil ini sebagai tanda cinta, kasih
sayang, hormat dan baktiku terhadap kedua malaikat dalam hidupku :*

Ibuku & Bapakku tercinta

*yang telah menjadi sumber kekuatan dan semangat bagiku,
keringat yang selalu menjadi saksi akan perjuangannya untukku.
Bapak dan Ibu, lewat karya ini ananda ingin berterimakasih atas segala cinta,
kesabaran, pengorbanan, kasih sayang serta ketulusan yang tak pernah lelah
dalam setiap sujudnya mendo'akan hidupku.*

*Rasa hormat saya kepada :
Dr. Eng. Heri Satria,. M.Si.*

*Bapak Ibu Dosen Jurusan
Kimia atas dedikasi dan ilmu yang telah diberikan kepada
ananda selama menempuh pendidikan di Kampus.*

*Kakak-kakaku dan adikku tercinta yang selalu
memberikan dukungan serta kasih sayang.*

*Keluarga besarku dan teman-teman yang senantiasa memberikan semangat dan
bantuan untukku, selalu mengajarkan tentang arti berbagi, cinta, dan
kebersamaan.*

Serta

Almamaterku Tercinta

SANWACANA

Alhamdulillahirobbil'alamin, segala puji bagi Allah *Rabb* semesta alam atas segala nikmat dan karunianya yang tak terhingga, kasih dan sayang yang selalu mengalir, serta rahmatnya yang tak pernah terputus sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “ **Biokonversi Pati-Selulosa Pada Limbah Kulit Singkong Menjadi Produk Intermediet Menggunakan Isolat *Indigenous* Bakteri Terpilih**“ sebagai syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Sholawat beriring salam selalu tercurah kepada suri tauladan terbaik pengubah peradaban umat manusia nabi Muhammad Shalallahu ‘Allaihi Wassalam beserta para sahabat dan keluarganya, semoga kita termasuk umatnya yang mendapatkan *syafa'at* beliau di *yaumil akhir* nanti, *aamiin yarabbal'alamin*.

Teriring doa yang tulus *jazaakumullah khairan*, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si. selaku pembimbing I atas segala dedikasi yang telah beliau berikan selama menempuh pendidikan di kampus, atas semua kebaikan, keikhlasan, kesabaran, bimbingan, dan ilmu sehingga penelitian dan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT selalu memberikan kemudahan serta keberkahan atas segala kebaikan yang telah diberikan.

2. Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si. selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan serta arahan dengan ikhlas dan penuh kesabaran. Semoga Allah SWT selalu memberikan pertolongan dan membalas semuanya dengan kebaikan.
3. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku penguji yang telah membimbing, memberi arahan, dan semua ilmu yang telah diberikan. Semoga Allah SWT selalu memberikan keberkahan atas semua yang telah diberikan.
4. Bapak Drs. Suratman, M.Sc. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
5. Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si. selaku pembimbing akademik atas bimbingan, nasehat, serta motivasi yang telah diberikan kepada penulis.
6. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila.
7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila atas seluruh ilmu dan pengalaman yang telah diberikan kepada penulis selama mengikuti perkuliahan di kampus. Semoga Allah membalasnya dengan kebaikan.
8. Dengan segala ketulusan, *jazakumullah khayran* untuk kedua malaikat terbaikku Bapak Mono dan Ibu Tukini atas seluruh cinta, kasih sayang, kesabaran, keikhlasan, dan ketulusan doa yang selalu beliau senandungkan. Semoga Allah SWT membalas cintanya dengan *jannah-Nya, aamiin Allahuma aamiin*.
9. Terimakasih kepada mbakku Noni Kurniawati atas doa selalu menyemangatiku. Semoga Allah SWT selalu memberikan kemudahan dan kebahagiaan di dunia maupun di akhirat, *aamiin Allahuma aamiin*.

10. Kepada mas Didi Januardi dan adikku Fahri, terimakasih karena selalu mendukung dan menyengatiku, semoga Allah SWT akan membalas kebaikan kalian..
11. Terimakasih kepada keluarga besar bapak dan keluarga besar ibu yang selalu memberikan dukungan, motivasi, dan bantuan kepada penulis. Semoga setiap kebaikan yang diberikan dibalas oleh Allah SWT.
12. Bapak Ibu Dewan guru dari SD, SMP, dan SMA yang telah memberikan ilmu pengetahuan, pendidikan akhlak serta pengalaman kepada penulis.
Terimakasih yang tiada terkira, semoga bapak ibu selalu dalam lindungan dan diberikan *Jannah-Nya*.
13. Rekan seperjuangan penelitian Melina Putri Ahmad, Windi Ratnasari, Rani Fitria, Dwi Nurhayati, Desi Damayanti, Widya Kusuma dan Uhti Alaika yang senantiasa mendampingi serta memberikan motivasi kepada penulis dalam penelitian maupun penyusunan skripsi ini, semoga Allah limpahkan keberkahan kepada kalian.
14. Teman-teman terbaikku, Lia Purnia, Santi Primadona, Siska Sari Marvita, Lia Septiani, Dinda Sefta, Mahyal Fadhilah, Anisa Safitri, Tri Fstmasari S.Si., Sri Budi Asih, S.Si., Vina Novita Sari, S.Si., terimakasih atas doa, dukungan, semangat selamat perkuliahan dan terimakasih sudah mewarnai kehidupan kampusku.
15. Seluruh pimpinan Himaki 2017, terimakasih untuk seluruh pengalaman dan pelajaran akan kesolidan.
16. DPM FMIPA 2018, terimakasih untuk kebersamaannya dan pembelajaran yang telah diberikan.

17. BEM U KBM Unila 2019 Kabinet Kontribusi Bersama (Kobra Geulis dan Kobra Ireng), terimakasih atas pengertian dan kebersamaannya.
18. Teman-teman seperjuangan dari SMAN 1 Sukoharjo, Lina , Mukti, Feri dan Rifan. Terimakasih atas semangat dan dukungan selama ini, semoga kita dipertemukan di puncak kesuksesan. Aamiin.
19. Keluarga kontrakanku, Mba Widi, Mba Nopi, Santi, Sinta, Unni, Saadon, Miranda. Terimakasih banyak atas semua canda dan kebersamaan yang pernah kita alami, semoga apa yang pernah kita alami akan menjadi catatan indah yang akan selalu kita kenang. Semangat mengejar impian, semoga kita dipertemukan di puncak kesuksesan dan *keep istiqomah*. Aamiin.
20. Teman-teman Chem15try Terimakasih atas kebersamaanya dalam menuntut ilmu juga canda tawa bahagia yang selalu kalian hadirkan di setiap episode perjalanan kita.
21. Teman-teman Kuliah Kerja Nyata Palas, Ayu, Mba Mei, Jannah, Riyan, Erwin, dan kak Arqam Terimakasih atas pengalaman selama ini, terimakasih juga telah mengajarkanku banyak hal tentang sabar dan kerjasama. Semoga kita akan dipertemukan di masa depan yang cerah. Aamiin.
22. Terimakasih juga untuk kakak-kakak 2014 dan 2013 serta Adik-adik angkatan 2016 dan 2017 yang tidak bisa saya sebutkan. Semoga apa yang pernah kita lakukan memberikan perubahan di masa depan. Sukses selalu dan tetap menjadi yang terbaik.
23. Almamater tercinta.

24. Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu. Terimakasih atas segala ketulusan dan bantuannya. Semoga kebaikan yang telah dilakukan mendapat balasan dari Allah SWT.

Bandar Lampung, Desember 2019
Penulis,

Widya Susanti

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	5
C. Manfaat Penelitian.....	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
A. Singkong	7
B. Pati (Amilum).....	8
C. Selulosa	13
D. Enzim Amilase	14
E. Enzim Selulase ..	17
III. METODE PENELITIAN	19
A. Waktu dan Tempat	19
B. Alat dan Bahan	19
C. Prosedur Penelitan.....	20
1. Karakterisasi Substrat Biomassa	20
1.1 Preparasi Sampel.	20
1.2 Analisis Kandungan Selulosa dan Amilum.	20
2. Isolasi Bakteri <i>Indigenous</i>	21
2.1 Pembuatan NaCl Fisiologis.....	21
2.2 Pembuatan Media <i>Spread Plate</i> ..	22
2.3 Isolasi Bakteri..	22
2.3.1 Penapisan Bakteri Amilolitik.....	23
2.3.2 Penapisan Bakteri Selulolitik	23
2.3.3 Peremajaan Isolat Bakteri...	24
3. Produksi Enzim	24
3.1 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum .	24

3.3.1 Enzim Amilase	24
3.3.2 Enzim Selulase	25
3.2 Penentuan pH Optimum	26
4. Hidrolisis Biomassa Menggunakan Isolat Terpilih.....	26
5. Penentuan Aktivitas Unit Enzim Menggunakan Metode <i>Mandels</i> ...	27
5.1. Pembuatan Pereaksi.....	27
5.2 Uji Aktivitas Unit Enzim Amilase dan Selulase	28
6. Pembuatan Larutan Standar dan Kurva Standar Glukosa	29
7. Penentuan Kadar Protein Menggunakan Metode Lowry ..	29
7.1 Pembuatan Pereaksi.....	29
7.2 Penentuan Kadar Protein Enzim.....	30
D. Diagram Alir	31
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
A. Karakter Substrat Biomassa.....	32
B. Bakteri <i>Indigenous</i> Terpilih.....	35
1. Bakteri Amilolitik	36
2. Bakteri Selulolitik.....	38
C. Ekstrak Kasar Enzim Amilase dan Selulase.....	40
1. Enzim Amilase	40
2. Enzim Selulase	42
D.Kadar Glukosa dari Biomassa Menggunakan Isolat Terpilih	44
1. Kadar Glukosa pada Media <i>Nutrient Broth</i> (NB).....	46
2. Kadar Glukosa pada Media Mineral.....	47
E. Aktivitas Spesifik Enzim Amilase dan Selulase	48
V. SIMPULAN DAN SARAN	51
A. Simpulan	51
B. Saran	52
DAFTAR PUSTAKA ..	53
LAMPIRAN.....	58

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data Perbandingan Aktivitas Amilolitik.....	37
2. Data Perbandingan Aktivitas Selulolitik.....	39
3. Data Perhitungan Kandungan Amilum pada Kulit Singkong.....	59
4. Data Perhitungan Kandungan Selulosa pada Kulit Singkong.....	60
5. Data Indeks Amilolitik.....	60
6. Data Indeks Selulolitik.....	60
7. Data Perhitungan Aktivitas Unit Amilase dengan Variasi Waktu dan pH ...	61
8. Data Perhitungan Aktivitas Unit Selulase dengan Variasi Waktu dan pH....	65
9. Data Perhitungan Kadar Protein dari Enzim Amilase pH 7.....	69
10. Data Perhitungan Kadar Protein dari Enzim Selulase pH 7....	69
11. Data Perhitungan Aktivitas Spesifik Enzim Amilase pH 7	70
12. Data Perhitungan Aktivitas Spesifik Enzim Selulase pH ..	70
13. Data Hasil Hidrolisis Enzimatik pada Media NB	71
14. Data Hasil Hidrolisis Enzimatik pada Media Mineral	71
15. Data Perhitungan <i>Yield</i> Glukosa pada Media NB.....	72
16. Data Perhitungan <i>Yield</i> Glukosa pada Media Mineral.....	72

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar	
1. Struktur Amilum	9
2. Struktur Selulosa.....	13
3. Struktur Amorf dan Kristalin Selulosa.....	14
4. Diagram Alir	31
5. Persentase Amilum dan Selulase pada Kulit Singkong	34
6. Hasil Kultivasi Bakteri dengan Berbagai Pengenceran	35
7. Penapisan Bakteri Amilolitik	36
8. Penapisan Bakteri Selulolitik	39
9. Penentuan Waktu dan pH Optimum Enzim Terhadap Amilase.....	41
10. Penentuan Waktu dan pH Optimum Enzim Terhadap Selulase.....	43
11. <i>Loading Mass</i> Tepung Kulit Singkong	45
12. Kadar Total Glukosa Hasil Hidrolisis pada Media NB.....	46
13. Kadar Total Glukosa Hasil Hidrolisis pada Media Mineral.....	47
14. Perbandingan Aktivitas Unit dan Aktivitas Spesifik Enzim Amilase.....	49
15. Perbandingan Aktivitas Unit dan Aktivitas Spesifik Enzim Selulase	50

16. Kurva Standar Glukosa.....	59
17. Kurva Standar BSA.....	68

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Singkong (*Manihot esculenta*) merupakan salah satu tanaman pangan yang penting dan banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku berbagai produk agroindustri, salah satunya untuk menghasilkan pati (Zhang *et.al.*, 2016). Singkong banyak dibudidayakan karena tumbuhan ini dapat tumbuh dengan baik di negara beriklim tropis seperti Indonesia. Salah satu Provinsi di Indonesia yang menghasilkan singkong cukup banyak adalah Lampung. Menurut Badan Pusat Statistik Provinsi Lampung tahun 2018, produksi singkong pada kurun waktu tahun 2012-2017 meningkat rata-rata sebesar 1,77% per tahun. Produksi singkong yang cukup tinggi telah dimanfaatkan banyak industri berbasis singkong, salah satunya yaitu industri tapioka. Selain menghasilkan tepung tapioka, industri tapioka juga menyisakan produk samping berupa limbah, baik limbah padat maupun limbah cair (Sundarram *and* Thirupathihalli, 2014).

Limbah padat singkong merupakan sisa pengolahan ubi singkong berupa kulit singkong dan onggok. Limbah padat singkong mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku produksi gula pereduksi (Nugroho dkk., 2015). Komposisi kimia pada limbah padat singkong adalah selulosa (24,99%

w/w), hemiselulosa (6,67% w/w) dan amilum (61% w/w) (Nugroho dkk., 2015) yang memiliki potensi besar untuk dikonversi menjadi gula pereduksi. Proses konversi limbah padat singkong dapat dilakukan dengan hidrolisis enzimatik (Zhang *et al.*, 2016). Hidrolisis ini bertujuan untuk mendegradasi polimer yang terdapat pada limbah singkong yaitu pati (amilum), selulosa dan hemiselulosa menjadi monomernya yang merupakan monosakarida seperti glukosa dan xylosa. Gula sederhana ini merupakan bahan dasar yang dapat di konversi menjadi etanol, asam-asam organik dan produk biorefineri lainnya. Produk-produk yang dihasilkan memiliki nilai ekonomi yang lebih tinggi sehingga upaya biokonversi limbah padat singkong merupakan langkah untuk meningkatkan nilai tambah ekonomi limbah padat singkong (Yeunyaw *et al.*, 2015).

Hidrolisis enzimatik pada limbah padat singkong yang mengandung amilum dan selulosa membutuhkan setidaknya dua jenis enzim yaitu enzim amilase dan enzim selulase. Enzim ini bekerja sangat spesifik untuk menghidrolisis amilum dan selulosa. Proses hidrolisis amilum terjadi secara bertahap karena amilum terdiri dari dua komponen utama, yaitu amilosa dan amilopektin yang memiliki struktur dan jenis ikatan yang berbeda. Amilosa tersusun atas ikatan glukosa 1-4 glukosa dan amilopektin tersusun atas ikatan 1-4 glikosida dan 1-6 glikosida (Suhaida *et al.*, 2017). Amilosa akan dihidrolisis oleh enzim α -amilase pada proses likuifikasi dengan memecah ikatan α -1,4 glikosidik pada polimer amilum secara internal sehingga menghasilkan maltosa dan maltotriosa. Amilopektin akan dihidrolisis oleh enzim glukoamilase pada proses sakarifikasi dengan memutus ikatan α -1,4 dan α -1,6 glikosidik dari

gugus non pereduksi sehingga menghasilkan D-glukosa (Sundarram *and* Thirupathihalli, 2014).

Selulosa lebih sulit dihidrolisis dibandingkan dengan amilum, hal ini disebabkan karena selulosa memiliki area kristalin pada strukturnya. Banyak peneliti yang mengembangkan proses *pretreatment* untuk optimalisasi proses hidrolisis pada selulosa (Weerachanchai *et al.*, 2012). Proses *pretreatment* akan menyebabkan selulosa menjadi lebih mudah dihidrolisis (Abu *et al*, 2005). Semakin banyak area kristalin yang terhidrolisis akan menurunkan derajat kristalinitas yang ada pada selulosa, sehingga akan meningkatkan kinerja enzim pada proses hidrolisis enzimatik untuk menghasilkan glukosa (Sivamani and Baskar, 2018).

Hidrolisis enzimatik dinilai lebih efektif karena dapat mengurangi dampak pencemaran, pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan suhu tinggi, dan bersifat spesifik. Mikroorganisme adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan tanaman dan hewan. Sebagai sumber enzim, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetika, serta dapat menghasilkan enzim dalam jumlah besar (Sundarram *and* Thirupathihalli, 2014). Satu isolat mikroorganisme dapat digunakan secara berkali-kali, cukup dengan pembelian isolat diawal dan kemudian dapat diremajakan kembali dengan membuat biakan dalam jumlah banyak, sehingga menjadi persediaan dan dapat digunakan secara terus-menerus. Namun harus diperhatikan

penyimpanan bakteri tersebut agar tetap steril dan tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme lainnya. Rahmawati (2017) telah memanfaatkan mikroorganisme yang digunakan dalam biokonversi kulit singkong menjadi gula cair yaitu bakteri *Bacillus licheniformis*. Bakteri *Bacillus licheniformis* merupakan salah satu bakteri yang dapat menghasilkan enzim amilase yang akan memecah pati menjadi glukosa. Sebagaimana yang dikatakan oleh Nangin dan Sutrisno (2015) bahwa Bakteri *Bacillus licheniformis* adalah salah satu mikroba penghasil enzim APPM (Amilum Pemecah Pati Mentah) yang dapat memecah substrat pati untuk menghasilkan molekul lebih sederhana seperti glukosa, maltosa dan dekstrin. Namun, meski isolat bakteri dapat diremajakan, harga untuk satu kali pembelian bakteri yang telah siap pakai masih cukup mahal, sehingga diperlukan alternatif lain untuk memperoleh isolat bakteri dari sumber lain sehingga dapat meminimalisir biaya, salah satunya yaitu dengan menggunakan bakteri *indigenus*.

Sejumlah isolat bakteri *indigenus* telah berhasil diisolasi dari limbah industri pertanian, menunjukkan bahwa kekayaan biodiversitas bakteri *indigenus* yang berpotensi untuk dikembangkan dan ditingkatkan. Octavia (2010) telah melakukan isolasi bakteri *indigenus* dari kulit batang kenaf yang mampu mendegradasi lignin pada kulit batang kenaf sehingga dihasilkan serat kenaf dengan kualitas yang lebih baik dengan bantuan bakteri *indigenus* dalam pembusukannya. Selain itu Rianingsih (2010) telah melakukan isolasi bakteri dari fermentasi pati singkong dan memperoleh bakteri asam laktat pada proses isolasinya. Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, menunjukkan bahwa bakteri *indigenus* berpotensi dalam proses degradasi pati-selulosa

pada limbah kulit singkong untuk menghasilkan gula pereduksi. Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi dan seleksi bakteri *indigenous* yang memiliki aktivitas amilolitik dan selulolitik pada limbah kulit singkong, sehingga dapat digunakan dalam biokonversi limbah kulit singkong menjadi glukosa.

B. Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka penelitian ini memiliki beberapa tujuan sebagai berikut :

1. Mengisolasi bakteri pendegradasi kulit singkong yang memiliki aktivitas amilolitik dan selulolitik.
2. Mendapatkan kondisi optimum dalam produksi enzim amilase dan selulase dari mikroorganisme *indigenous*.
3. Mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam proses degradasi limbah kulit singkong berdasarkan aktivitas amilolitik dan selulolitik.
4. Mengetahui tingkat efisiensi degradasi substrat limbah kulit singkong berdasarkan gula pereduksi yang dihasilkan.

C. Manfaat Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan tujuan diatas maka penelitian ini memiliki manfaat sebagai berikut :

1. Meningkatkan nilai tambah limbah padat kulit singkong menjadi produk yang bernilai ekonomi tinggi.

2. Menjadikan limbah padat kulit singkong sebagai bahan baku utama dalam produksi gula pereduksi.
3. Menambah literasi terkait waktu inkubasi dan pH optimum dalam produksi enzim amilase dan selulase.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Singkong

Singkong (*Manihot esculenta*) merupakan salah satu tanaman pangan yang banyak tumbuh di negara-negara tropis seperti Indonesia. Produksi singkong di Indonesia pada kurun 5 tahun terakhir mengalami peningkatan yang cukup signifikan. Menurut Badan Pusat Statistik Nasional produksi singkong nasional mencapai 234,84 Ku/Ha pada tahun 2018 dan diperkirakan akan terus meningkat setiap tahunnya.

Pemanfaatan singkong tidak hanya terbatas pada produksi pangan, seiring dengan perkembangan teknologi singkong banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku berbagai industri, seperti industri pellet atau pakan ternak, tepung tapioka, pembuatan etanol, tepung gaplek, ampas tapioka yang digunakan dalam industri kue, roti, kerupuk, dan lain-lain (Ado *et al.*, 2009).

Pemanfaatan singkong diberbagai industri juga menghasilkan limbah yang cukup besar, baik limbah cair maupun limbah padat. Limbah cair dari industri singkong dihasilkan dari pembuatan produk berbahan baku singkong, baik pencucian bahan baku sampai pada proses pemisahan pati dari air. Limbah cair ini memiliki kandungan bahan organik seperti glukosa 21,067 %,

karbohidrat 18,900 % dan vitamin C sebesar 51,040 % (Riyanti, 2010). Sedangkan limbah padat dari pengolahan singkong yakni kulit singkong dan onggok. Komposisi kimia pada limbah padat singkong berupa selulosa (24,99% w/w), hemiselulosa (6,67% w/w) dan pati (61% w/w) (Nugroho dkk., 2015) memberi potensi besar untuk dikonversi menjadi gula pereduksi. Proses konversi limbah padat singkong menjadi produk intermediet berupa glukosa dapat dilakukan dengan cara hidrolisis enzimatis (Zhang *et al.*, 2016). Proses hidrolisis ini bertujuan untuk memecah ikatan pada polimer selulosa dan amilum yang terdapat pada kulit singkong menjadi monomer-monomer penyusunnya berupa monosakarida seperti glukosa, yang dapat dikonversi menjadi etanol (Yeunyaw *et al.*, 2015).

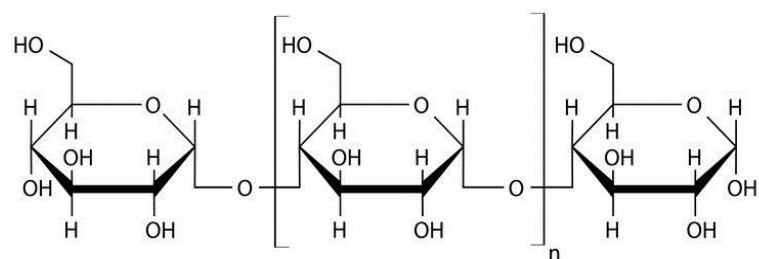
B. Pati (Amilum)

Pati atau amilum adalah karbohidrat kompleks yang tidak larut dalam air, berwujud bubuk putih, tawar dan tidak berbau. Pati berupa homopolimer glukosa dengan ikatan α -glikosidik. Berbagai macam pati tidak sama sifatnya, tergantung dari panjang rantai C-nya serta lurus atau bercabang rantai molekulnya (Ruiz *et al.*, 2011).

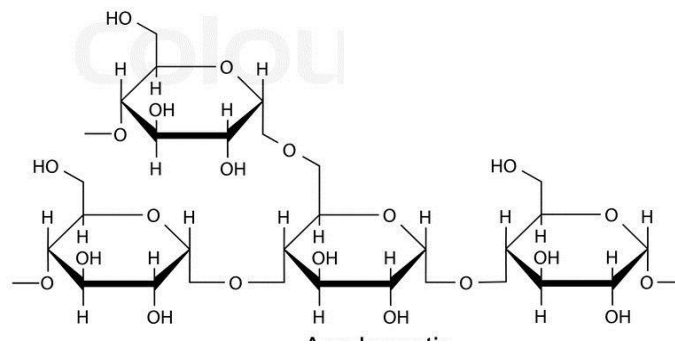
Pati merupakan suatu senyawa organik yang tersebar luas pada kandungan tanaman. Pati dihasilkan dari dalam daun-daun hijau sebagai wujud penyimpanan sementara dari produk fotosintesis. Pati juga tersimpan dalam bahan makanan cadangan yang permanen untuk tanaman, dalam biji, jari-jari teras, kulit batang, akar tanaman menahun, dan umbi. Pati yang

diperdagangkan dapat diperoleh dari berbagai bagian tanaman, misalnya endosperma biji tanaman gandum, jagung dan padi, umbi kentang, umbi akar *Manihot esculenta* (pati tapioka), batang *Metroxylon sagu* (pati sagu), dan rizom umbi tumbuhan bersitaminodia yang meliputi *Canna edulis*, *Maranta arundinacea*, dan *Curcuma angustifolia* (pati umbi larut) (Gunawan dan Mulyani, 2004).

Pati terdiri dari 2 fraksi yang dapat dipisahkan dengan air panas. Fraksi terlarut disebut amilosa dan fraksi yang tidak larut disebut amilopektin (Risnoyatiningsih, 2011). Pati mengandung 20% - 30% amilosa dan 70% - 80% amilopektin (Srichuwong and Jane, 2007). Amilosa merupakan suatu polimer rantai tunggal tidak bercabang, terbentuk dari 500-20.000 monomer D-glukosa yang dihubungkan oleh ikatan 1,4 glikosidik. Sedangkan amilopektin adalah suatu polimer rantai bercabang terbentuk dari 100.000 monomer glukosa yang dihubungkan oleh ikatan 1,4 glikosidik pada rantai utama dan 1,6 glikosidik pada percabangannya (Ratna, 2011). Struktur pati yang terdiri dari amilosa dan amilopektin dapat dilihat pada Gambar 2.



(a) Amilosa



(b) Amilopektin

Gambar 1. Struktur amilum (Ruiz *et al.*, 2011)

Pati dapat dihidrolisis menggunakan asam dan secara enzimatik. Hidrolisis secara enzimatik memiliki perbedaan mendasar dengan hidrolisis secara asam. Hidrolisis secara asam memutus rantai pati secara acak, sedangkan hidrolisis secara enzimatik memutus rantai pati secara spesifik pada percabangan tertentu (Risnoyatiningasih, 2011)

1. Hidrolisis pati menggunakan asam

Hidrolisis asam merupakan proses pemecahan pati secara acak yang tidak dipengaruhi oleh keberadaan ikatan α -1,6-D-glikosidik. Hidrolisis dengan asam akan lebih sensitif pada ikatan α -1,4-D-glikosidik dibanding ikatan α -1,6-D-glikosidik. Namun struktur linier dengan ikatan α -(1,4) yang terdapat pada bagian kristalin, bagian ini tersusun sangat rapat sehingga sangat sukar dimasuki air dan atau asam, akibatnya akan lebih tahan terhadap asam. Bagian amorf walaupun tersusun oleh ikatan α -(1,6) namun merupakan daerah yang kurang padat dan mudah dimasuki air sehingga akan

memudahkan proses hidrolisis asam terhadap granula pati. Proses hidrolisa asam menggunakan senyawa asam sebagai katalis, baik asam lemah maupun asam kuat. Secara umum hidrolisis asam encer terdiri dari dua tahap. Pada tahap pertama sebagian besar pati akan terhidrolisis menjadi maltosa. Tahap kedua dioptimasi untuk menghidrolisis maltosa sehingga menghasilkan glukosa. Jenis asam encer yang biasanya digunakan untuk hidrolisis ini adalah HCl encer. Kelemahan dari hidrolisis asam encer adalah degradasi gula hasil di dalam reaksi hidrolisis dan pembentukan produk samping yang tidak diinginkan (Tahezadeh *and* Karimi, 2008).

Proses hidrolisis dengan asam encer memiliki keterbatasan dalam hal efisiensi *recovery* gula, yaitu hanya sebesar 50%. Hal ini dikarenakan pada proses degradasi gula terjadi pembentukan produk yang tidak diinginkan seperti furfural yang merupakan bahan kimia yang digunakan dalam industri plastik. Furfural ini dapat mematikan mikroorganisme yang melakukan proses fermentasi. Keuntungan utama penggunaan asam encer adalah reaksinya yang cepat sehingga mempercepat proses berikutnya, sedangkan kerugiannya yaitu hasil gula yang diperoleh sedikit (Badger, 2002).

Degradasi gula dan produk samping ini tidak hanya akan mengurangi hasil produksi glukosa. Beberapa senyawa inhibitor yang dapat terbentuk selama proses hidrolisis asam encer adalah furfural, *5-hydroxy methyl furfural* (HMF), asam levulinik (*levulinic acid*), asam asetat (*acetic acid*), asam format (*formic acid*), asam uronat (*uronic acid*), asam *4-hydroxybenzoic*, asam vanilik (*vanilic acid*), vanillin, *phenol*, *cinnamaldehyde*, formaldehida

(*formaldehyde*), dan beberapa senyawa lain (Taherzadeh *and* Karimi, 2008). Proses hidrolisis asam pekat (*concentrated acid hydrolysis*), meliputi proses dekrystalisasi pati dengan asam pekat (misalnya HCl) dan dilanjutkan dengan hidrolisis pati dengan asam encer. Tantangan utama dari teknologi ini adalah pemisahan gula dengan asam, *recovery* asam, dan rekonsentrasi asam (Scheper, 2007).

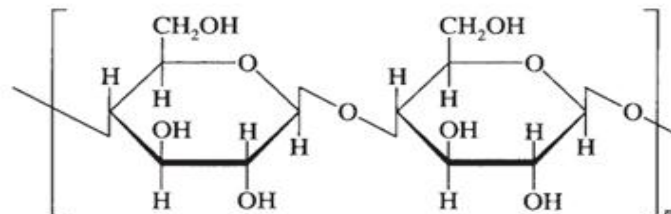
2. Hidrolisis pati menggunakan enzim

Hidrolisis pati secara enzimatik dapat menghidrolisis pati menjadi monomer yang lebih sederhana yaitu oligosakarida atau dekstrin melalui bantuan enzim amilase. Proses ini diawali dengan gelatinisasi pati atau pemanasan granula pati dengan air hingga mengembang dan rusak. Suhu pada gelatinasi diatur pada kisaran 66°C, sehingga pati dapat terlarut yang ditandai dengan menurunnya viskositas larutan. Sakarifikasi adalah ketika dekstrin hasil likuifikasi akan dihidrolisis lebih lanjut oleh enzim tunggal (glukoamilase) maupun enzim campuran (glukoamilase dan pullulanase) yang biasa disebut *dextrozyme* untuk dikonversi menjadi glukosa (Ruiz *et al.*, 2011). Pada proses hidrolisis pati, terdapat tiga tahapan dalam mengkonversi pati yaitu tahap gelatinisasi, likuifikasi dan sakarifikasi. Tahap gelatinisasi merupakan tahap pembentukan suspensi kental dari butir pati, tahap likuifikasi yaitu hidrolisis pati parsial yang ditandai dengan menurunnya viskositas, sedangkan sakarifikasi merupakan proses lebih lanjut dari hidrolisis untuk menghasilkan glukosa. Komposisi hidrolisat yang diperoleh setelah hidrolisis pati sangat

tergantung pada efek suhu, kondisi hidrolisis dan asal enzim. pH optimum untuk aktivitas ditemukan 7,0 (Sundarram *and* Thirupathihalli, 2014).

C. Selulosa

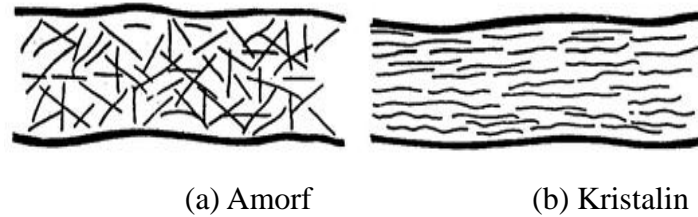
Selulosa adalah polimer glukosa yang tidak larut dalam air yang monomernya berupa rantai lurus dengan ikatan β -1,4 glukosida dari suatu selobiosa (dimer dari glukosa) (Shuangqi *et al.*, 2011). Selulosa banyak ditemukan pada dinding sel tumbuhan terutama pada tangkai, batang, dahan, dan semua bagian berkayu dari jaringan tumbuhan. Di alam, biasanya selulosa berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan (Shuangqi *et al.*, 2011). Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis. Struktur selulosa dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur selulosa

Unit penyusun selulosa adalah selobiosa karena unit keterulangan dalam molekul selulosa adalah 2 unit gula (D-glukosa). Rantai lurus tersebut berhubungan melalui ikatan hidrogen dan gaya van der Waals (Perez *et al.*, 2002). Adanya ikatan hidrogen serta gaya van der Waals, menyebabkan struktur selulosa dapat tersusun secara teratur dan membentuk daerah kristalin.

Di samping itu, juga terbentuk rangkaian struktur yang tidak tersusun secara teratur yang akan membentuk daerah nonkristalin atau amorf. Selulosa mengandung sekitar 50-90% bagian berkrystal dan sisanya bagian amorf (Shuangqi *et al.*, 2011), seperti yang terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur Amorf dan Kristalin Selulosa (Shuangqi *et al.*,2011)

Ikatan β -1,4 glukosida pada serat selulosa dapat dipecah menjadi monomer glukosa dengan cara hidrolisis asam atau enzimatik. Selulosa dapat didegradasi oleh enzim selulase yang dapat dihasilkan oleh mikroba. Enzim tersebut mendegradasi molekul selulosa yang tidak larut menjadi monosakarida atau disakarida (Razie dkk., 2011). Derajat kristalinitas yang tinggi pada selulosa menyebabkan tidak optimalnya proses hidrolisis selulosa. Untuk mengurangi derajat kristalinitas pada selulosa maka diperlukan proses *pretreatment* (Weerachanchai,P *et al.*, 2012). Proses *pretreatment* akan menyebabkan selulosa menjadi lebih mudah dihidrolisis (Mosier *et al*, 2005). Penurunan derajat kristalinitas yang ada pada selulosa akan meningkatkan kinerja enzim pada proses hidrolisis enzimatik untuk menghasilkan glukosa (Sivamani and Baskar, 2018).

D. Enzim Amilase

Enzim adalah biokatalisator protein yang dapat mempercepat laju reaksi suatu reaksi kimia dalam tubuh makhluk hidup. Kerja enzim bersifat spesifik dalam kerja katalitiknya, enzim hanya akan bekerja pada jenis substrat tertentu.

Kinerja enzim yang spesifik ini disebabkan karena adanya gugus-gugus polar atau nonpolar yang terdapat dalam struktur enzim (Fessenden, 1992). Ada tiga jenis sumber utama enzim yaitu enzim yang berasal dari tumbuhan seperti papain, enzim yang bersumber dari hewan seperti tripsin dan enzim yang berasal dari mikroorganisme seperti amilase (Oyeleke and Oduwole, 2009).

Bakteri amilolitik adalah jenis bakteri yang dapat memproduksi enzim amilase yang menghidrolisis pati. Untuk memperoleh bakteri ini dapat dilakukan dengan mengisolasi dan seleksi mikroba dari sumber yang kaya akan kandungan pati. Ada banyak jenis bakteri yang termasuk dalam jenis bakteri amilolitik yaitu *Bacillus*, *Clostridium*, *Bacteriodes*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Thermus* dan *Actynomicetes* (Reddy *et al.*, 2008). Uji aktivitas bakteri amilolitik dapat dilakukan dengan cara menambahkan larutan iodin pada media yang mengandung bakteri amilolitik. Terbentuknya zona bening merupakan uji positif adanya aktivitas bakteri amilolitik (Ukwuru and Egbonu, 2013). Daerah di luar zona bening akan berwarna biru keunguan setelah diberi larutan tersebut, karena larutan iodin akan bereaksi dengan pati yang tidak dihidrolisis. Zona bening tidak ikut terwarnai karena pati yang terdapat pada zona tersebut sudah terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti disakarida atau monosakarida (Naidu and Saranraj, 2013).

Berdasarkan mekanisme kinerja enzim amilase, enzim ini dibagi menjadi beberapa jenis yakni

1. 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. Secara umum α -amilase stabil pada pH 5,5 – 8,0 dan aktivitas optimum secara normal berada pada pH 4,8 – 6,5. 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 (Monteiro *et al.*, 2010).
2. β -Amilase (EC 3.2.1.2) adalah enzim *exo*-hidrolase yang bekerja dari ujung rantai polisakarida yang tidak tereduksi oleh hidrolisis ikatan α -1, 4-glikosidik untuk menghasilkan unit maltosa berturut-turut. Sumber utama β -Amilase adalah benih tanaman tingkat tinggi dan ubi jalar. Selama pematangan buah, β -Amilase memecah pati menjadi maltosa yang menghasilkan rasa manis dari buah yang matang. pH enzim yang optimal berkisar antara 4,0 hingga 5,5. β -Amilase dapat digunakan untuk aplikasi yang berbeda pada penelitian serta industri (Sundarram *and* Thirupathihalli, 2014).
3. Glukoamilase (EC 3.2.1.3) memecah ikatan α -1,4 dalam amilose, 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 (Sundarram *and* Thirupathihalli, 2014).

E. Enzim Selulase

Enzim selulase atau enzim yang dikenal dengan nama sistematik β -1,4 glukano-4-glukano hidrolase adalah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan glikosidik β -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa. Selulase merupakan enzim terinduksi yang disintesis oleh mikroorganisme selama ditumbuhkan dalam medium selulosa (Mojsov, 2012). Proses untuk menghidrolisis selulosa yang tidak larut atau selulosa kristal diperlukan kerja sinergistik dari ketiga komponen enzim tersebut. Adapun ketiga komponen enzim tersebut yaitu :

1. Ekso- β -(1,4)-glukanase dikenal sebagai faktor C1. Faktor ini diperlukan untuk menghidrolisis selulosa dalam bentuk kristal.
2. Endo- β -(1,4)-glukanase dikenal sebagai faktor Cx. Faktor ini diperlukan untuk menghidrolisis ikatan β -(1,4)-glikosida pada selulosa bagian amorf 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 untuk bekerja dalam pemecahan ikatan adalah 4-5.
3. β -(1,4)-glukosidase menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Ado *et al.*, 2009).

Aktivitas enzim endoglukanase pada umumnya dapat diuji dengan substrat CMC (*Carboxymethyl cellulose*) sehingga enzim endoglukanase disebut dengan istilah CMCase, sedangkan aktivitas enzim selobiohidrolase atau eksoglukanase seringkali diuji dengan substrat avisel sehingga enzim eksoglukanase disebut dengan aviselase (Zhang *et al.*, 2016). Tiga enzim tersebut berperan dalam mendegradasi selulosa menjadi gula sederhana. Salah satu enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa adalah endo-1,4 β -glukonase yang dapat dideteksi dengan hidrolisis CMC dari nilai indeks selulolitik. Nilai indeks selulolitik menggambarkan kemampuan isolat bakteri selulolitik dalam mengekskresikan enzim endoglukanase (CMCase), semakin besar nilai indeks selulolitik maka semakin besar kemampuan dalam mengekskresikan CMCase. Endoglukanase merupakan komponen selulase yang selalu ditemukan pada bakteri selulolitik. Pertumbuhan dan kemampuan bakteri merombak bahan organik ditandai dengan terbentuknya zona bening pada medium CMC. Zona bening yang timbul menunjukkan terjadinya hidrolisis bahan organik dalam substrat yang diakibatkan oleh enzim selulase dari bakteri selulolitik (Shuangqi *et al.*, 2011).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan April- September 2019 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, bunsen, jarum ose, mikropipet, neraca analitik, termometer, *magnetic stirrer*, lemari pendingin, batang pengaduk kaca, kompor gas, sentrifus, *autoclave*, oven, penangas, rak tabung reaksi, *waterbath*, *shaker incubator*, *laminar air flow*, inkubator, gunting, blender, dan spektrofotometer UV-VIS.

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah kulit singkong dari hasil limbah pertanian, *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), akuades, amilum, CMC (*Carboxymethyl cellulose*), *congo-red*, iodin (I_2), natrium klorida (NaCl), natrium nitrat ($NaNO_3$), dikalium hidrogen fosfat (K_2HPO_4), magnesium sulfat ($MgSO_4$), pepton, *yeast extract*, agar, *buffer phosphate*.

C. Prosedur Penelitian

1. Karakterisasi Substrat Biomassa

1.1 Preparasi Sampel

Singkong dikupas dan dipisahkan antara kulit dan buahnya, kemudian kulit singkong dipotong dengan menggunakan gunting hingga ukurannya seragam. Kulit yang telah dipotong-potong kemudian disimpan didalam erlenmeyer dan ditunggu selama 1-6 hari hingga membusuk yang ditandai dengan perubahan secara fisik dari kulit singkong yaitu perubahan berupa munculnya bau tak sedap dan tekstur limbah sudah tidak keras. Kulit singkong digunakan sebagai sampel untuk isolasi bakteri, sedangkan untuk substrat diambil dari limbah kulit singkong. Limbah kulit singkong digiling hingga menjadi tepung kulit singkong dan disaring.

1.2 Analisis Kandungan Selulosa dan Amilum

Analisis kandungan selulosa dan amilum dilakukan dengan metode TAPPI. Analisis diawali dengan menimbang 1 gram tepung kulit singkong lalu dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 10 mL akuades lalu dipanaskan pada suhu 95°C selama 45 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Setelah larutan dingin kemudian filtrat (F1) dan endapan dipisahkan dengan cara sentrifus, proses ini diulangi sebanyak tiga kali. Pada masing-masing pengulangan diambil 1 tetes filtrat dan ditambah larutan iodine untuk menguji adanya amilum pada filtrat yang ditandai dengan warna ungu, apabila saat ditetesi iodine filtrat

sudah tidak berubah warna menandakan amilum telah terhidrolisis menjadi glukosa dan proses pemanasan dihentikan. Filtrat yang diperoleh dari hasil sentrifus digunakan untuk analisis amilum sedangkan endapan digunakan untuk analisis selulosa.

Endapan yang diperoleh dikeringkan dan ditimbang, kemudian ditambah H_2SO_4 72% dan distirrer selama 6 jam, setelah 6 jam kemudian ditambah akuades hingga konsentrasi H_2SO_4 menjadi 4% lalu diautoklaf selama 1 jam pada suhu 121°C . Selanjutnya filtrat dinetralkan dengan CaCO_3 sampai pH menjadi pH 7, kemudian filtrat dianalisis kandungan selulosanya menggunakan metode Mendels.

Seluruh filtrat yang diperoleh dari proses sebelumnya (F1) kemudian ditambah H_2SO_4 4% lalu diautoklaf selama 1 jam pada suhu 121°C .

Selanjutnya filtrat dinetralkan dengan CaCO_3 sampai pH sampel menjadi pH 7. Kemudian filtrat yang telah netral diukur absorbansinya pada λ 550 nm (Miller, 1959).

2. Isolasi Bakteri *Indigenous*

2.1 Pembuatan NaCl Fisiologis 0,96%

Sebanyak 0,96 g NaCl dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda tera dan dihomogenkan. Larutan NaCl yang akan digunakan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C .

2.2 Pembuatan Media *Spread Plate*

Media *spread plate* digunakan untuk menumbuhkan bakteri pada proses isolasi, dibuat dengan cara menimbang 2,8 g *nutrient agar* (*yeast extract* 2 g, pepton 5 g, agar 15 g, dan natrium klorida 5 g dalam 1000 mL akuades) dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 100 mL akuades kemudian ditutup menggunakan sumbat. Media *nutrient agar* (NA) kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media yang telah steril dituang pada cawan petri dengan volume 20 mL untuk masing-masing cawan dan didiamkan pada suhu ruang sampai media memadat dan siap digunakan untuk tahap selanjutnya.

2.3 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode *enrichment* (Oryani and Lambui., 2017) dan *spread plate*. Sebanyak 5 spatula potongan kulit singkong yang telah diinkubasi dimasukkan kedalam 5 mL larutan NaCl fisiologis dengan pengenceran hingga 10^{-7} . Masing-masing pengenceran diambil 0,1 mL untuk dituang dengan metode *spread plate* pada medium NA dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1-2 hari. Koloni bakteri yang tumbuh terpisah atau berupa koloni tunggal selanjutnya dimurnikan menggunakan metode *streak plate* pada medium NA. Isolat murni yang diperoleh ditentukan aktivitas amilolitik dan selulolitiknya.

2.3.1 Penapisan Bakteri Amilolitik

Penapisan bakteri dilakukan untuk memperoleh bakteri yang memiliki aktivitas amilolitik, dilakukan dengan membuat media (2,8% NA; 1% pati; 100 mL akuades) disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit kemudian setelah dingin media dituang pada cawan petri. Isolat murni yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan pada media yang telah disiapkan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Setelah diinkubasi kemudian media yang telah ditumbuhi bakteri disiram menggunakan 0,1% (w/v) larutan iodin hingga seluruh permukaan media tertutup dengan iodin. Zona bening akan terbentuk disekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa bakteri memiliki aktivitas amilolitik (Naiola, 2001).

Secara kualitatif, besarnya aktivitas amilase dapat dinyatakan sebagai indeks amilolitik atau indeks aktivitas amilolitik yang diperoleh dengan menggunakan rumus dalam Persamaan 1 berikut ini :

$$\text{Indeks amilolitik} = \frac{A-B}{B} \quad (1)$$

Keterangan :

A = diameter zona bening (mm)

B = diameter koloni (mm)

2.3.2 Penapisan Bakteri Selulolitik

Penapisan bakteri dilakukan untuk memperoleh bakteri yang memiliki aktivitas selulolitik. Adapun tahapan yang dilakukan dengan membuat media (0,2% NaNO₃; 0,1% K₂HPO₄; 0,05% MgSO₄; 0,05% NaCl; 0,2%

CMC; 1,5% agar-agar; 0,2% *yeast extract*; 0,5% pepton; 100 mL akuades) disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit kemudian isolat murni hasil isolasi diinokulasikan pada media yang telah disiapkan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Setelah diinkubasi kemudian media yang telah ditumbuhi bakteri disiram menggunakan *congo-red* selama 15 menit dan dibilas menggunakan 1M NaCl. Zona bening akan terbentuk disekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa bakteri memiliki aktivitas selulolitik.

Secara kualitatif, besarnya aktivitas selulase dapat dinyatakan sebagai indeks selulolitik atau indeks aktivitas selulase yang diperoleh dengan menggunakan rumus dalam Persamaan 2 berikut ini :

$$\text{Indeks selulolitik} = \frac{A-B}{B} \quad (2)$$

Keterangan :

A = diameter zona bening (mm)

B = diameter koloni (mm)

2.3.3 Peremajaan Isolat Bakteri

Diambil satu ose biakan murni bakteri kemudian diinokulasikan kedalam media Agar Miring (NA). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Peremajaan bakteri dilakukan setiap dua minggu sekali agar stok isolat tetap terjaga.

3. Produksi Enzim

3.1 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

3.1.1 Enzim Amilase

Optimasi produksi enzim amilase dilakukan dengan membuat media inokulum (1,3 g NB dilarutkan dalam 100 mL akuades) kemudian dipanaskan hingga larut. Selanjutnya media disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media inokulum didiamkan selama 24 jam dan setelah 24 jam dimasukkan 2 ose bakteri kemudian di shaker selama 24 jam. Media inokulum yang telah dishaker selama 24 jam disentrifugasi selama 20 menit, kemudian diambil pellet lalu dimasukkan kedalam media fermentasi dalam keadaan aseptis.

Media fermentasi yang terdiri dari pati, NB dalam 100 mL *buffer phosphat* kemudian dipanaskan hingga larut dan media disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah media fermentasi berisi bakteri lalu dihomogenkan menggunakan shaker inkubator selama 72 jam dan dilakukan *sampling* setiap 24 jam dan selanjutnya biakan disentrifugasi selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh disebut ekstrak kasar enzim yang akan diuji aktivitasnya dengan metode *Mandels*.

3.1.2 Enzim Selulase

Optimasi produksi enzim selulase dilakukan dengan membuat media inokulum (1,3 g NB dilarutkan dalam 100 mL akuades) kemudian dipanaskan hingga larut. Selanjutnya media disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media inokulum didiamkan selama 24 jam dan setelah

24 jam dimasukkan 2 ose bakteri kemudian di shaker selama 24 jam.

Media inokulum yang telah dishaker selama 24 jam disentrifugasi selama 20 menit, kemudian diambil pellet lalu dimasukkan kedalam media fermentasi dalam keadaan aseptis.

Media fermentasi yang terdiri dari 0,2% NaNO_3 ; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,05% MgSO_4 ; 0,05% NaCl ; 0,2% CMC; 1,5% agar-agar; 0,2% *yeast extract*; 0,5% pepton; 100 mL buffer fosfat pH 7 disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah media fermentasi berisi bakteri lalu dihomogenkan menggunakan shaker inkubator selama 72 jam dan dilakukan *sampling* setiap 24 jam dan selanjutnya biakan disentrifugasi selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh disebut ekstrak kasar enzim yang akan diuji aktivitasnya dengan metode *Mandels*.

3.2 Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum produksi enzim dilakukan dengan mereaksikan ekstrak kasar enzim dengan substrat amilum 1% pada enzim amilase dan substrat CMC 0,5% pada enzim selulase. Kemudian dilakukan variasi pH (5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8) dengan menggunakan *buffer fosfat*. Uji aktivitas enzim dilakukan dengan metode *Mandels* seperti prosedur pada uji aktivitas untuk waktu optimum (Irawati, 2016).

4. Hidrolisis Biomassa menggunakan Isolat Terpilih

Tahapan hidrolisis pati yang pertama adalah *loading mass*, proses dimulai dengan membuat variasi tepung kulit singkong sebagai substrat 10, 20 30,

40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g/L. Selanjutnya substrat dihomogenkan dan diamati untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan pada media fermentasi, konsentrasi dipilih berdasarkan tingkat kekeruhannya. Larutan yang dipilih adalah larutan yang tergolong cukup keruh tetapi tidak sangat keruh, karena apabila konsentrasi substrat kulit singkong terlalu banyak didalam media fermentasi akan menghambat kinerja bakteri. Kemudian konsentrasi substrat hasil *loading mass* dimasukkan kedalam media fermentasi dan disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan inokulasi, yaitu 1-2 ose bakteri *indigenous* ditambahkan kedalam media inokulum untuk dishaker selama 24 jam. Setelah 24 jam, kemudian disentrifugasi selama 20 menit dan diambil pellet lalu dimasukkan kedalam media fermentasi dalam keadaan aseptis.

Setelah media fermentasi berisi sel bakteri dan ditambahkan substrat tepung kulit singkong lalu dihomogenkan menggunakan shaker inkubator dan dilakukan *sampling* pada rentang waktu 24, 48, dan 72 jam, selanjutnya biakan disentrifugasi selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk mengukur kadar glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis ini dengan metode *Mandels*, diukur kadar protein menggunakan metode Lowry.

5. Penentuan Aktivitas Unit Enzim Menggunakan Metode *Mandels*

5.1 Pembuatan pereaksi

Sebanyak 1 gr DNS dan 1 gr NaOH dimasukkan ke labu ukur 100 mL lalu dihomogenkan. Selanjutnya ditambahkan 1 mL Na(K) tartarat 40%, 0,2 g fenol, dan 0,05 g Na₂SO₃ kemudian dilarutkan dengan akuades hingga batas tera.

5.2 Uji Aktivitas Unit Enzim Amilase dan Selulase

Aktivitas enzim diukur berdasarkan konsentrasi glukosa yang terbentuk (Mandels, 1985). Sebanyak 0,2 mL enzim dan 1,8 substrat (1% pati untuk amilase atau 0,5% CMC untuk selulase dan 30 mL *buffer phosphate* pH 5-8) dicampurkan lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37⁰C.

Kemudian ditambahkan 2 mL pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*) dan dididihkan selama 15 menit pada penangas air lalu didinginkan. Setelah dingin, serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada λ 550 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama, namun ekstrak kasar enzim diinaktifkan dengan pereaksi DNS. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan Persamaan 3 berikut ini :

$$AE = \frac{C}{BM \text{ Glukosa} \times t} \times \frac{H}{E} \quad (3)$$

Keterangan :

AE = Aktivitas Enzim (Unit/mL)

C = Konsentrasi Glukosa

BM = Berat Molekul Glukosa (180 g/mL)

E = Volume Enzim (mL)

H = Volume total enzim-substrat (mL)

6. Pembuatan Larutan Standar dan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan larutan standar glukosa dilakukan dengan cara membuat larutan stok standar glukosa dengan konsentrasi 0-100 ppm. Sebanyak 1 gram glukosa ditimbang dan dilarutkan dengan akuades dan ditera sampai 100 mL dalam labu ukur. Kemudian larutan stok tersebut diencerkan hingga konsentrasi 0, 10, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Selanjutnya, diambil sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian 3 mL reagen DNS ditambahkan kedalam tabung reaksi dan dihomogenkan. Larutan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah kecoklatan. Sebanyak 5 mL akuades ditambahkan kedalam larutan dan dihomogenkan. Absorbansi tiap larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 550 nm (Miller, 1959). Setelah diperoleh kurva standar glukosa digunakan untuk mengetahui konsentrasi glukosa (x) dari sampel yang akan diukur absorbansinya.

7. Penentuan Kadar Protein Menggunakan Metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

7.1 Pembuatan pereaksi

- Pereaksi A : 2 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1N
- 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%.
- Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A.

Pereaksi D : reagen *folin ciocelteau* diencerkan dengan akuades dengan perbandingan 1:1.

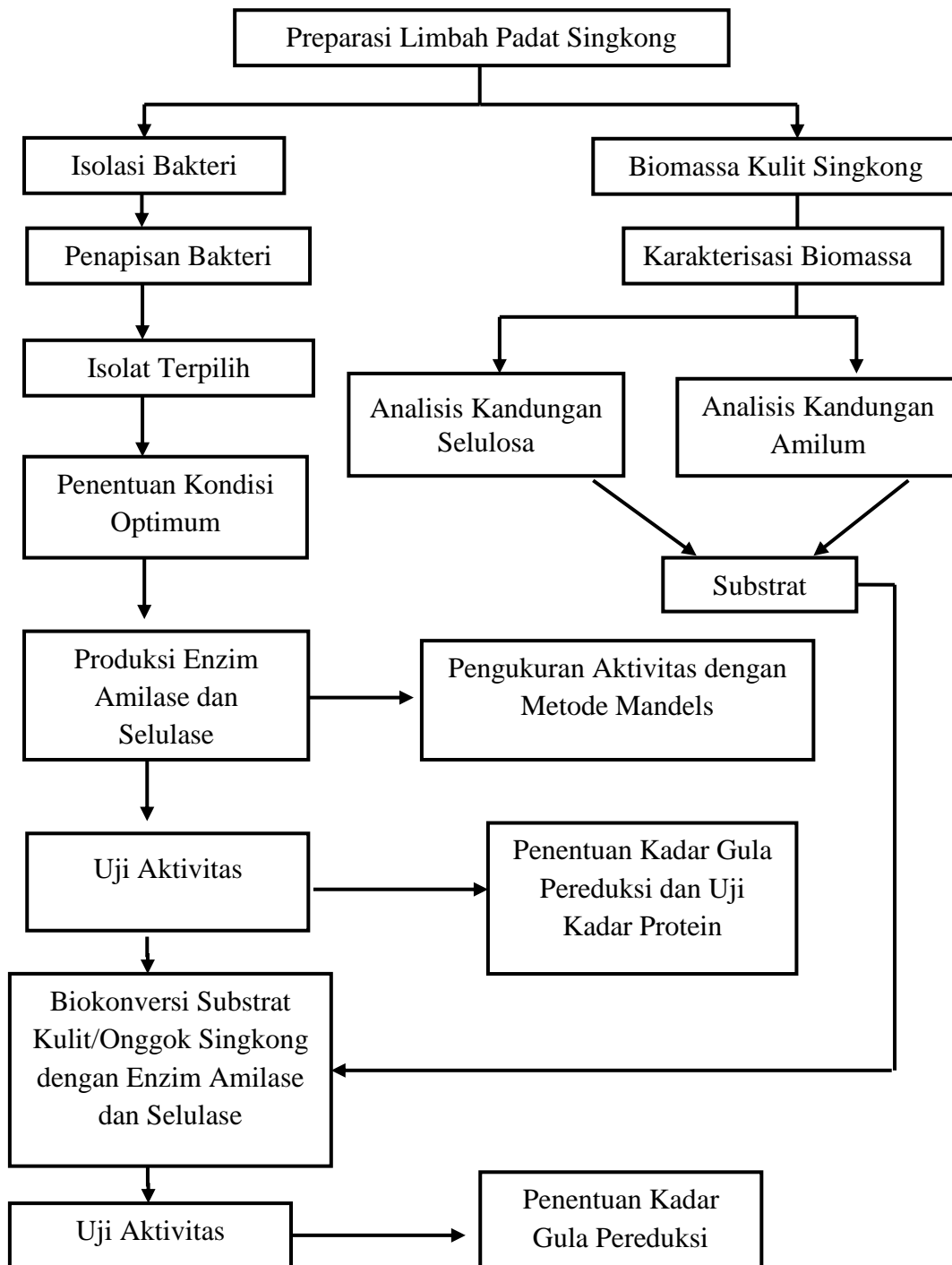
Larutan standar : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

7.2 Penentuan kadar protein enzim

Larutan enzim sebanyak 0,1 mL ditambahkan 0,9 mL air dan 5 mL pereaksi C, lalu dikocok dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, dikocok dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Kemudian serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada λ 750 nm. Untuk kontrol, perlakuannya sama dengan sampel namun 0,1 mL enzim diganti oleh 0,1 mL akuades. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

D. Diagram Alir Penelitian

Langkah-langkah yang akan dilakukan pada penelitian ini memiliki diagram alir pada Gambar 4 sebagai berikut:



Gambar 4. Diagram Alir

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolasi bakteri diperoleh tiga isolat bakteri dengan isolat SCWB-13 memiliki indeks amilolitik tertinggi sebesar 5,33 dan indeks selulolitik tertinggi sebesar 3,4.
2. Kondisi optimum produksi enzim amilase dan selulase dari isolat SCWB-13 yaitu pada pH 7 dan waktu fermentasi 48 jam dengan aktivitas unit enzim amilase tertinggi pada sebesar 20,61 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 53,94 U/mg sedangkan pada enzim selulase memiliki aktivitas unit enzim sebesar 1,60 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 8,19 U/mg.
3. Hidrolisis kulit singkong menggunakan isolat SCWB-13 dalam penelitian ini lebih efektif dilakukan pada media mineral dengan total glukosa yang diperoleh 1556,2 mg sedangkan pada media NB 600,3 mg .
4. *Yield* glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis enzimatik pada pH 7 yaitu 29,8% pada enzim amilase dan 77,8% pada enzim selulase.

B. Saran

Penelitian yang telah dilakukan dapat menghasilkan glukosa dari proses hidrolisis kulit singkong menggunakan isolat SCWB-13 yang diperoleh dari sampel kulit singkong. Namun ada beberapa hal yang masih perlu dioptimalkan pada penelitian ini, antara lain :

1. Menentukan waktu optimum inokulum untuk mengoptimalkan proses hidrolisis.
2. Melakukan produksi enzim pada media fermentasi padat.
3. Mengembangkan potensi lain dari isolat bakteri SCWB-13 untuk menghasilkan enzim pendegradasi lainnya seperti xylanase, ligninase, dan hemiselulase.

DAFTAR PUSTAKA

- Abu, E.A., Ado, S.A., and James, D.B. 2005. Raw starch degrading amilase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. *African Journal of Biotechnology*. **8**: 785-790.
- Ado, S., Lukotun, A., Ameh, B., Yabaya. 2009. Bioconversion of cassava starch to ethanol In a simultaneous saccharification and Fermentation process by co-cultures of *Aspergillus niger* and *saccharomyces cerevisiae*. *Science world journal*. **3**:160-168.
- Badan Pusat Statistik. 2018. Produksi Ubi Kayu Menurut Provinsi (ton) 2012-2017.
- Badger, P.C., 2002. Ethanol from Cellulose: General Review. *Trend in new cropang uses*. ASHS Press. Alexandria.
- Budiarti, S., Harlis, Kapli, H., 2018. Optimasi Pembentukan Gula Cair Dari Limbah Kulit Singkong (*Manihot utilisima Pohl*) Oleh *Bacillus Licheniformis* dalam Usaha Menumbuhkan Jiwa Kewirausahaan. *Journal Biospecies* .**11** :2-4.
- Fessenden, R.J and Fessenden, J.S. 1992. *Kimia Organik Jilid II*. Erlangga. Jakarta.
- Gunawan, D dan Mulyani, S. 2004. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)*. Jilid 1. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Hidayat, I. 2014. Skrining Aktivitas Enzim *Bacillus* sp. yang diisolasi Dari Taman Nasional Gunung Halimun. *Jurnal Mikrobiologi*. **1**:2-8.
- Irawati, T.T. 2016. Karakterisasi pH, Suhu dan Konsentrasi Substrat pada Enzim Selulase yang diproduksi oleh *Bacillus circulans*. *Skripsi*. Malang. Universitas Islam Negeri Malang.
- Lowry, O.H., Rosebrough, A., Farr, A.L. and Randall. 1951. Protein Measurment With The Folin Phenol Reagen. *Journal Biological Chemistry* . **8**:193-205.

- Mandels, M.1985. Applications of Cellulase. *Biochemical Society Transactions*. **13**: 414-416.
- Melisha, Harpeni, Supono. 2016. Produksi Dan Pengujian Aktivitas Amilase *Burkholderia cepacia* Terhadap Substrat Yang Berbeda. *Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. **5**: 12-20.
- Miller, G.L.1959. Use of Dinitrosalicylic Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Journal Chemistry*. **31**:426-428.
- Mojsov, D.K., 2012. Microbial α -Amilases And Their Industrial Applications: A Review. *International Journal of Management, IT and Engineering*. **2**:583-590.
- Monteiro, P., Souza, Oliveira,P., Magalhaes. 2010. Application Of Microbial-Amilase In Industry A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**:850-861.
- Mosier, N.,Wyman,C., Dale, B., Elander, R., Lee,Y.Y., Holtzapple, M., Ladich, M. 2005. Features of Promising Technology for Pretreatment Of Lignocellulose Biomassa. *Bioresource Techol*. **96**:673-686.
- Musita,N. 2018. Kajian Sifat Fisikokimia Tepung Kulit Singkong Industri Besar Dan Industri Kecil. *Skripsi*. Teknologi Agro Industri Universitas Bengkulu.
- Naidu, M.A. and Saranraj, P. 2013. Bacterial Amilase: A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. **2**:274 – 287.
- Naiola,E. 2001. Karakterisasi Amilase dari Isolat Bakteri yang Berasal dari Bali dan Lombok. *Jurnal Biologi Indonesia*. **3**:32-42.
- Nangin, D dan Sutrisno, A. 2015. Enzim Amilase Pemecah Pati Mentah dari Mikroba. *Jurnal Biologi*.
- Nugroho, A., Effendi, E., Novaria,T. 2015. Pengolahan Limbah Padat Tapioka Menjadi Etanol dengan Menggunakan *Aspergillus niger*, *Bacillus licheniformis* dan *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Teknologi Lingkungan*.**7** : 17 – 23.
- Nurmalinda, A., Periadnadi dan Nurmiati. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Bakteri Indigenous Pemfermentasi dari Buah Durian (*Durio zibethinus*) Murr *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. **1**:8-13.

- Octavia, B. 2010. Kajian Kekayaan Bakteri *indigenous* Indonesia untuk Bioremediasi Limbah. *Skripsi*. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta.
- Oryani and Lambui. 2017. Isolation and Production of Cellulase Enzyme from Bacteria Isolatd from Agriculture Field in Distric India. *Applied Science Reseacrh*. **3**:171-174.
- Oyeleke, S.B. and Oduwole, A.A. 2009. Production of Amilase by Bacteria Isolatd from Cassava Waste. *African Journal of Microbiology Reseacrh*. **4**:143-146.
- Perez, J., Dorado, M.J., Rubia, T. and Martinez, J. 2002. Biodegradation and Biological Treatmentof Cellulose, Hemicellulose and Lignin :an overview. *International Journal Microbial*. **5**:53-63.
- Pujiati, Sulistyarsi, A., Ardhi, A., 2017. Analisa Kadar Protein Krude Enzim Selulase Dari Kapang *Rhizopuz stolonifer*. *Jurnal Biota* . **3**:1-3.
- Putri, W. D. R., Haryadi., D. W. Marseno dan M. N. Cahyanto. 2012. Isolation and Characterization of Amylolytic Lactic Acid Bacteria during Growol Fermentation, an Indonesian Traditional Food. *Jurnal Teknologi Pertanian* **13**:52-60.
- Rahmawati, N. 2017. Pembuatan Gula Cair dari Limbah Kulit Singkong Menggunakan Bakteri *Bacillus licheniformis*. *Skripsi*. Jurusan Pendidikan Biologi Universitas Jambi.
- Ratna, A.P D. 2011. Pembuatan Gula Cair Dari Pati Singkong Dengan Menggunakan Hidrolisis Enzimatik. *Tesis*. Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Bandung.
- Ravindran, R., Hassan, S., Williams, G., Jaiswal, A., 2018. A Review on Bioconversion of Agro Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. *Journal Bioengineering*. **5**:93-98.
- Razie, F., Iswandi, A., Sutandi, A., Gunarto, L., dan Sugiyanta. 2011. *Enzyme Cellulase Activity Produced by Microbes Isolatd from Rice Straw Grown on Tidal Swamp Rice Field South Kalimantan*. *Jurnal Tanah Lingkungan*. **2**:43-48.
- Reddy, G., Altaf., Naveena, B.J., Venkateshwar, E., Kumar, V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation A review. *Biotechnology Advances*. **4**:22–34.

- Riyanti. 2010. Pemanfaatan Mikroalga sebagai Bioremediator Limbah Organik dan Limbah Anorganik. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rosyada, N. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Selulolitik pada Saluran Pencernaan Mentok (*Chairina moschata*) . *Skripsi*. Surakarta. Universitas Sebelas Maret.
- Rianingsih, L. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri *Indigenous* dari Fermentasi Pati Singkong. *Tesis*. Ilmu dan Teknologi Pangan Universitas Gajah Mada.
- Risnoyatiningih, S. 2011. Hidrolisis Pati Ubi Jalar Kuning Menjadi Glukosa Secara Enzimatik. *Jurnal Teknik Kimia*. **5**: 2-10.
- Ruiz, M.I., Clara, I., Sanchez., Rodrigo G. Torresa and Daniel R. Molina. 2011. Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch for Production of Bioethanol with a Colombian Wild Yeast Strain. *Journal Brazil Chemistry Soc.* **12**:2337-2343.
- Scheper, A., 2007. *Advances in Biochemical Engineering*. Springer Press. Berlin.
- Sholihati, M., Baharuddin, M., dan Santi. 2015. Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri *Bacillus substilis*. *Jurnal Al Kimia*. **1**: 78-90.
- Shuangqi, T., Zhenyu, W., Ziluan, F.1., Lili, Z.L and Jichang, W. 2011. Determination methods of cellulase activity. *African Journal of Biotechnology* . **37**:7122-7125.
- Sivamani, S., and Baskar, R. 2018. Bioconversion of cassava stem to ethanol oxalic acid pretreatment and co-culture fermentation. *Journal Biorefinery Technology*. **6**:123-128.
- Srichuwong and Jane. 2007. Physicochemical Properties of Starch Affected by Molecular Composition and Structure : review. *Journal Food Science and Biotechnology*. **16**:663-674.
- Suarni and Rauf , P. 2017. Potency Of Mung Bean Sprout As Enzyme Source (A-Amilase). *Journal. Chemistry*. **3**: 332-336.
- Sudarmadji, S., 1984. *Prosedur Analisa untuk analisa bahan pangan dan pertanian, edisi ketiga*. Liberty. Yogyakarta. hal. 55-58.
- Suhaida, A.A., Cheng, G. N., Maizirwan and Hasan, M. 2017. Single-Step Bioconversion of Unhydrolyzed Cassava Starch in the Production of Bioethanol and Its Value-Added Products. *Journal Biotechnology*

Engineering. **2**:187-197.

- Sundarram, A. and Thirupathihalli, P.K.M. 2014. α -Amilase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. **4**:166-175.
- Taherzadeh, M.J. and Karimi, K. 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wasted to Improve Ethanol and Biogas Production. *International Journal of Molecular Sciences*. **9**:1621-1651.
- Theather, RM. And Wood, P.J., 1981. Use Congo Red-polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:777-780.
- Ukwuru, M.U. and Egbonu, S.E. 2013. Recent development in cassava-based products research. *Academia Journal of Food Research*. **1**:001-013.
- Weerachanchai, P., Su, J.L., Chang, M.W., Ching, C.B., Lee, M.J. 2012. Improvement of biomassa properties by pretreatment with ionic liquids for bioconversion process. *Journal Bioresource Technology* . **111**:453–459.
- Yeunyaw, P., Yuwa, A., Thalisa. 2015. Bioconversion of cassava starch to bio-ethanol by cocultures of *Amylomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. **1**:199-210.
- Zhang, M., Xie, L., Yin, Z., Khanal, S.K., Zhou, Q. 2016. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: current status and Opportunities. *Journal Bioresource Technology*. **12**:112-120.