



SKRIPSI - TK 141581

**PRODUKSI GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA
DENGAN MENGGUNAKAN KOMBINASI ENZIM
SELULASE DARI *A.NIGER* DAN *T.REESEI*
TERIMOBILISASI PADA *CHITOSAN MAGNETIC
MICROPARTICLE***

**Disusun oleh :
Lidya Lorenta Sitompul
2315 105 001**

**Irma Nurhanifah Fenda Putri
2315 105 011**

**Dosen Pembimbing :
Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng
NIP. 1966 05 23 1991 02 1001**

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2017**



FINAL PROJECT - TK 141581

**PRODUCTION OF REDUCING SUGAR FROM
COCONUT HUSK USING A COMBINATION OF
CELLULASE ENZYME FROM *A.NIGER* AND *T.REESEI*
IMMOBILIZED ON CHITOSAN MAGNETIC
MICROPARTICLE**

By :

**Lidya Lorenta Sitompul
2315 105 001**

**Irma Nurhanifah Fenda Putri
2315 105 011**

Advisor :

**Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng
NIP. 1966 05 23 1991 02 1001**

**DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA
2017**

LEMBAR PENGESAHAN

PRODUKSI GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA DENGAN MENGGUNAKAN KOMBINASI ENZIM SELULASE DARI *A.NIGER* DAN *T.REESEI* TERIMOBILISASI PADA *CHITOSAN MAGNETIC MICROPARTICLE*

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Departemen Teknik Kimia
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh :

Lidya Lorenta Sitompul

NRP. 2315 105 001

Irma Nurhanifah Fenda Putri

NRP. 2315 105 011

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir :

1. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng.  (Pembimbing I)
2. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng.  (Penguji I)
3. Dr. Ir. Sri Rahmania Juliastuti, M.Eng.  (Penguji II)



Surabaya,

Juli, 2017

**PRODUKSI GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA
DENGAN MENGGUNAKAN KOMBINASI ENZIM
SELULASE DARI *A.NIGER* DAN *T.REESEI*
TERIMOBILISASI PADA *CHITOSAN MAGNETIC
MICROPARTICLE***

**Nama Mahasiswa : 1. Lidya Lorenta Sitompul
NRP. 2315105001
2. Irma Nurhanifah Fenda Putri
NRP. 2315105011**

Departemen : Teknik Kimia, FTI-ITS
Dosen : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng

ABSTRAK

Salah satu limbah biomassa yang melimpah dan belum dimanfaatkan secara optimal di Indonesia adalah sabut kelapa. Kandungan 26,68% selulosa, 17,87% hemiselulosa dan 41,2% lignin di dalam sabut kelapa dapat berpotensi menghasilkan gula reduksi. Produksi gula reduksi dari sabut kelapa menggunakan metode hidrolisa enzimatik karena menghasilkan yield produk lebih besar, selektivitas lebih tinggi, membutuhkan lebih sedikit energy, kondisi operasi yang lebih moderat dan ramah lingkungan. Hidrolisa selulosa secara enzimatik dilakukan dengan enzim selulase yang dihasilkan oleh fungi *A.niger* dan *T.reesei*. Penggunaan kombinasi enzim dari 2 fungi tersebut karena *T.reesei* mempunyai kemampuan memproduksi endo dan eksoglukanase yang kuat sedangkan *A.niger* mempunyai kemampuan memproduksi β -glucosidase yang kuat sehingga gula reduksi yang dihasilkan lebih efisien. Akan tetapi, sifat enzim yang sulit dipisahkan dan harganya yang mahal menjadi hambatan.

Permasalahan tersebut dapat diatasi dengan mengimobilisasi enzim pada material *chitosan* sehingga enzim dapat dipakai berulang kali. *Chitosan* dipilih karena murah, inert,

hidrofilik, dan support yang *biocompatible* tetapi masalah hambatan transfer massa muncul karena *chitosan* dan sabut kelapa sama-sama insoluble. *Chitosan* dan sabut kelapa yang tercampur sulit untuk dipisahkan, sehingga pada penelitian ini digunakan *chitosan* yang dimodifikasi menjadi *chitosan magnetic microparticle* yang dapat berfungsi untuk memudahkan pengambilan *chitosan* dari sabut kelapa.

Variabel pada penelitian ini adalah kombinasi antara enzim dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dengan perbandingan massa dalam gram yaitu 1:2; 2:1; dan 1:1. Variabel lainnya pada penelitian ini yaitu substrat CMC, *microcrystalline*, dan sabut kelapa. Material pendukung yang digunakan sebagai *carrier* adalah *chitosan*, *chitosan-GDA*, *chitosan+magnet*, dan *chitosan-GDA+magnet*.

Kebaharuan pada penelitian ini adalah produksi gula reduksi dari sabut kelapa dengan melakukan kombinasi antara enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* yang diimobilisasi pada *chitosan magnetic microparticle*.

Dari penelitian ini dapat dihasilkan *chitosan* dengan ukuran 815,0 μm – 305,1 μm . Protein terimobilisasi paling banyak terserap yaitu 6 mg, dengan persentase penyerapan enzim mencapai 92,60%. Telah dibuktikan juga bahwa, hidrolisis dengan menggunakan kombinasi enzim *A.niger* dan *T.reesei* yang terimobilisasi pada *chitosan* menghasilkan nilai yang lebih besar dibandingkan dengan hidrolisis tanpa kombinasi. Namun, hidrolisis substrat sabut kelapa dengan menggunakan *carrier chitosan-GDA* tidak memberikan pengaruh yang signifikan pada penambahan konsentrasi gula reduksi, dengan konsentrasi gula reduksi *carrier chitosan* 0,5074 g/L dan pada *carrier chitosan-GDA* 0,4316 g/L. Modifikasi *chitosan* dengan ditambahkan *magnetic microparticle* yang bertujuan untuk pemisahan enzim dengan substrat dapat dilakukan.

Kata kunci: Sabut Kelapa, Imobilisasi Enzim, Hidrolisis, Chitosan, Chitosan Magnetic, A.niger dan T.reesei.

**PRODUCTION OF REDUCING SUGAR FROM
COCONUT HUSK USING A COMBINATION OF
CELLULASE ENZYME FROM *A.NIGER* AND
T.REESEI IMMOBILIZED ON CHITOSAN
MAGNETIC MICROPARTICLE**

Name : 1. Lidya Lorenta Sitompul
NRP. 2315105001
2. Irma Nurhanifah Fenda Putri
NRP. 2315105011

Departement : Chemical Engineering, FTI-ITS

Advisor : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng

ABSTRACT

One of the abundant biomass waste and not used optimally in Indonesia is coconut husk. The content on coconut husk is 26,68% cellulose, 17,87% hemicellulose, and 41,2% lignin can potentially produce reducing sugars. Reducing sugar production from coconut husk using enzymatic hydrolysis method for generating greater product yield, higher selectivity, require less energy, are more moderate operating conditions and environment friendly. Enzymatic hydrolysis of cellulose performed by cellulase enzymes produced by fungi *A.niger* and *T.reesei*. The combined use of two fungal enzymes such as *T. reesei* has the capability of producing endo and eksoglukanase stronger while *A.niger* have the ability to produce β -glucosidasen stronger that reducing sugar can produced more efficiently. However, the nature of the enzyme that is difficult to separate and become an obstacle to its price.

These problems can be overcome by immobilizing the enzyme on *chitosan* material so that the enzyme can be used repeatedly. *Chitosan* chosen because it is cheap, inert, hydrofilik, and support the biocompatible but mass transfer bottleneck

problem arises because *chitosan* and coconut husk equally insoluble. A mixed of *chitosan* and coconut husk are difficult to separate, so in this study used a modified *chitosan* into *chitosan* magnetic microparticle that can serve to facilitate the retrieval of *chitosan* from coconut husk.

The variables in this study were a combination of enzyme from *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* with mass ratio in gram ie 1: 2; 2: 1; And 1: 1. Other variables in this research are CMC substrate, microcrystalline, and coconut husk. Supporting material used as a carrier is chitosan, chitosan-GDA, chitosan + magnet, and chitosan-GDA + magnets.

A new feature in this study is the reduction of sugar production from coconut husk with a combination of cellulase enzymes from *A.niger* and *T.reesei* immobilized on magnetic *chitosan* microparticle.

From this research can be produced chitosan with size 815,0 μm - 305,1 μm . The most immobilized proteins are absorbed ie 6 mg, with the percentage of enzyme absorption reaching 92,60%. It has also been shown that, hydrolysis using a combination of enzyme-derived *A.niger* and *T.reesei* enzymes in chitosan yields greater value than hydrolysis without combination. However, the hydrolysis of the coco fiber substrate by using chitosan-GDA carrier did not give a significant effect on the addition of reducing sugar concentration, with the reducing sugar concentration of chitosan 0,5074 g / L and the chitosan-GDA carrier 0,4316 g / L chitosan modification with added magnetic microparticle which aims to separation enzyme with substrate can be done.

Keyword: Coconut Husk, Immbolized Enzyme, Hydrolysis, Chitosan, Chitosan Magnetic, Combination of *A.Niger* and *T.Reesei*.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami sampaikan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena hanya dengan rahmat dan berkah-Nya sehingga kami dapat menulis dan telah menyelesaikan tugas akhir **“Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa dengan Menggunakan Kombinasi Enzim Selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* Terimobilisasi pada *Chitosan Magnetic Microparticle*”**. Dalam penyusunan skripsi ini, penulis banyak mendapat bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung dari beberapa pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Juwari, ST, M.Eng. PhD, selaku Kepala Departemen S1 Teknik Kimia FTI – ITS.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng selaku Kepala Laboratorium Teknologi Biokimia dan selaku Dosen Pembimbing atas bimbingan dan arahan yang sudah diberikan.
3. Bapak dan Ibu Dosen pengajar dan seluruh karyawan Departemen Teknik Kimia FTI-ITS.
4. Orang tua dan seluruh keluarga yang telah memberikan dukungan, doa dan kasih sayang kepada kami.
5. Teman-teman Laboratorium Teknologi Biokim yang telah memberikan bantuan dan dukungan.
6. Teman-teman Lintas Jalur Ganjil 2015 yang telah memberikan bantuan dalam pembuatan Tugas Akhir ini.
7. Afan Hamzah,ST. dan Maktum Muharja,ST yang telah membantu dan memberikan banyak saran untuk penelitian kami.
8. Pihak-pihak lain yang telah membantu penulis selama menyelesaikan skripsi yang tidak bisa diucapkan satu per satu.

Akhir kata semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk sekarang dan masa yang akan datang. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak terdapat kekurangan,

sehingga saran dan kritik yang membangun dari pembaca sangat diperlukan.

Surabaya, Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	I-1
I.1 Latar Belakang.....	I-1
I.2 Rumusan Masalah.....	I-4
I.3 Tujuan Penelitian	I-4
I.4 Manfaat Penelitian	I-5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	II-1
II.1 Sabut Kelapa.....	II-1
II.2 Lignoselulosa.....	II-1
II.3 Hidrolisa Enzimatik.....	II-3
II.4 <i>Chitosan</i>	II-4
II.5 <i>Chitosan Magnetic Microparticle</i>	II-7
II.6 Imobilisasi	II-8
II.6.1 Metode Adsorpsi.....	II-10
II.6.2 Metode <i>Covalent Attachment</i>	II-10
II.6.3 Metode <i>Entrapment</i>	II-11
II.6.4 Metode <i>Cross-linking</i>	II-13
II.7 Penelitian Terdahulu.....	II-14
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	III-1
III.1 Tempat dan Waktu Penelitian	III-1
III.2 Variabel Penelitian	III-1
III.3 Bahan dan Alat.....	III-1
III.3.1 Bahan Penelitian	III-1
III.3.2 Alat Penelitian.....	III-2
III.4 Pretreatment Sabut Kelapa.....	III-2
III.4.1 <i>Pretreatment</i> mekanik	III-2
III.4.2 <i>Pretreatment</i> Kimia (NaOH 1% w/v). III-2	

III.4.3 Analisa Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin	III-3
III.5 Tahap Persiapan Enzim Selulase Murni dari <i>A.niger</i> dan <i>T.reesei</i>	III-4
III.6 Persiapan Uji Aktivasi Enzim	III-5
III.6.1 Pembuatan Larutan DNS (Asam Dinitrosalisilat)	III-5
III.6.2 Pembuatan Larutan CMC (<i>Carboxymethyl Cellulose</i>)	III-5
III.6.3 Pembuatan Kurva Standar Glukosa untuk Mengukur Keaktifan Enzim Selulase	III-5
III.7 Uji Aktifitas Enzim	III-6
III.7.1 Uji Aktifitas Enzim Selulase Sebelum Koreksi	III-6
III.7.2 Uji Aktifitas Larutan Koreksi Enzim Selulase	III-7
III.8 Modifikasi <i>Chitosan</i> dan Imobilisasi Enzim	III-7
III.8.1 Tahap Pembuatan <i>chitosan</i>	III-7
III.8.2 Persiapan Pengikatan Partikel Magnet pada <i>Chitosan</i>	III-8
III.8.3 Tahap Persiapan <i>Glutaricdialdehyde</i> (GDA)	III-8
III.8.4 Imobilisasi Enzim dengan <i>Chitosan</i>	III-8
III.8.5 Imobilisasi Enzim dengan <i>Chitosan</i> -GDA	III-9
III.9 Uji Analisa Enzim Terimobilisasi	III-9
III.9.1 Persiapan Uji Analisa Enzim Terimobilisasi dengan Metode Bradford	III-9
III.9.2 Prosedur Pembuatan Larutan Standar Protein	III-9
III.9.3 Prosedur Pembuatan Kurva Standar Bradford	III-9
III.9.4 Analisa Enzim Terimobilisasi dengan Metode Bradford	III-10

III.9.5	Prosedur Pembuatan Kurva Standar Glukosa untuk Uji Hasil Hidrolisis	III-10
III.10	Proses Hidrolisis	III-10
III.10.1	Prosedur Hidrolisis Substrat CMC ...	III-10
III.10.2	Prosedur Hidrolisis Substrat <i>Microcrystalline</i>	III-11
III.10.3	Prosedur Hidrolisis Substrat Sabut Kelapa.....	III-11
III.10.4	Analisa Kadar Glukosa dengan Metode DNS.....	III-12
III.11	Jadwal Penelitian.....	III-13
BAB IV	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN ..	IV-1
IV. 1	<i>Pretreatment</i> Sabut Kelapa.....	IV-1
IV.1.1	Perbandingan Komposisi Kimia Sabut Kelapa Sebelum dan Setelah <i>Pretreatment</i> Kimiawi.....	IV-3
IV.2	Tahap Pengujian Aktivitas dan Kadar Protein Enzim	IV-4
IV.3	Preparasi <i>carrier chitosan</i> dan pengujian <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM)	IV-9
IV.4	Imobilisasi Enzim	IV-12
IV.4.1	Imobilisasi Enzim dengan <i>Chitosan</i>	IV-12
IV.4.2	Imobilisasi Enzim dengan <i>Chitosan-GDA</i>	IV-16
IV.5	Hidrolisis.....	IV-20
IV.5.1	Hidrolisis CMC	IV-21
IV.5.2	Hidrolisis Substrat <i>Microcrystalline</i> dan Sabut Kelapa.....	IV-25
IV.5.2.1	Hidrolisis Substrat <i>Microcrystalline</i>	IV-25
IV.5.2.2	Hidrolisis Substrat Sabut Kelapa.....	IV-26
IV.5.2.3	Pemisahan Enzim dengan Substrat Sabut Kelapa	IV-32

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	V-1
V.1 Kesimpulan	V-1
V.2 Saran	V-2
DAFTAR PUSTAKA.....	xiv
APPENDIKS	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumus Struktur Selulosa	II-2
Gambar 2.2	Rumus Struktur Hemiselulosa	II-2
Gambar 2.3	Degradasi Selulosa oleh Sistem Enzim Selulase	II-4
Gambar 2.4	Struktur Kitin dan <i>Chitosan</i>	II-5
Gambar 2.5	Penghilangan gugus asetil pada gugus asetamida	II-6
Gambar 2.6	(a) Mekanisme Reaksi Antara <i>Chitosan</i> dan Selulase (b) Mekanisme Reaksi antara <i>Chitosan</i> dengan GDA dan <i>Chitosan</i> -GDA dengan Selulase	II-7
Gambar 2.7	Metode Imobilisasi Enzim	II-9
Gambar 2.8.	Imobilisasi Enzim dengan Metode Adsorpsi.....	II-10
Gambar 2.9	Imobilisasi Enzim dengan Metode Pengikatan Kovalen.....	II-11
Gambar 2.10	Imobilisasi Enzim dengan Metode Penjebakan dan Mikroenkapsul.....	II-13
Gambar 2.11	Imobilisasi Enzim dengan Metode <i>Cross-linking</i>	II-13
Gambar 3.1	Rangkaian Alat	III-3
Gambar 3.2	Proses Pembuatan Kurva Standar Glukosa.	III-6
Gambar 3.3	Rangkaian Alat Hidrolisis Sabut Kelapa	III-12
Gambar 4.1	Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) Untuk Menguji Aktivitas Enzim Selulase ..	IV-5
Gambar 4.2	Kurva Standar Protein Untuk Menguji Kadar Protein dalam Enzim Selulase.....	IV-8
Gambar 4.3	Mekanisme Reaksi Antara <i>Chitosan</i> dan Selulase	IV-13
Gambar 4.4	Prosedur Imobilisasi dengan <i>Carrier</i> <i>Chitosan</i>	IV-14
Gambar 4.5	Mekanisme Reaksi antara <i>Chitosan</i> dengan GDA dan <i>Chitosan</i> -GDA dengan	

	Selulase.....	IV-17
Gambar 4.6	Prosedur Imobilisasi dengan <i>Carrier</i> <i>Chitosan</i> -GDA.....	IV-18
Gambar 4.7	Kurva Standar Glukosa tanpa CMC	IV-21
Gambar 4.8	Prosedur Uji Glukosa Hasil Hidrolisis dengan Substrat CMC.....	IV-22
Gambar 4.9	Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Hidrolisa Substrat <i>Microcrystalline</i> dengan <i>Carrier</i> <i>Chitosan</i> dan <i>Carrier Chitosan</i> -GDA	IV-26
Gambar 4.10	Metodologi Hidrolisis Substrat Sabut Kelapa	IV-28
Gambar 4.11	Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Hidrolisa Substrat Sabut Kelapa dengan <i>Carrier</i> <i>Chitosan</i> dan <i>Carrier Chitosan</i> -GDA	IV-29
Gambar 4.12	Kurva Perbandingan Konsentrasi Gula Reduksi pada <i>Carrier Chitosan Magnetic</i> dan <i>chitosan</i> -GDA <i>magnetic</i>	IV-31
Gambar 4.13	Metodologi Pemisahan Enzim dengan Substrat Sabut Kelapa.....	IV-33

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Komposisi Sabut Kelapa Tanpa <i>Pretreatment</i> Kimiawi	IV-2
Tabel 4.2	Persentase Komposisi Hemiselulosa, Selulosa, dan Lignin Sebelum dan Setelah <i>Pretreatment</i> Kimiawi	IV-3
Tabel 4.3	Perhitungan Kurva Standar Glukosa dengan CMC	IV-5
Tabel 4.4	Aktivitas Enzim Selulase dari <i>A.niger</i> dan <i>T.reesei</i>	IV-6
Tabel 4.5	Perhitungan Kurva Standar Protein.....	IV-8
Tabel 4.6	Data Total Protein dalam Enzim Selulase yang Digunakan Setelah Dilakukan Uji Bradford	IV-9
Tabel 4.7	Hasil SEM <i>chitosan</i>	IV-11
Tabel 4.8	Hasil Uji Kadar Protein Enzim Selulase dari <i>T.reesei</i> yang Terimobilisasi pada <i>Chitosan</i> dengan Metode Bradford	IV-15
Tabel 4.9	Perhitungan Bradford Enzim Selulase dari <i>A.niger</i> dan <i>T.reesei</i> yang Terimobilisasi pada <i>Chitosan</i> -GDA	IV-19
Tabel 4.10	Perhitungan Kurva Standar Glukosa untuk Hidrolisis tanpa CMC	IV-20
Tabel 4.11	Hasil Uji Kadar Gula dengan Variabel Kombinasi Massa Imobilisasi <i>Chitosan</i> dan Enzim Selulase dari <i>A.niger</i> dan <i>T.reesei</i>	IV-23
Tabel 4.12	Perbandingan Hasil Uji Gula Reduksi dengan Substrat CMC pada <i>Carrier Chitosan Carrier</i> dan <i>Chitosan</i> -GDA	IV-25

Halaman Ini Sengaja Dikosongkan

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Salah satu biomassa yang berpotensi adalah buah kelapa. Produksi buah kelapa di Indonesia pada tahun 2015 yakni 3.025.011 ton/tahun (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2015). Selulosa, hemiselulosa, dan lignin merupakan komponen utama dari dinding sel tumbuhan. Sabut kelapa terdiri dari 26,68% selulosa, 17,87% hemiselulosa dan 41,2% lignin (Sangian *et al.*, 2015). Kandungan selulosa dan hemiselulosa yang tinggi dapat diolah menjadi gula reduksi.

Selulosa merupakan polimer 1-4- β -D glukosa, sehingga jika rantai dari polimer tersebut dipotong-potong maka akan dihasilkan glukosa. Pemotongan rantai polimer dapat dilakukan secara kimia maupun enzimatik (Sukardarti *et al.*, 2010). Dari kedua metode tersebut, hidrolisis enzimatik mempunyai banyak keunggulan yaitu menghasilkan yield produk lebih besar, selektivitas lebih tinggi, membutuhkan lebih sedikit energi, kondisi operasi yang lebih moderat dan ramah lingkungan (Yang *et al.*, 2011). Hidrolisis selulosa secara enzimatik dapat dilakukan dengan enzim selulase yang dihasilkan oleh fungi, bakteri, dan rumansia. Contoh jenis fungi yang bisa digunakan adalah *A.niger* dan *T.reesei*. *T.reesei* mampu memproduksi selulase dengan komposisi 60–80% ekso-1,4- β -D-glucanase, 20–36 % endo-1,4- β -D-glucanases dan 1% 1,4- β -D-glucosidases (Ahamed dan Vermette, 2008). Jumlah 1,4- β -D-glucosidases tersebut lebih rendah dari yang diperlukan untuk memecah selobiosa menjadi gula reduksi secara efisien. Akibatnya produk utama hidrolisisnya adalah selobiosa (Juhasz *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2008; Ahamed dan Vermette, 2008). Selobiosa merupakan inhibitor kuat terhadap aktivitas ekso dan endoglukanase sehingga dapat menurunkan laju hidrolisis secara signifikan. Efek inhibisi selobiosa dapat dikurangi dengan cara menambahkan β -glucosidase dari luar atau memproduksi selulase dengan cara

mengkombinasikan mikroorganismenya yang kemampuan memproduksi endo dan eksoglukanasenya kuat seperti *T.reesei* dengan mikroorganismenya yang kemampuan memproduksi β -glucosidasenya kuat seperti *A.niger* (Ahamed dan Vermette, 2008). Penelitian yang pernah dilakukan Anwar *et al.*, 2011, pembuatan gula reduksi dengan menggunakan enzim dari *A.niger* dan *T.reesei* terbukti dapat digunakan untuk menghasilkan gula reduksi yang optimal. *A.niger* telah digunakan untuk menghasilkan glucosidasenya dan endoglukanasenya (Ahamed dan Vermette, 2008).

Pembuatan gula reduksi dengan menggunakan hidrolisis enzimatik memiliki kekurangan yaitu harga enzim yang mahal dan enzim yang larut dalam air sehingga sulit dipisahkan agar bisa digunakan kembali, salah satu solusi terhadap masalah tersebut adalah dengan teknik imobilisasi enzim. Imobilisasi enzim merupakan teknik untuk mengikat enzim, baik melalui pengikatan pada padatan pendukung maupun penjebakan pada matriks. Terdapat dua metode dalam imobilisasi enzim yaitu metode fisik dan metode kimia. Metode fisik dapat dibagi lagi menjadi metode adsorpsi dan metode *entrapment*. Metode kimia dapat dibagi menjadi menjadi metode *covalent attachment* dan *cross-linking*. Dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, didapatkan bahwa kombinasi metode *covalent attachment* dengan *cross-linking* menggunakan *glutaricdialdehyde* (GDA) menghasilkan kestabilan dan *retained activity* yang lebih tinggi (Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010).

Material pendukung imobilisasi pada penelitian ini adalah *chitosan*. *Chitosan* merupakan limbah padatan dari hewan bercangkang di laut yang berjumlah besar dan dapat digunakan sebagai material pendukung alami dalam imobilisasi enzim. Pada penelitian Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010, *chitosan* digunakan untuk mengimobilisasi α -amylase and β -amylase. Pemilihan matriks *chitosan* karena murah, inert, hidrofilik, dan *support* yang *biocompatible* (Kumar, 2000; Yazdani-Pedram *et al.*, 2000) serta adanya gugus amino yang memudahkan terjadinya ikatan

kovalen sehingga cocok untuk imobilisasi (Çetinus dan Öztop, 2003). Penggunaan *chitosan* sebagai material pendukung dan sabut kelapa sebagai substrat yang keduanya berupa padatan menjadikan kesulitan pada saat memisahkan hasil gula reduksi, substrat dan enzim terimobilisasi setelah proses hidrolisis, sehingga pada penelitian ini digunakan *chitosan* yang dimodifikasi menjadi *chitosan magnetic microparticle* yang dapat berfungsi untuk memudahkan pengambilan *chitosan* dari sabut kelapa (Pospikova dan Safarik, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh kombinasi enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* yang diimobilisasi pada *chitosan magnetic microparticle* untuk menghasilkan gula reduksi dari sabut kelapa.

I.2 Rumusan Masalah

1. Pemanfaatan limbah pertanian berupa biomassa seperti sabut kelapa, yang belum dimanfaatkan secara optimal padahal pada sabut kelapa terdapat kandungan selulosa dan hemiselulosa tinggi yang dapat diolah menjadi gula reduksi.
2. Pada hidrolisis enzimatis penggunaan enzim selulase hanya dari satu sumber tidak bisa menghasilkan gula reduksi yang optimum, sehingga dilakukan kombinasi antara enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* dengan perbandingan tertentu.
3. Pada hidrolisis enzimatis digunakan enzim murni yang harganya mahal sehingga dibutuhkan imobilisasi enzim untuk menghemat biaya karena dengan teknik ini enzim dapat digunakan kembali.
4. Metode imobilisasi enzim dengan cara fisika memiliki kelemahan karena ikatannya lemah, untuk itu perlu dilakukan metode kimia, *covalent attachment* dengan kombinasi *cross-linking* sehingga memberikan ikatan yang lebih kuat dan daya katalis yang lebih baik.
5. Bahan padatan material pendukung dan substrat yang tercampur sulit untuk dipisahkan, sehingga pada penelitian ini digunakan *chitosan* yang dimodifikasi menjadi *chitosan magnetic microparticle* yang dapat berfungsi untuk memudahkan pengambilan *chitosan* dari sabut kelapa.

I.3 Tujuan Penelitian

1. Memanfaatkan limbah sabut kelapa (lignoselulosa) menjadi gula reduksi dengan metode hidrolisis enzim menggunakan enzim selulase terimobilisasi.
2. Mendapatkan hasil optimal kombinasi antara enzim selulase yang terimobilisasi dari *A.niger* dan *T.reesei* untuk menghasilkan gula reduksi dari *Carboxymethyl Cellulose* (CMC), sebagai substrat yang larut dalam air dan sabut kelapa sebagai substrat yang tidak larut dalam air.

3. Mempelajari efektifitas pemisahan secara magnetik untuk menghasilkan proses hidrolisis enzimatik yang optimal.

I.4 Manfaat Penelitian

1. Mengurangi biaya produksi dengan metode imobilisasi enzim karena enzim yang telah digunakan dapat digunakan kembali.
2. Penggunaan kombinasi antara enzim selulase yang terimobilisasi dari *A.niger* dan *T.reesei* dalam menghasilkan enzim selulase agar mendapatkan hasil yang lebih besar sehingga gula reduksi yang dihasilkan akan lebih banyak.
3. Mengetahui efektifitas pemisahan secara magnetik untuk menghasilkan proses hidrolisis enzimatik yang optimal.

Halaman Ini Sengaja Dikosongkan

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Sabut Kelapa

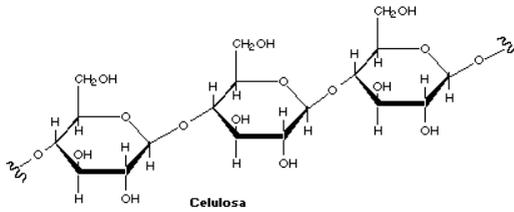
Sabut kelapa merupakan bagian terbesar dari buah kelapa. Serat sabut dikenal juga *coco fiber*, *coir fiber*, *coir yarn*, dan *rugs*. Sabut kelapa terdiri dari dua bagian, yaitu bagian dalam dan bagian luar. Bagian luar disebut *epikarp* dan bersifat tahan air. Bagian dalam sabut kelapa disebut *mesokarp* (Sukardati *et al.*, 2010).

Salah satu pemanfaatan sabut kelapa sebagai bahan baku produksi glukosa melalui proses hidrolisis, karena mengandung bahan lignoselulosa. Sabut kelapa merupakan salah satu biomassa yang mudah didapatkan dan merupakan hasil samping pertanian. Komposisi sabut kelapa dalam buah kelapa sekitar 35% dari berat keseluruhan buah kelapa. Satu buah kelapa dapat diperoleh rata-rata 0,4 kg sabut yang mengandung 30% serat (Oktavia, 2015). Kandungan dari sabut kelapa terdiri dari 26,68% selulosa, 17,87% hemiselulosa dan 41,2% lignin (Sangian *et al.*, 2015).

II.2 Lignoselulosa

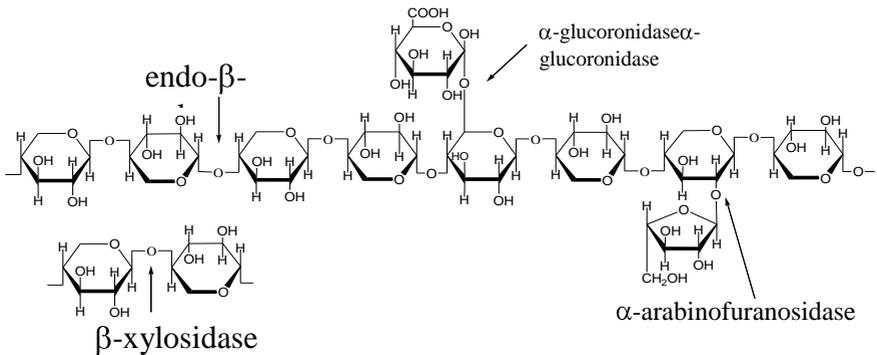
Lignoselulosa merupakan rantai lurus dari 1-4-β-D-glukosa dan merupakan komponen terbesar pada dinding sel tanaman. Lignoselulosa terdiri dari tiga polimer yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Tiga polimer ini dapat digunakan untuk menghasilkan produk seperti gula, bahan bakar, dan bahan kimia.

Selulosa bersifat tidak larut dalam air, asam, maupun basa pada suhu kamar. Struktur selulosa terdiri dari 60-70 % kristalin dan 30-40% *amorphous*, sehingga tidak mudah terhidrolisis. Rumus struktur selulosa disajikan pada gambar 2.1



Gambar 2.1 Rumus Struktur Selulosa

Hemiselulosa merupakan heteropolimer yang berisi 200 monomer gula. Hemiselulosa bersama-sama dengan selulosa pada dinding sel, dan keduanya diikat oleh pektin. Struktur terbesarnya adalah *amorphous* dan sebagian kecil berupa kristalin. Hemiselulosa mengandung beberapa monomer gula, yaitu xylose, mannose, galaktosa, rhamnosa, arabinose, dan glukosa. Xylose merupakan gula yang paling banyak terkandung dalam hemiselulosa. Rumus struktur hemiselulosa disajikan pada gambar 2.2



Gambar 2.2 Rumus Struktur Hemiselulosa

Lignin merupakan polimer kompleks dari fenil propana. Dibandingkan dengan selulosa atau hemiselulosa pemecahan lignin sangat lambat oleh jamur dan bakteri. Lignin dapat

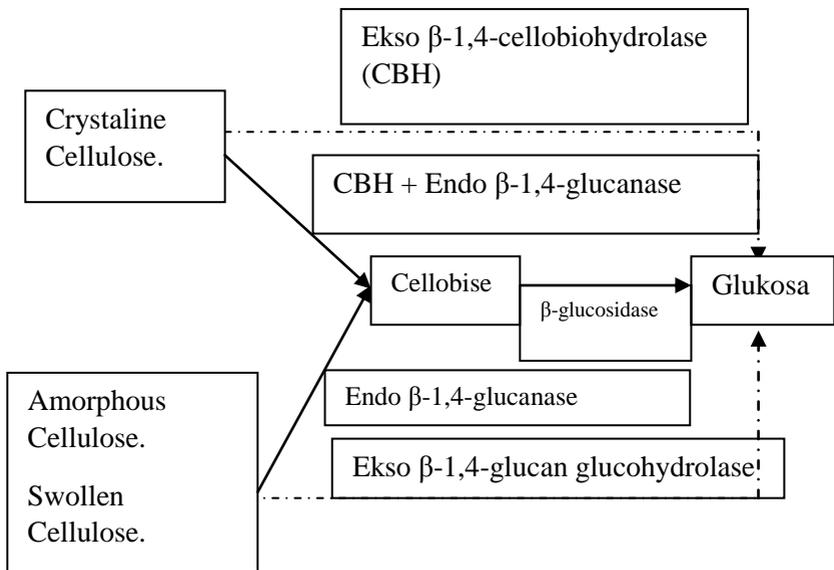
didegradasi oleh asam, basa, maupun enzim lignolitik. Enzim yang dapat mendegradasi lignin adalah *mangan peroxide*, *lignin peroxide*, dan *cellobiose dehydrogenase* (Sukardati *et al.*, 2010).

II.3 Hidrolisis Enzimatik

Lignoselulosa dapat didegradasi oleh enzim selulase menjadi glukosa dan xylose. Enzim selulase dapat diproduksi oleh fungi *T. reesei* dan *A. niger*. Hidrolisis enzimatik pada lignoselulosa oleh enzim selulase dari jamur dapat digunakan sebagai alternatif yang layak untuk memproduksi gula reduksi. Hidrolisis enzimatik yang sempurna memerlukan aksi sinergis dari tiga tipe enzim ini, yaitu :

1. *Endo-1,4- β -D-glucanase* (*endoselulase*, CMC), yang mengurai polimer selulosa secara random pada ikatan internal α -1,4-glikosida untuk menghasilkan oligodekstrin dengan panjang rantai yang bervariasi.
2. *Exo-1,4- β -D-glucanase* (*cellobiohydrolase*), yang mengurai selulosa dari ujung pereduksi dan non pereduksi untuk menghasilkan selobiosa dan/atau glukosa.
3. *β -glucosidase* (*cellobiase*), yang mengurai selobiosa untuk menghasilkan glukosa.

(Ikram *et al.*, 2005).



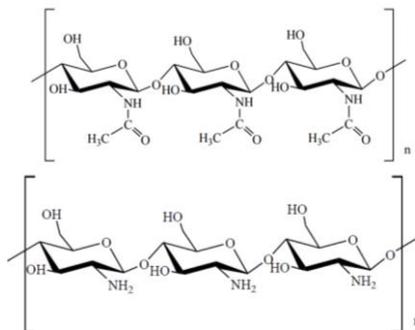
Gambar 2.3 Degradasi Selulosa oleh Sistem Enzim Selulase

Selulase adalah campuran beberapa enzim yang komposisinya bervariasi, dan tergantung kepada mikroorganisme yang digunakan untuk memproduksi serta prosesnya. Endoglukanase (endo- β -1,4-D-glukan-4-glukanohidrolase) bertugas memecah ikatan β -1,4-glukanohidrolase pada rantai selulosa secara acak, eksoglukanase (β -1,4-D-glukanselobiohidrolase) yang bertugas memecah satuan selobiosa dari ujung rantai dan β -glukosidase yang bertugas memecah selobiosa menjadi glukosa (Dahot dan Noomrio, 1996).

II.4 Chitosan

Chitosan, poly (1-4)-2-amino-2-deoxy-beta-D-glucose merupakan hasil deasetilasi dari kitin yang mengandung 1 gugus amino bebas dalam setiap unit glukosanya. Proses deasetilasi kitin menjadi *chitosan* berlangsung tidak cukup sempurna. Kitin

ini umumnya diperoleh dari kerangka hewan invertebrata dari kelompok *Arthropoda sp*, *Molusca sp*, *Coelenterata sp*, *Annelida sp*, *Nematoda sp*, dan beberapa dari kelompok jamur. Selain dari kerangka hewan invertebrata, juga banyak ditemukan pada bagian insang ikan, *trachea*, dinding usus dan pada kulit cumi-cumi. Sebagai sumber utamanya ialah hasil deasitilasi cangkang *Crustaceae sp*, yaitu udang, lobster, kepiting, dan hewan yang bercangkang lainnya, terutama asal laut (Blackburn, 2005). Perbedaan struktur *chitosan* dan kitin ditunjukkan pada gambar 2.4



Gambar 2.4 Struktur Kitin dan *Chitosan*

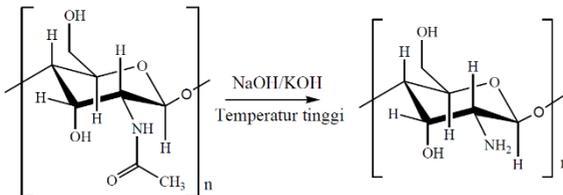
Chitosan merupakan produk biologis yang bersifat kationik, nontoksik, biodegradable dan biokompatibel. *Chitosan* memiliki gugus amino (NH_2) yang relatif lebih banyak dibandingkan kitin sehingga lebih nukleofilik dan bersifat basa. Kristalinitas *chitosan* yang disebabkan oleh ikatan hidrogen intermolekuler maupun intramolekuler lebih rendah dibandingkan kitin sehingga lebih mudah diaplikasikan dalam beberapa reagen. Pelarut yang baik untuk *chitosan* adalah asam format, asam asetat dan asam glutamate. *Chitosan* tidak larut dalam air dan beberapa pelarut organik seperti dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), pelarut alkohol organik dan piridin. *Chitosan* larut dalam asam organik/mineral encer melalui protonasi gugus amino bebas (NH_2NH_3^+) pada pH kurang dari 6,5

(Pospikova dan Safarik,2013). Kelarutan *chitosan* menurun dengan bertambahnya berat molekul *chitosan*. Parameter lain yang berpengaruh pada sifat *chitosan* adalah berat molekul (BM) dan derajat deasetilasi (DD). Derajat deasetilasi menunjukkan berkurangnya gugus asetil dari kitin menjadi gugus amino pada *chitosan* (Blackburn, 2005).

Chitosan memiliki sifat unik yang dapat digunakan dalam berbagai cara serta memiliki kegunaan yang beragam, antara lain sebagai perekat, bahan aditif pada kertas dan tekstil, penjernihan air minum, dan untuk mempercepat penyembuhan luka, serta memperbaiki sifat pengikatan warna. *Chitosan* merupakan pengkelat yang kuat untuk ion logam transisi. *Chitosan* mempunyai kemampuan untuk mengadsorpsi logam dan membentuk kompleks *chitosan* dengan logam (Roberts, 1992).

Chitosan juga bersifat hidrofilik, sehingga mampu menahan air dalam strukturnya dan membentuk gel secara spontan. Pembentukan gel berlangsung pada pH asam atau sedikit basa yang disebabkan adanya sifat kationik *chitosan*. Gel *chitosan* selanjutnya dapat terdegradasi secara berangsur-angsur, sebagaimana halnya *chitosan* melarut (Muzzarelli, 2009)

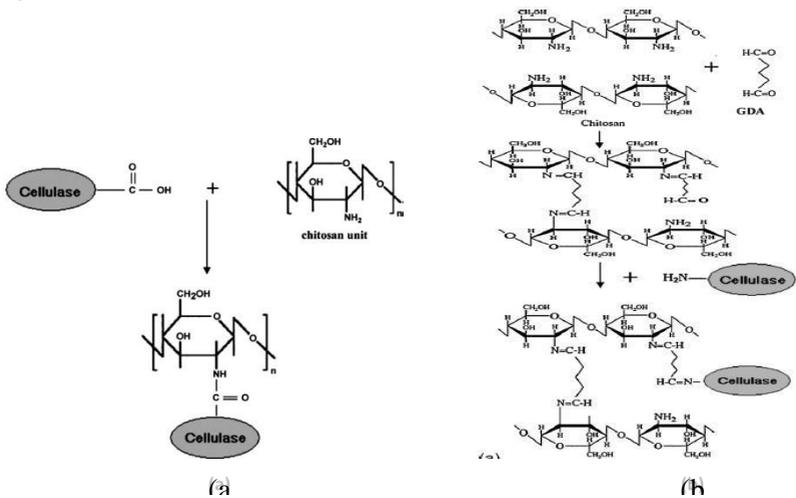
Proses penghilangan gugus asetil dinamakan deasetilasi. Proses deasetilasi bertujuan untuk memutuskan ikatan kovalen antara gugus asetil dengan nitrogen pada gugus asetamida kitin sehingga berubah menjadi gugus amina ($-NH_2$). Dengan demikian pelepasan gugus asetil pada asetamida kitin menghasilkan gugus amina terdeasetilasi (Azhar *et al.*, 2010). Mekanisme penghilangan gugus asetil pada gugus asetmida oleh suatu basa ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Penghilangan gugus asetil pada gugus asetamida

Khan *et al.*,2002 menyatakan bahwa kitin dengan DD 75% atau lebih umumnya dikenal sebagai *chitosan*. Derajat deasetilasi adalah salah satu karakteristik kimia yang paling penting karena DD mempengaruhi *performance chitosan*.

Chitosan sangat cocok untuk menjadi material pendukung imobilisasi enzim selulase. Gambar 2.6 menggambarkan ikatan yang terbentuk antara enzim selulase dengan *chitosan* atau *chitosan*-GDA.



Gambar 2.6 (a) Mekanisme Reaksi antara *Chitosan* dan Selulase
 (b) Mekanisme Reaksi antara *Chitosan* dengan GDA dan *Chitosan*-GDA dengan Selulase (Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010)

II.5 *Chitosan Magnetic Microparticle*

Magnetic carrier dapat diproduksi dengan menggunakan bahan anorganik atau polimer. Ketahanan mekanik yang tinggi, stabilitas termal, ketahanan terhadap pelarut dan serangan mikroba, kemudahan pembuatan dan umur simpan yang sangat

baik membuat bahan anorganik mendukung sebagai *magnetic carrier* yang ideal, tetapi bahan anorganik batas ikatan pada kelompok fungsional. Untuk mengatasi masalah ini, *magnetic carrier* dibuat dari polimer, karena polimer memiliki permukaan kelompok fungsional lebih besar sehingga dapat disesuaikan untuk aplikasi tertentu. Dalam literatur, berbagai jenis polimer alami dan sintetis (misalnya kalsium alginat, polystyrene, poliakrilamida, polivinil alkohol, nitroselulosa, polivinil butiral) telah digunakan dalam penyusunan *magnetic carrier*.

Chitosan dapat digunakan sebagai material dasar untuk *magnetic carrier*. *Chitosan magnetic microparticle* dapat dibuat dengan cara *cross-linking* dan GDA sebagai *cross-linker* yang memiliki medan magnet sebesar 8-12 kG sehingga *chitosan magnetic microparticle* dapat digunakan sebagai *magnetic support* dalam teknologi *magnetic carrier* (Denkbas *et al.*, 2002). Penelitian yang telah dilakukan oleh Pospikova dan Safarik, 2013, *chitosan* dimodifikasi dengan menggunakan *magnetic microparticle* dengan metode *entrapment* pada *chitosan* gel untuk imobilisasi enzim dan β -galactosidase. Penelitian lain yang dilakukan oleh Zheng *et al.*, 2013, modifikasi *chitosan magnetic microparticle* dilakukan dengan metode absorpsi untuk imobilisasi β -glucosidase.

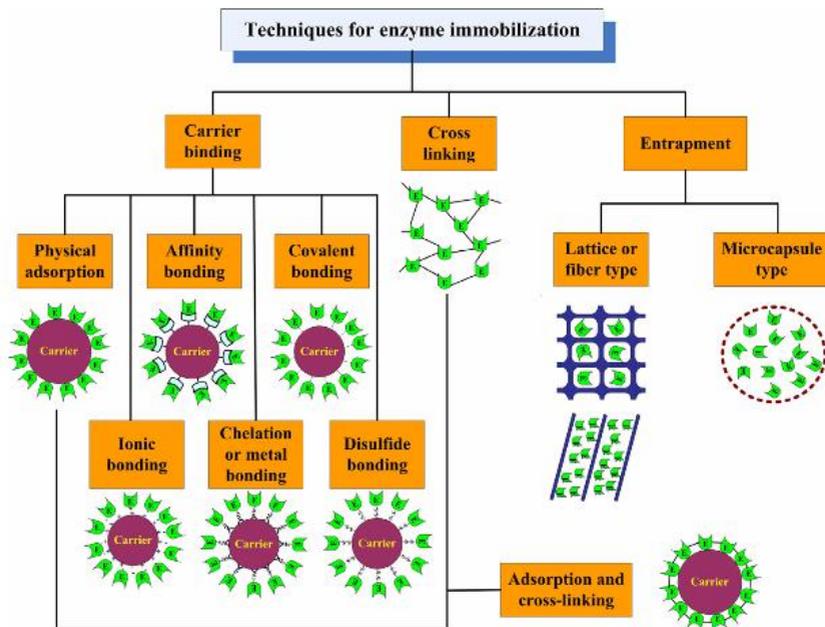
II.6 Imobilisasi

Imobilisasi enzim adalah enzim yang secara fisik dibatasi gerakannya atau ditempatkan pada ruang yang telah ditentukan untuk mempertahankan katalitiknya dan dapat digunakan secara berulang-ulang (Brena dan Vierra, 2013).

Imobilisasi enzim memiliki keuntungan didalam penggunaannya. Keuntungan penggunaan enzim yang telah diimobilisasi ini diantaranya adalah :

1. Sistem enzim yang telah diimobilisasi dapat digunakan berulang-ulang
2. Memungkinkan proses pengoperasian secara berkesinambungan

3. Dapat meminimalkan terjadinya pencampuran antara hasil reaksi dengan residu
4. Memudahkan pengendalian kondisi reaksi
5. Dapat menyebabkan penurunan aktivitas katalitik enzim untuk beberapa kasus.



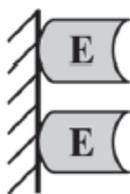
Gambar 2.7 Metode Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim selulase telah dilakukan pada berbagai metode. Metode imobilisasi enzim ada tiga jenis, yaitu *carrier-binding*, pengikatan silang (*cross-linking*), dan *entrapment*, seperti yang ditunjukkan Gambar 2.7.

II.6.1 Metode Adsorpsi

Metode adsorpsi banyak digunakan pada imobilisasi enzim selulase karena dibandingkan dengan teknik imobilisasi lainnya, teknik imobilisasi adsorpsi memiliki beberapa keuntungan seperti, kondisi yang ramah dan pengoperasiannya mudah, harga matriks yang relatif murah dan prosedur imobilisasi yang cukup mudah, dan tidak membutuhkan tambahan bahan kimia.

Secara prinsip enzim diserap melalui gaya yang tidak spesifik seperti gaya Van Der Waals, ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Matriks yang sering digunakan pada teknik imobilisasi ini adalah karbon aktif, selite, resin hidrofilik, poliakrilik, silika, zeolit. Jenis-jenis polimer ini murah dan mudah didapat. Interaksi hidrofobik enzim yang kuat dapat diperoleh dengan menggunakan penyangga atau enzim yang hidrofobik selama adanya interaksi elektrostatik yang kuat dengan menggunakan *support* yang tepat tetapi teknik ini memiliki beberapa kelemahan, yaitu, ikatan imobilisasinya lemah, keadaan imobilisasinya sangat sensitif pada pH larutan dan suhu, serta jumlah enzim yang terimobilisasi pada material pendukung sangat kecil (Zhao *et al.*, 2015).



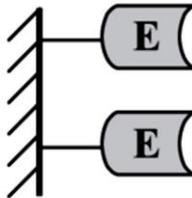
Gambar 2.8 Imobilisasi Enzim dengan Metode Adsorpsi

II.6.2 Metode *Covalent Attachment*

Metode kimia *covalent attachment* adalah metode imobilisasi yang paling sering digunakan karena ikatan yang

dibuat antara enzim dan material pendukung lebih kuat daripada yang diperoleh dari metode fisika (Panzavolta *et al.*, 2005).

Metode *covalent attachment* mudah dilakukan, tetapi interaksi antara enzim dan *carrier* jauh lebih kuat dibanding metode adsorpsi. Perbandingan fisik dengan metode ikatan kovalen, ikatan ion dapat dilakukan dalam kondisi jauh lebih ringan. Oleh karena itu, metode pengikatan ion menyebabkan perubahan kecil dalam konformasi dan situs aktif dari enzim, mempertahankan aktivitas enzim di sebagian kasus. Akan tetapi, kekuatan pengikatan ion antara enzim dan *carrier* kurang kuat dibandingkan pengikatan kovalen, dan kebocoran enzim dari *carrier* dapat terjadi dalam solusi substrat dari kekuatan ion tinggi atau pada variasi pH. Teknik imobilisasi ini didasarkan pada reaksi antara sisi aktif asam amino pada enzim ke arah sisi aktif dari matriks. Senyawa enzim yang biasa menggunakan teknik ini adalah thiol dan amine. Beberapa matriks yang biasa menggunakan teknik imobilisasi ini adalah polyurethane foam, *chitosan*, silika gel, *olive pomace* dan epoxy-SiO₂-PVA. Keuntungan lain dari teknik imobilisasi ini adalah tahan pada kondisi suhu dan pH yang ekstrim (Zhao *et al.*, 2015).

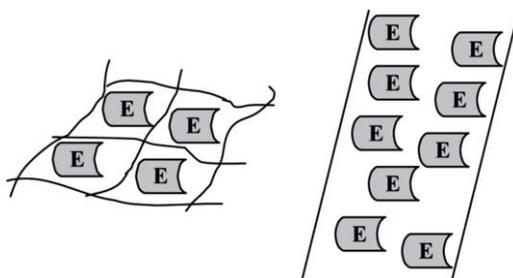


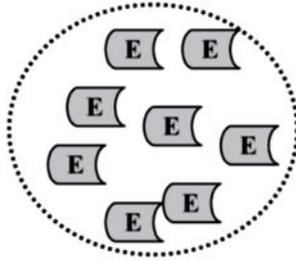
Gambar 2.9 Imobilisasi Enzim dengan Metode Pengikatan Kovalen

II.6.3 Metode *Entrapment*

Teknik *entrapment* merupakan teknik imobilisasi enzim dimana enzim ditangkap atau dijebak dengan suatu polimer atau mikrokapsul polimer dimana substrat dan produk saling melewati

tetapi tertahan oleh enzim. Dibandingkan dengan metode adsorpsi, metode *entrapment* ini lebih stabil. *Entrapment* melibatkan adsorpsi sederhana di mana enzim melekat pada *support* solid melalui interaksi ionik, gaya Van Der Waals dan ikatan hidrogen. *Entrapment* lebih disukai daripada lainnya karena metode ini mudah untuk dilakukan, murah dan derivatif yang terbentuk stabil (Zhao *et al.*,2015). *Entrapment* di sol-gel (xerogel) melibatkan fenomena adsorpsi yang telah dilaporkan sebagai metode terbaik untuk imobilisasi. *Support* enzim adalah komponen penting kedua yang menentukan kinerja enzim. Dua jenis *support* yang biasa digunakan untuk enzim imobilisasi, yaitu, (i) biomaterial hidrofobik dan (ii) biomaterial hidrofilik. biomaterial hidrofobik lebih disukai karena bahan tersebut memiliki kemampuan untuk menjebak sejumlah besar enzim dan aktivitas enzim yang jauh lebih tinggi (derajat imobilisasi). (Ashger *et.al*, 2014) Teknik ini memiliki kelemahan dimana enzim yang diimobilisasi akan terdeaktivasi selama proses pembentukan gel dan rentan terjadi kebocoran (Zhao *et al.*, 2015).

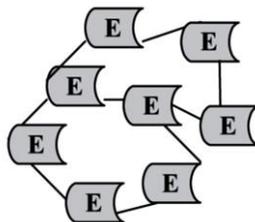




Gambar 2.10 Imobilisasi Enzim dengan Metode Penjebakan dan Mikroenkapsul

II.6.4 Metode *Cross-Linking*

Imobilisasi enzim secara *cross-linking* dilakukan melalui pembentukan intermolekuler *cross-linkages*. Imobilisasi ini dapat diperoleh dengan penambahan bi- atau multifungsional reagent *cross-linking* seperti GDA. Teknik ini biasanya tidak menggunakan bantuan matriks tetapi enzim akan saling bergabung satu sama lain untuk membentuk struktur tiga dimensi. Penggunaan teknik imobilisasi ini tidak dilakukan secara tunggal tetapi dilengkapi dengan teknik lain misalnya teknik adsorpsi (Zhao *et al.*, 2015) dan *covalent attachment* (Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010).



Gambar 2.11 Imobilisasi Enzim dengan Metode *Cross-linking*

II.7 Penelitian Terdahulu

1. Abd El-Ghaffar dan Hashem (2010) melakukan proses imobilisasi selulase dengan membran polimer *chitosan-GDA*. Dari penelitian ini didapatkan bahwa enzim yang diimobilisasi dengan menggunakan carrier *chitosan-GDA* dapat digunakan hingga 6x pengulangan dengan nilai *retained activity* 60% dari aktifitas awal.
2. Alfren dan Hobley (2014), melakukan imobilisasi selulase yang dilakukan pada *magnetic particle*. Aktivitas dari selulase terimobilisasi yang lebih baik ditunjukkan pada imobilisasi dengan CellicTec2 dimana pada proses hidrolisisnya, produksi gula reduksi/masa partikel: 2,8 g/kg.min.
3. Anwar, N (2012), pembuatan gula reduksi dengan menggunakan enzim dari *A.niger* dan *T. resei* dapat digunakan untuk menghasilkan gula reduksi yang efisien. Hasil gula reduksi terbaik didapatkan dari dengan kombinasi enzim selulase yaitu enzim *T.resei* : *A.niger* = 2:1 menggunakan substrat jerami padi yaitu sebesar 6,4 g/L.
4. Pospikova dan Safarik (2013), melakukan percobaan dengan menggunakan *magnetic chitosan microparticles* untuk imobilisasi enzim dan β -galactosidase. Metode yang digunakan adalah *entrapment* pada *chitosan gel*.
5. Denkbass *et al* (2001), melakukan percobaan dengan menggunakan *magnetic chitosan microparticles*. Kualitas magnet terbaik pada *chitosan magnetic microparticle* adalah 9,1 emu/g *microsphere*.
6. Hani-Gek Ela (2015), pembuatan gula reduksi dari sabut kelapa menggunakan enzim melalui proses hidrolisis enzimatis menggunakan *crude* enzim selulase dari *A.niger*. Dari proses hidrolisis, masa gula reduksi yang didapatkan dari hasil pemurnian yaitu 0,148 gram; dari enzim *crude* yaitu 0,103 gram; dari enzim terimobilisasi

chitosan-GDA yaitu 0,033 gram dan dari enzim terimobilisasi chitosan yaitu 0,021 gram.

7. Nurma-Ella (2016), pembuatan gula reduksi dari sabut kelapa dengan menggunakan enzim melalui proses hidrolisis enzimatik menggunakan *crude* enzim selulase dari *A.niger*. Dari proses hidrolisis, *crude* enzim selulase tanpa imobilisasi menghasilkan masa gula reduksi sebesar 0,012 gram; enzim *crude* selulase terimobilisasi chitosan-GDA menghasilkan masa gula reduksi sebesar 0,006 gram dan variabel enzim *crude* selulase terimobilisasi chitosan menghasilkan masa gula reduksi sebesar 0,003 gram
8. Zheng *et al* (2013), menggunakan Fe_3O_4 sebagai material magnetik. β -glukosidase yang diimobilisasi pada *chitosan magnetic microparticle* ini digunakan untuk menghidrolisis jerami jagung. Didapatkan hasil 60,2g/L gula reduksi dengan *conversion rate* 78,2%.

Halaman Ini Sengaja Dikosongkan

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Biokimia, Teknik Kimia Fakultas Teknik Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya pada bulan Februari 2017 – Juni 2017

III.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah proses hidrolisis dengan:

1. Enzim selulase murni terimobilisasi dari 2 jamur *T.reesei* dan *A.niger* dengan kombinasi variabel sebagai berikut :
 - a. Imobilisasi dilakukan pada masing-masing enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* dengan menggunakan matriks yang berbeda, kemudian dikombinasikan dengan menggunakan perbandingan (dalam gram). Rasio perbandingan yang digunakan adalah sebagai berikut :
 $T.reesei : A.niger = 1:2 ; 1:1$ dan $2:1$
 - b. Matriks yang digunakan : *chitosan*, *chitosan-GDA*, *chitosan+magnet*, dan *chitosan-GDA+magnet*
2. Substrat : CMC, *microcrystalline cellulose* dan Sabut Kelapa.

III.3 Bahan dan Alat

III.3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sabut kelapa, asam dinitrosalisilat (Sigma-Aldrich, Germany), enzim selulase dari *A.niger* (Sigma-Aldrich, Germany), enzim selulase dari *T.reesei* (Sigma-Aldrich, Germany), CMC (*carboxymetil cellulose*) (Sigma-Aldrich, Germany), glukosa (Merck), H₂SO₄ (Merck), serum bovine albumin (Sigma-Aldrich,

Switzerland), *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) (Sigma-Aldrich, Germany), *aquadest*, natrium sitrat (Merck), NaOH (Merck), asam sitrat (Merck), CH₃COOH (Merck), CH₃COONa (Merck), *potassium tartrate*, sodium metabisulfit, *chitosan flake*, *Glutaricdialdehyde* (GDA).

III.3.2 Alat Penelitian

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *hot plate & stirrer* (Snijders), *spectrophotometer* (Cecil CE 1011, Inggris), *analitical balance* (Ohaus, Cina), *incubator shaker* (Incucell carbolit, Jerman), kondensor reflux, tabung reaksi, gelas ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia), corong kaca, pipet volumetric (Pyrex Iwaki, Indonesia), pipet ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia), pipet tetes, *beaker Glass* (Pyrex Iwaki, Indonesia), labu Ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia), erlenmeyer (Pyrex Iwaki, Indonesia), oven (VWR Scientific S/P 1350 G-2, Amerika), *vortex* (VM-300, Taiwan), *centrifuge* (Hermle Labortechnik, Jerman), karet penghisap, spatula, *vacuum pump* (Weich), *oil bath*, termometer, rak kayu, kuvet, kertas saring Whattman dan *screen* untuk menyaring.

III. 4 Pretreatment Sabut Kelapa

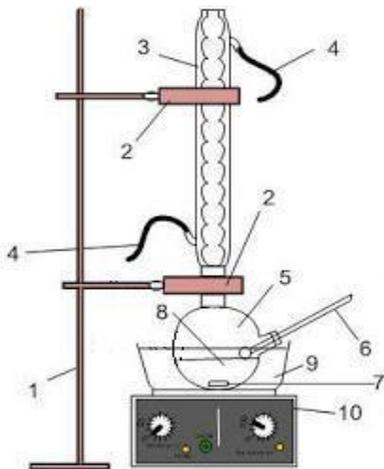
III.4.1 Pretreatment mekanik (Rivers *et al.*, 1984)

Sabut kelapa sebagai bahan baku yang diperoleh dari limbah, dikeringkan dibawah sinar matahari selama 3 hari. Kemudian sampel tersebut digiling dengan menggunakan mesin penggiling. Selanjutnya sampel yang sudah berupa butiran-butiran dimasukkan kedalam oven selama 24 jam pada suhu 60°C dan diayak dengan menggunakan *screener* berukuran 100-120 mesh.

III.4.2 Pretreatment Kimia (NaOH 1% w/v)

Sebanyak 25 gram sabut kelapa yang telah mengalami perlakuan *pretreatment* mekanik, dimasukkan ke dalam labu alas bulat, kemudian ke dalam labu tersebut dimasukkan pula NaOH 1% w/v sebanyak 500 ml. Campuran diaduk dengan pengaduk

stirer dan dipanaskan pada suhu 80°C selama 16 jam. Setelah 16 jam, campuran didinginkan dan disaring, padatan dicuci dengan *aquadest* panas sampai pH 7. Selanjutnya, padatan yang sudah netral (pH 7) dioven pada suhu 60°C selama 24 jam. Kemudian, padatan didinginkan dan digiling kembali kemudian disimpan. Padatan sabut kelapa ini dioven kembali pada suhu 60°C selama 24 jam sebelum digunakan pada proses selanjutnya. Gambar rangkaian alat saat proses *pretreatment* NaOH 1%, *Pretreatment* ditampilkan dalam gambar 3.1.



Keterangan :

1. Statif
2. Klem
3. Kondensor Reflux
4. Selang air keluar dan masuk
5. Labu leher 2
6. Termometer
7. *Magnetic Stirrer*
8. Solvent
9. *Oil Bath*
10. Hotplate stirer

Gambar 3.1 Rangkaian Alat *Pretreatment* Sabut Kelapa

III.4.3 Analisa Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin

Sebanyak 1 gram sampel (berat *a*) yang akan dianalisa kadar selulosa, hemiselulosa, dan ligninnya dimasukkan ke dalam labu alas bulat 250 ml, kemudian ditambahkan 150 ml H₂O ke dalam labu tersebut. Campuran direflux pada suhu 100°C dengan penangas air selama 1 jam, kemudian hasilnya disaring dengan kertas saring, residu yang diperoleh dicuci dengan air panas sebanyak 300 ml untuk menghilangkan sisa-sisa ekstrak yang tidak ikut terbuang. Padatan yang diperoleh dikeringkan dalam

oven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan. Berat padatan ini disebut (berat b).

Selanjutnya, padatan b dimasukkan kembali ke dalam labu alas bulat 250 ml kemudian ditambahkan 150 ml H₂SO₄ 1 N dan direflux dengan penangas air selama 1 jam pada suhu 100°C. Hasilnya disaring dan dicuci sampai pH netral dan residunya dikeringkan hingga beratnya konstan dengan oven pada suhu 60°C. Berat padatan ini disebut (berat c).

Tahap selanjutnya, padatan c dimasukkan kembali ke dalam labu alas bulat 250 ml kemudian ditambahkan 10 ml H₂SO₄ 72% dan dibiarkan pada suhu kamar selama 4 jam, kemudian ditambahkan 150 ml H₂SO₄ 1 N dan direflux dengan penangas air selama 1 jam pada suhu 100°C. Hasilnya disaring dan dicuci sampai pH netral dan residunya dikeringkan hingga beratnya konstan dengan oven pada suhu 60°C. Berat padatan ini disebut (berat d). Kemudian padatan d diabukan dan ditimbang beratnya, berat padatan ini disebut (berat e). Cara mengetahui kadar selulosa, hemiselulosa, dan lignin dengan metode ini adalah dengan menggunakan persamaan berikut:

- *Hot water soluble* (HWS) (%) = —
- *Hemicellulose* (%) = —
- *Cellulose* (%) = —
- *Lignin* (%) = —
- *Abu* (%) = —

III.5 Tahap Persiapan Enzim Selulase Murni dari *A.niger* dan *T.reesei*

Enzim selulase murni berasal dari jamur *A.niger* dan *T.reesei*. Kedua enzim ini didapatkan dari Sigma Aldrich dengan spesifikasi bahan sebagai berikut :

1. Enzim Selulase dari *A.niger* – *Powder*, $\geq 0,3$ units/mg solid

2. Enzim Selulase dari *T.reesei* – *Aqueous Solution*, \geq 700 units/g

III.6 Persiapan Uji Aktivasi Enzim

III.6.1 Pembuatan Larutan DNS (Asam Dinitrosalisilat)

(Widjaja, 2009)

NaOH sebanyak 16 gram dilarutkan dengan *aquadest* hingga volume 200 mL. Kemudian sodium *potassium tartrate* sebanyak 30 gram dan sodium metabisulfit sebanyak 8 gram dilarutkan dengan *aquadest* sampai volume 500 mL. 10 gram DNS dilarutkan menggunakan larutan NaOH sebanyak 200 mL. Kemudian larutan DNS ditambahkan kedalam larutan sodium *potassium tartrate* dan sodium metabisulfit, setelah itu dilarutkan sempurna dengan *aquadest* hingga volume 1000 mL.

III.6.2 Pembuatan Larutan CMC (*Carboxymethyl Cellulose*)

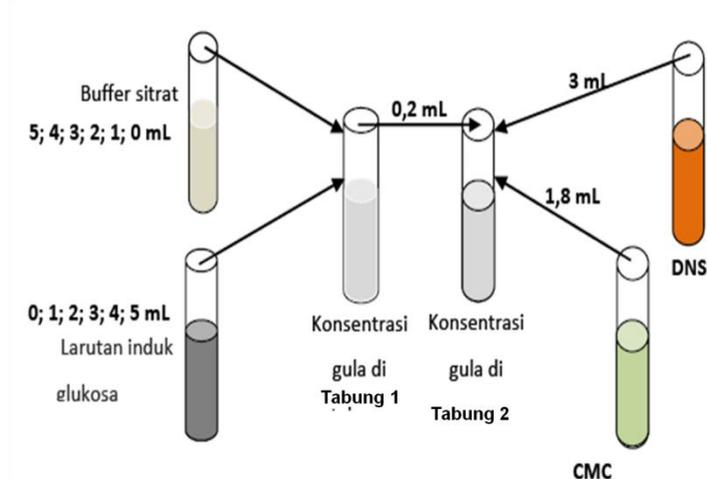
(Widjaja, 2009)

Pembuatan larutan CMC langkah-langkahnya adalah 2 gram CMC ditimbang kemudian dimasukkan ke erlemeyer. Setelah itu ditambahkan buffer sitrat dengan pH 5,5 sampai tepat 200 ml dan diaduk dengan *stirrer* selama 16 jam.

III.6.3 Pembuatan Kurva Standar Glukosa untuk Mengukur Keaktifan Enzim Selulase (Widjaja, 2009)

Pada tahap pengujian ini langkah-langkah yang dilakukan adalah, pertama glukosa ditimbang 0,3735 gram dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Kemudian ditambahkan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 5,5 sampai tepat 100 ml ke dalam labu ukur. Larutan induk glukosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan larutan induk glukosa berturut-turut 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml dan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 sebanyak 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml, 0 ml seperti ditunjukkan pada gambar 3.2. Selanjutnya sebanyak 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan diambil dan dimasukkan ke dalam larutan standar glukosa dan ditambahkan 1,8 ml CMC ke dalam tabung reaksi. Setelah itu diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit dan ditambahkan 3 ml DNS ke dalam tabung

reaksi. Selanjutnya campuran tersebut divortex kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm. Terakhir membuat kurva kalibrasi dengan mengplot konsentrasi glukosa di tabung terhadap absorbansi.



Gambar 3.2 Proses Pembuatan Kurva Standar Glukosa

III.7 Uji Aktivitas Enzim

III.7.1 Uji Aktivitas Enzim Selulase Sebelum Koreksi (Widjaja, 2009)

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim selulase dan 1,8 mL larutan CMC dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C . Kemudian ditambahkan 3 mL DNS ke dalam larutan dan divortex hingga tercampur rata. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit, lalu didinginkan pada air es selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing

larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Larutan standarnya diperlakukan sama seperti sampel larutan enzim dengan mengganti larutan enzim menjadi buffer sitrat pH 5,5.

III.7.2 Uji Aktivitas Larutan Koreksi Enzim Selulase (Widjaja, 2009)

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim selulase dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C . Kemudian ditambahkan 3 ml DNS ke dalam larutan dan divortex hingga tercampur rata. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan dipanaskan pada air mendidih selama 2 menit, kemudian ditambahkan 1,8 ml larutan CMC. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan dipanaskan kembali pada air mendidih selama 10 menit, lalu didinginkan pada air es selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Larutan standarnya diperlakukan sama seperti sampel larutan enzim dengan mengganti larutan enzim menjadi buffer sitrat pH 5,5. Perhitungan aktivitas enzim dilakukan dengan cara menghitung selisih absorbansi larutan enzim dan larutan koreksi enzim, kemudian nilainya dikalikan dengan slope kurva standar glukosa.

III.8 Modifikasi *Chitosan* dan Imobilisasi Enzim

III.8.1 Tahap Pembuatan *Chitosan*

Chitosan 4 gram dilarutkan dalam asam asetat 0,2 M sebanyak 200 ml. Proses pengadukan dilakukan hingga *chitosan* terlarut sempurna dalam asam asetat dan hilangnya buih yang terjadi pada saat pengadukan. Setelah tercampur, ditambahkan 1 M NaOH ke dalam larutan tersebut, untuk mengubah *chitosan* yang larut menjadi *chitosan* yang tidak larut dalam bentuk gel. *Chitosan* gel yang terbentuk disaring menggunakan kertas saring dan dicuci dengan *aquadest* hingga pH 7. Setelah itu *chitosan*

dikeringkan dalam oven. Hasil *chitosan* yang telah kering dipotong dan disaring agar ukuran potongan *chitosan* menjadi seragam.

III.8.2. Persiapan Pengikatan Partikel Magnet pada *Chitosan*

4 gram *chitosan* dilarutkan pada 200 mL dari 0,2 M asam asetat, kemudian ditambahkan 8 gram *commercial magnetite microparticle*. Setelah tercampur, ditambahkan 1 M NaOH ke dalam larutan tersebut, untuk mengubah *chitosan* yang larut menjadi *chitosan* yang tidak larut dalam bentuk *magnetic gel*. *Chitosan gel magnetic* yang terbentuk disaring menggunakan kertas saring dan dicuci dengan *aquadest* hingga pH 7. Setelah itu *chitosan* dikeringkan dalam oven. Hasil *chitosan* yang telah kering dipotong dengan menggunakan saringan agar ukuran potongan *chitosan* menjadi seragam (Pospikova dan Safarik, 2013).

III.8.3 Tahap Pembuatan *Chitosan-Glutaricdialdehyde* (GDA) (Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010)

Chitosan 0,1 gram ditambahkan GDA 1% sebanyak 10 ml. Kemudian diaduk di dalam *incubator shaker* selama 4 jam pada temperatur 25°C selanjutnya dидiamkan kembali pada temperatur 25°C selama 1 malam. *Chitosan-GDA* yang sudah jadi (material pendukung *cross-linked*) difiltrasi dari larutan dan dicuci sebanyak tiga kali dengan larutan buffer fosfat pH 7 sebanyak 5 ml.

III.8.4 Imobilisasi Enzim dengan *Chitosan* (Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010)

Sebanyak 0,1 gram *chitosan* ditambahkan kedalam enzim selulase yang telah diukur aktivitas dan kadar proteinnya. Penambahan volume enzim disesuaikan dengan mg protein yang ingin ditambahkan saat imobilisasi. Proses imobilisasi dilakukan selama 24 jam pada temperatur dan kecepatan pengadukan sesuai variabel penelitian. Campuran kemudian difiltrasi dan enzim yang tidak bereaksi dipisahkan dengan cara dicuci sebanyak 3 kali dengan larutan buffer fosfat pH 7 sebanyak 5 ml. Enzim selulase yang telah diimobilisasi kemudian disimpan pada suhu 4°C.

III.8.5 Imobilisasi Enzim dengan *Chitosan*-GDA (Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010)

Sebanyak 0,1 gram material pendukung *chitosan*-GDA ditambahkan kedalam enzim selulase yang telah diukur aktivitas dan kadar proteinnya. Proses imobilisasi dilakukan selama 4 jam pada temperatur 25°C dan kecepatan pengadukan 125 rpm didalam *incubator shaker*. Campuran kemudian disaring dan enzim yang tidak bereaksi dipisahkan dengan cara dicuci sebanyak 3 kali dengan larutan buffer fosfat pH 7 sebanyak 5 ml. Enzim selulase yang telah diimobilisasi kemudian disimpan pada suhu 4°C.

III.9 Uji Analisa Enzim Terimobilisasi

III.9.1 Persiapan Uji Analisa Enzim Terimobilisasi dengan Metode Bradford

Metode Bradford (Bradford, 1976) digunakan untuk menentukan kadar selulase di dalam suatu larutan. Untuk membuat *dye reagent* larutkan 100 mg *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 di dalam 50 ml etanol 95%, kemudian tambahkan 100 ml asam fosfat 85%. Campuran dihomogenkan kemudian dilarutkan dengan *aquadest* hingga 1 L dan saring larutan dengan kertas saring sebelum digunakan.

III.9.2 Prosedur Pembuatan Larutan Standar Protein (Bradford, 1976)

Larutan standar protein dibuat dengan menimbang 0,1 gram *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang dilarutkan dengan 100 ml *aquadest* steril untuk mendapatkan larutan BSA dengan konsentrasi 1 mg/ml. Kemudian membuat larutan NaCl 0,15 M dengan cara melarutkan 5,844 gram NaCl dengan 666 ml *aquadest* steril.

III.9.3 Prosedur Pembuatan Kurva Standar Bradford

Kurva standar dibuat dengan mengplot konsentrasi protein didalam selulase terhadap absorbansinya. Larutan standar BSA dianalisa dengan menggunakan 5 ml reagent Bradford yang ditambahkan ke dalam 0,1 ml larutan standar NaCl. Inkubasi pada

suhu ruang selama 10 menit dan ukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm.

III.9.4 Analisa Enzim Terimobilisasi dengan Metode Bradford (Bradford, 1976)

Siapkan spektrofotometer sebelum digunakan, dilanjutkan dengan melarutkan 0,05 ml enzim selulase dengan 0,05 ml NaCl. Larutan kemudian divortex agar homogen. Selanjutnya menambahkan 5 ml *dye reagent* ke dalam *tube* percobaan dan menginkubasi larutan selama 10 menit. Kemudian, mengukur absorbansi dengan panjang gelombang 595 nm.

III.9.5 Prosedur Pembuatan Kurva Standar Glukosa untuk Uji Hasil Hidrolisis

Pada tahap pengujian ini langkah-langkah yang dilakukan adalah, pertama glukosa ditimbang 0,367 gram dan dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml. Kemudian ditambahkan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 5,5 sampai tepat 100 ml kedalam labu ukur. Larutan induk glukosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan larutan induk glukosa berturut-turut 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml dan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 sebanyak 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml, 0 ml. Selanjutnya sebanyak 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan diambil dan dimasukkan kedalam larutan standard glukosa dan ditambahkan 1,8 ml *aquadest* kedalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan 3 ml DNS kedalam tabung reaksi. Selanjutnya campuran tersebut divortex kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm. Terakhir membuat kurva kalibrasi dengan mengplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

III.10 Proses Hidrolisis

III.10.1 Prosedur Hidrolisis Substrat CMC

Sebanyak 0,1 gram enzim terimobilisasi *chitosan* ditambahkan 2 ml CMC ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi dalam *incubator shaker* selama 1 jam pada suhu 35°C dengan

kecepatan 125 rpm. Kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan di *microtube*, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C untuk memisahkan endapan. Setelah disentrifugasi larutan diambil 0,2 ml dan ditambahkan 1,8 ml *aquadest* ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 3 ml larutan DNS dan divortex agar tercampur merata. Selanjutnya dipanaskan dengan air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan air es selama 10 menit. Kemudian setelah suhu larutan normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Perhitungan kadar glukosa enzim dilakukan dengan absorbansi larutan dikalikan dengan slope kurva standar glukosa.

III.10.2 Prosedur Hidrolisis Substrat *Microcrystalline*

Substrat *Microcrystalline* didapatkan dari Sigma-Aldrich. Enzim selulase yang telah terimobilisasi pada masing-masing matriks dan sudah diukur konsentrasi protein terimobilisasi ditambahkan ke dalam *microcrystalline*. Selanjutnya ditambahkan buffer fosfat 0,1 M pH 7 ke dalam larutan enzim dan *microcrystalline* sampai 20 ml. Proses hidrolisis dilakukan dengan *incubator shaker* dengan kecepatan shaker 125 rpm suhu di jaga konstan 60°C selama 48 jam. Hasil Hidrolisis kemudian dianalisa dengan menggunakan metode DNS.

III.10.3 Prosedur Hidrolisis Substrat Sabut Kelapa

Pada tahap hidrolisis selulosa menjadi glukosa langkah-langkahnya adalah, 1 gram sabut kelapa (100 mesh) yang sudah dilakukan *pretreatment* secara kimiawi (*didelignifikasi*) dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan enzim selulase yang telah terimobilisasi pada masing-masing matriks dan sudah diukur konsentrasi protein terimobilisasi ke dalam sabut kelapa. Selanjutnya ditambahkan buffer fosfat 0,1 M pH 7 ke dalam larutan enzim dan sabut kelapa sampai 20 ml. Proses hidrolisis dilakukan dengan *incubator shaker* dengan kecepatan shaker 125 rpm suhu di jaga konstan 60°C selama 48 jam. Peralatan untuk proses hidrolisis ditunjukkan oleh gambar 3.3.

Selanjutnya hasil hidrolisis dianalisa kadar glukosanya dengan menggunakan metode DNS.



Keterangan Gambar:

1. Pengatur RPM
2. Shaker
3. Pembaca dan Pengatur Suhu

Gambar 3.3 Rangkaian Alat Hidrolisis Sabut Kelapa

III.10.4 Analisa Kadar Glukosa dengan Metode DNS (Anwar, 2011)

Sampel yang telah dihidrolisis diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam *microtube*, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C untuk memisahkan endapan. Setelah disentrifugasi larutan diambil 0,2 ml dan ditambahkan 1,8 ml *aquadest* ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 3 ml larutan DNS dan divortex agar tercampur merata. Selanjutnya dipanaskan dengan air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan air es selama 10 menit. Kemudian setelah suhu larutan normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

III.11 Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	BULAN 1				BULAN 2				BULAN 3				BULAN 4				BULAN 5			
		Minggu ke-				minggu ke-				minggu ke-				minggu ke-				minggu ke-			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1.	Studi penelitian, persiapan penelitian, dan persiapan bahan baku	■	■	■	■																
2.	Praktikum penelitian																				
	Uji analisa Chesson					■	■	■	■												
	Pembuatan <i>chitosan microparticle</i>							■	■												
	Imobilisasi enzim <i>chitosan</i>							■	■	■	■										
	Hidrolisis substrat CMC dengan <i>chitosan</i>									■	■	■	■								
	Imobilisasi enzim <i>chitosan</i> +GDA											■	■								
	Hidrolisis substrat CMC dengan <i>chitosan</i> +GDA													■	■						
	Pembuatan <i>chitosan magnetic microparticle</i>															■	■				
	Hidrolisis substrat <i>microcrystalline</i> dengan <i>chitosan</i> dan <i>chitosan</i> -GDA															■	■				
Hidrolisis substrat sabut kelapa dengan <i>chitosan</i> , <i>chitosan</i> +magnet dan <i>chitosan</i> -GDA+magnet															■	■					
3.	Pembahasan Penelitian																	■	■	■	■

Halaman Ini Sengaja Dikosongkan

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan gula reduksi dari hidrolisis enzimatis sabut kelapa yang telah melalui proses *pretreatment* bahan baku dengan enzim terimobilisasi. Dalam penelitian ini, untuk mendapatkan hasil akhir gula reduksi, terdapat beberapa proses yang harus dilakukan:

1. Proses *pretreatment* dari sabut kelapa yang terdiri atas *pretreatment* mekanik dan kimiawi
2. Tahap preparasi *carrier chitosan*
3. Tahap imobilisasi enzim dengan menggunakan *carrier chitosan*, dan *carrier chitosan* yang telah dilakukan *cross-linking* terlebih dahulu dengan GDA serta *magnetic chitosan*
4. Tahap hidrolisis sabut kelapa menggunakan enzim terimobilisasi dengan substrat CMC, *Microcrystalline* (MCC), dan sabut kelapa

IV. 1 *Pretreatment* Sabut Kelapa

Pada penelitian ini, sebelum sabut kelapa dihidrolisa dengan enzim yang terimobilisasi dengan *chitosan* dan *chitosan-GDA*, sabut kelapa terlebih dahulu mengalami proses *pretreatment*. *Pretreatment* terdiri atas *pretreatment* mekanik dan kimiawi. Proses *pretreatment* mekanik bertujuan untuk memperluas permukaan sabut kelapa sehingga dapat mempermudah pada proses selanjutnya. Proses *pretreatment* mekanik yaitu sabut kelapa dikeringkan dibawah sinar matahari selama 3 hari. Kemudian sampel tersebut digiling dengan menggunakan mesin penggiling. Sampel yang sudah berupa butiran-butiran dimasukkan kedalam oven selama 24 jam pada suhu 60°C. Setelah dioven, sabut kelapa diayak untuk memperoleh ukuran 100 mesh, hal ini bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sehingga memudahkan mendegradasi selulosa dan hemiselulosa menjadi glukosa. Proses

selanjutnya yaitu proses *pretreatment* kimiawi bertujuan untuk memperkecil jumlah lignin yang terkandung didalam selulosa sehingga nantinya selulosa dapat dengan mudah didegradasi saat proses hidrolisa.

Berikut ini adalah komposisi hemiselulosa, selulosa, dan lignin sebelum dilakukan *pretreatment* kimiawi ditunjukkan pada tabel 4.1

Tabel 4.1 Komposisi Sabut Kelapa Tanpa *Pretreatment* Kimiawi

Komposisi Kimia	% wt (Hasil Penelitian ini)	% wt (Sangian <i>et al.</i> , 2015)
Hemiselulosa	18,99	17,87
Selulosa	22,35	26,68
Lignin	43,11	41,20

Dari tabel 4.1 menunjukkan komposisi untuk hemiselulosa 18,99 %, selulosa 22,35% dan lignin 43,11% Dari data tersebut, sabut kelapa mempunyai kandungan selulosa dan hemiselulosa yang dapat dikembangkan menjadi bahan baku untuk pembuatan gula reduksi. (Prado *et al.*, 2014)

Pretreatment kimia dilakukan dengan tahapan yaitu menimbang 25 gram sabut kelapa yang telah mengalami perlakuan *pretreatment* mekanik, dimasukkan ke dalam labu leher 3, kemudian ke dalam labu tersebut dimasukkan pula NaOH 1% w/v sebanyak 500 ml. Campuran diaduk dengan pengaduk stirer dan dipanaskan pada suhu 80°C selama 16 jam. Setelah 16 jam, campuran didinginkan dan disaring, padatan dicuci dengan aquadest panas sampai pH 7. Selanjutnya, padatan yang sudah netral (pH 7) dioven pada suhu 60°C selama 24 jam. Kemudian, padatan didinginkan dan digiling kembali kemudian disimpan. Padatan sabut kelapa ini dioven kembali pada suhu 60°C selama 24 jam sebelum digunakan pada proses selanjutnya.

IV.1.1 Perbandingan Komposisi Kimia Sabut Kelapa Sebelum dan Sesudah *Pretreatment* Kimiawi

Sabut kelapa yang sudah mengalami *pretreatment* kimia kemudian dianalisa kandungan selulosa, hemiselulosa, dan lignin nya. Uji analisa kandungan tersebut dengan menggunakan metode Chesson (Sangian *et al.*, 2014). Pengujian dilakukan dengan tahapan yaitu, menggunakan asam sulfat 1 N dan asam sulfat 72%. Asam sulfat digunakan untuk melarutkan selulosa. Padatan kemudian diabukan untuk mendapatkan kadar lignin. Proses analisa diawali dengan mereflux 1 gram sampel dengan air selama 1 jam pada suhu 100°C, padatan dikeringkan dan dioven selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan mereflux sampel dengan asam sulfat 1 N selama 1 jam pada suhu 100°C. Pada proses ini, asam sulfat 1 N akan melarutkan hemiselulosa yang terdapat pada sampel sehingga berat sampel yang telah kehilangan kadar hemiselulosa dapat dihitung. Selanjutnya, sampel yang telah melalui *treatment* asam sulfat 1 N direndam dengan asam sulfat 72% selama 4 jam kemudian direfluks kembali dengan asam sulfat 1 N. Asam sulfat 72% dan asam sulfat 1 N ini akan melarutkan selulosa dalam sampel sehingga berat sampel yang telah kehilangan kadar selulosa dapat dihitung. Selanjutnya sampel diabukan, tujuannya adalah untuk menghilangkan kadar lignin dalam sampel sehingga berat lignin yang terkandung dalam sampel dapat dihitung. Berikut ini adalah perbandingan komposisi kimia sabut kelapa sebelum dan sesudah *pretreatment* kimiawi ditunjukkan pada tabel 4.2

Tabel 4.2 Persentase Komposisi Hemiselulosa, Selulosa, dan Lignin Sebelum dan Setelah *Pretreatment* Kimiawi

Variabel	Komposisi Kimia (% wt)		
	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin
<i>Unpretreatment</i>	18,99	22,35	43,11
NaOH 1%	23,55	22,67	33,56

Dari tabel 4.2 setelah dilakukan *pretreatment* kimiawi menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar lignin. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa basa (NaOH) dapat digunakan untuk mendegradasi lignin sehingga sabut kelapa dapat dengan mudah didegradasi saat proses hidrolisa.

IV.2 Tahap Pengujian Aktivitas dan Kadar Protein Enzim

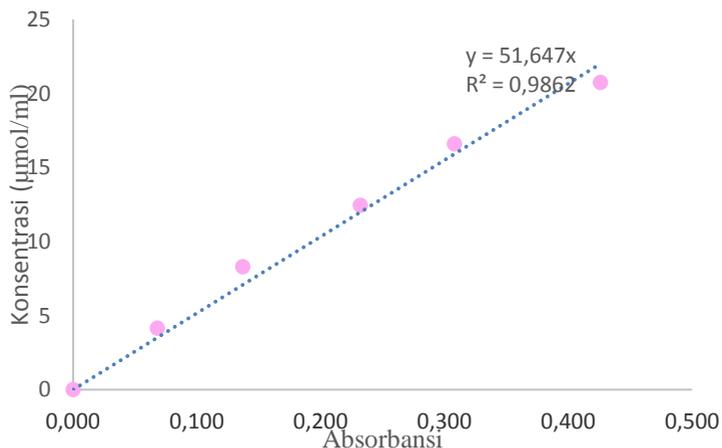
Enzim selulase yang digunakan pada penelitian ini adalah enzim selulase murni dari Sigma-Aldrich. Sebelum digunakan, enzim selulase tersebut diencerkan terlebih dahulu. Pengenceran dilakukan dengan menimbang 1 gram enzim selulase dilarutkan dengan buffer fosfat pH 7 hingga volume 100 ml. Setelah diencerkan, dilakukan proses pengujian enzim. Sebelum proses pengujian ini perlu dilakukan pembuatan kurva standar glukosa. Kurva standar glukosa dapat dibuat dengan cara melarutkan 0,3735 gram glukosa dalam 100 ml buffer sitrat pH 5,5 didalam labu ukur. Kemudian mengencerkan larutan induk glukosa dengan larutan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5. Pengenceran larutan glukosa ini dilakukan di dalam tabung reaksi dengan berbagai konsentrasi yakni (0:5, 1:4, 2:3, 3:2, 4:1, 5:0). Dimana diambil larutan glukosa sebanyak 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml dan ditambahkan buffer sitrat pH 5,5 secara berurutan sebanyak 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml, 0 ml. Dari setiap tabung reaksi diambil sebanyak 0,2 ml sehingga didapatkan 6 tabung reaksi baru dengan konsentrasi yang berbeda. Sebanyak 0,2 ml glukosa tadi ditambahkan dengan 1,8 CMC. Lalu diinkubasikan di dalam inkubator selama 10 menit dengan suhu 35 °C dan ditambahkan 3 ml DNS. Selanjutnya dipanaskan dengan suhu 100°C selama 10 menit dan didinginkan di dalam air es selama 10 menit. Setelah itu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Dari absorbansi yang didapatkan kemudian membuat kurva kalibrasi antara absorbansi dan glukosa. Kurva kalibrasi ini digunakan untuk menguji keaktifan enzim selulase.

Tabel 4.3 Perhitungan Kurva Standar Glukosa dengan CMC

Larutan Glukosa 0,024 M (ml)	Buffer (ml)	Diambil (ml)	CMC (ml)	V total (ml)	Konsentrasi ($\mu\text{mol/ml}$)	A
0	5	0,2	1,8	5	0	0,000
1	4	0,2	1,8	5	4,15	0,068
2	3	0,2	1,8	5	8,3	0,137
3	2	0,2	1,8	5	12,45	0,232
4	1	0,2	1,8	5	16,6	0,308
5	0	0,2	1,8	5	20,75	0,426

Konsentrasi glukosa awal sebesar 20,75 $\mu\text{mol/ml}$

Dari tabel 4.3 dapat dibuat kurva standar glukosa dengan cara mengplot data konsentrasi glukosa dalam tabung sebagai sumbu y dan data absorbansi sebagai sumbu x. Selanjutnya ditarik regresi linier sehingga didapatkan suatu persamaan linier. Berikut adalah grafik kurva standar glukosa dari percobaan ini.



Gambar 4.1 Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Menguji Aktivitas Enzim Selulase

Dari kurva pada gambar 4.1 diketahui persamaan regresi linier $y = 51,647 x$ dengan y sebagai konsentrasi glukosa dalam $\mu\text{mol/ml}$ dan x sebagai absorbansi. Yang berfungsi sebagai konversi data dari absorbansi menjadi glukosa yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim.

Dari kurva standar glukosa yang sudah didapat langkah selanjutnya adalah menguji aktivitas enzim. Aktivitas enzim ini diuji dengan metode DNS. Pengukuran aktivitas dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Kurva pada gambar 4.1 diperoleh dari larutan glukosa yang ditambahkan dengan *Carboxymethyl Cellulose* (CMC). CMC digunakan karena dapat dihidrolisis oleh enzim selulase dan menghasilkan glukosa. Dari glukosa yang dihasilkan dapat diuji aktivitas enzimnya. Pengujian dengan spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 540 nm. Pada panjang gelombang ini, reaksi gula reduksi dengan *reagent* DNS akan menghasilkan warna merah atau jingga setelah dipanaskan dan didinginkan. Warna ini yang akan terbaca absorbansinya (Miller, 1959).

Tabel 4.4 Aktivitas Enzim Selulase dari *A.niger* dan *T.reesei*

Enzim	Absorbansi (A)			Slope	Konsentrasi ($\mu\text{mol/ml}$)	Aktivitas (U/ml)	
	A1	A2	A				
<i>A. niger</i>	1	1,077	0,84	0,237	51,647	12,240	6,120
	2	1,406	1,199	0,207	51,647	10,691	5,345
	3	1,111	0,895	0,216	51,647	11,156	5,578
<i>T.reesei</i>	1	0,398	0,046	0,352	51,647	18,180	9,090

Keterangan

A1 : Absorbansi larutan sebelum koreksi

A2 : Absorbansi larutan koreksi

A : Absorbansi larutan setelah koreksi

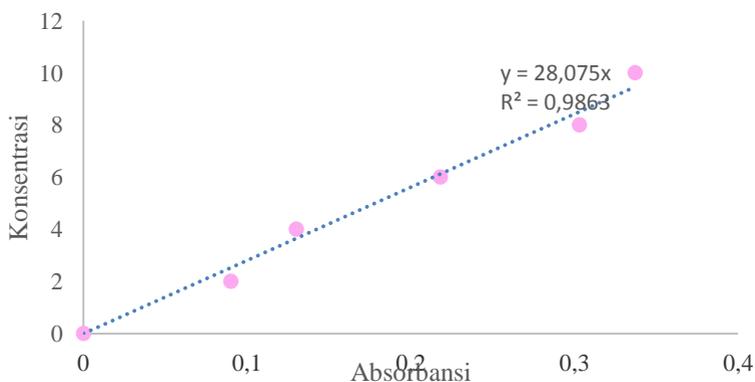
Dari tabel 4.4 dapat dilihat enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* dengan aktivitas yang berbeda. Pengujian enzim selulase dari *A.niger* dilakukan sebanyak 3 kali karena volume enzim yang dibutuhkan untuk imobilisasi banyak sehingga dilakukan pengenceran enzim beberapa kali. Hasil pengujian aktifitas enzim pada setiap penggunaan enzim dapat dilihat pada tabel 4.4, nilai *A.niger* 1;2;3 berturut-turut adalah 6,120; 5,345; 5,578 U/mL. Pada pengujian enzim selulase dari *T.reesei* dilakukan sebanyak 1 kali dengan hasil pengujian aktifitas enzim pada setiap penggunaan enzim dapat dilihat pada tabel 4.4, nilainya adalah 9,090 U/mL.

Selain pengujian aktivitas enzim, dilakukan pula uji Bradford untuk mengetahui kadar protein dari masing-masing enzim sebelum dan sesudah imobilisasi. Pengujian kadar protein ini diawali dengan persiapan pembuatan *dye reagent* dan larutan standar protein. Setelah proses persiapan selesai dilakukan pembuatan kurva standar protein. Kurva standar protein dibuat dengan melarutkan 0,05 ml enzim selulase dengan 0,05 ml NaCl. Larutan kemudian divortex agar homogen. Selanjutnya menambahkan 5 ml *dye reagent* kedalam tabung reaksi percobaan dan menginkubasi larutan selama 10 menit. Setelah itu mengukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm. Kurva standar dibuat dengan mengplot nilai konsentrasi protein didalam selulase terhadap absorbansinya. Larutan standar BSA dianalisa dengan menggunakan 5 ml *reagent* Bradford yang ditambahkan kedalam 0,1 ml larutan standar NaCl. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan ukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm.

Tabel 4.5 Perhitungan Kurva Standar Protein

	Volume BSA (ml)	Volume NaCl (ml)	Volum Dye Reagent (ml)	Konsentrasi	A
Blanko	0	0.1	5	0	0
1	0.01	0.09	5	2	0.09
2	0.02	0.08	5	4	0.13
3	0.03	0.07	5	6	0.218
4	0.04	0.06	5	8	0.303
5	0.05	0.05	5	10	0.337

Dari tabel 4.5 dapat dibuat kurva standar protein dengan cara mengplot data konsentrasi protein dalam tabung sebagai sumbu y dan data absorbansi sebagai sumbu x. Selanjutnya ditarik regresi linier sehingga didapatkan suatu persamaan linier. Berikut adalah grafik kurva standar protein dari percobaan ini.



Gambar 4.2 Kurva Standar Protein untuk Menguji Kadar Protein dalam Enzim Selulase

Dari kurva pada gambar 4.2 diketahui persamaan regresi linier $y = 28,075x$ dengan y sebagai konsentrasi protein (BSA) dalam

mg/ml dan x sebagai absorbansi. Slope berfungsi sebagai konversi data dari absorbansi menjadi kadar protein. Selanjutnya dilakukan perhitungan data total protein melalui absorbansi yang didapatkan dari spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Data hasil uji Bradford dapat dilihat pada tabel 4.6.

Tabel 4.6 Data Total Protein dalam Enzim Selulase yang Digunakan Setelah Dilakukan Uji Bradford

Enzim	A	Slope	Konsentrasi	Enzim terimobilisasi (mg)	Volume (ml)	
<i>A. niger</i>	1	0,013	28,075	0,370	6	16,2
	2	0,019	28,075	0,529	6	11,3
	3	0,028	28,075	0,791	6	7,6
<i>T. reesei</i>	1	0,167	28,075	4,698	6	1,3

Selain mengukur aktivitas enzim pengukuran kadar protein adalah hal yang sangat penting dilakukan untuk menghitung konsentrasi enzim. Perhitungan konsentrasi enzim digunakan untuk menentukan volume enzim yang ditambahkan pada saat imobilisasi. Seperti yang telah dijelaskan, pengujian protein enzim selulase dari *A.niger* juga dilakukan sebanyak 3 kali, hasil pengujian protein enzim pada setiap penggunaan enzim dapat dilihat pada tabel 4.6, nilai *A.niger* 1;2;3 berturut-turut adalah 0,370; 0,529; 0,791 mg/mL. Pada pengujian protein enzim selulase dari *T.reesei* adalah 4,698 mg/mL.

IV.3 Preparasi *Carrier Chitosan* dan Pengujian *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Preparasi *chitosan microparticle* ini dilakukan dengan berdasarkan metode (Biró et al., 2008) dan (Pospiskova dan Safarik, 2013) dengan beberapa modifikasi. *Chitosan* dilarutkan terlebih dahulu pada asam asetat. *Chitosan* larut dalam asam

organik/mineral encer melalui protonasi gugus amino bebas pada pH kurang dari 6,5. (Muzzarelli, 2009). NaOH ditambahkan pada larutan *chitosan* untuk mengubah *chitosan* menjadi gel. pH yang dibutuhkan agar *chitosan* menjadi gel dalam air adalah 12 (Muzzarelli, 2009). *Chitosan* kemudian dicuci sampai pH netral dan dikeringkan sampai *chitosan* dapat dibentuk menjadi mikropartikel menggunakan saringan teh (ukuran pori \pm 80 mesh).

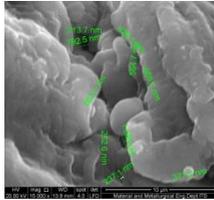
Scanning Electron Microscope (SEM) adalah salah satu jenis mikroskop elektron yang menggambar spesimen dengan memindainya menggunakan sinar elektron berenergi tinggi dalam scan pola raster. Elektron berinteraksi dengan atom-atom sehingga spesimen menghasilkan sinyal yang mengandung informasi tentang topografi permukaan spesimen, komposisi, dan karakteristik lainnya seperti konduktivitas listrik.

Untuk mengetahui morfologi *carrier*, digunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) yang dapat memberikan informasi mengenai struktur morfologi *carrier*. Dengan SEM, juga dapat diperoleh data mengenai ukuran pori *carrier*, sehingga dari hasil ini dapat ditentukan standar keseragaman struktur *carrier* yang dapat digunakan (Mulder, 1991). Berdasarkan *imaging* yang diperoleh dari *Scanning Elektron Miscroscopy* (SEM), dapat diketahui ukuran *carrier* yakni berkisar antara 815,0 μm – 305,1 μm . Dari hasil yang didapatkan, ukuran *carrier chitosan* yang terbentuk sudah mencapai ukuran mikropartikel seperti yang diinginkan. Berikut merupakan hasil dari SEM *chitosan* :

Tabel 4.7 Hasil SEM *chitosan*

Perbesaran	<i>Chitosan Pro</i> analisis	Keterangan
Perbesaran 100x		Ukuran partikel: 305,1 μm - 815 μm
Perbesaran 5000x		Ukuran pori: 990,8nm- 4.881 μm
Perbesaran 7500x		Ukuran pori: 282,9nm- 2.332 μm
Perbesaran 10000x		Ukuran pori: 206,1nm- 1.733 μm

Perbesaran
15000x



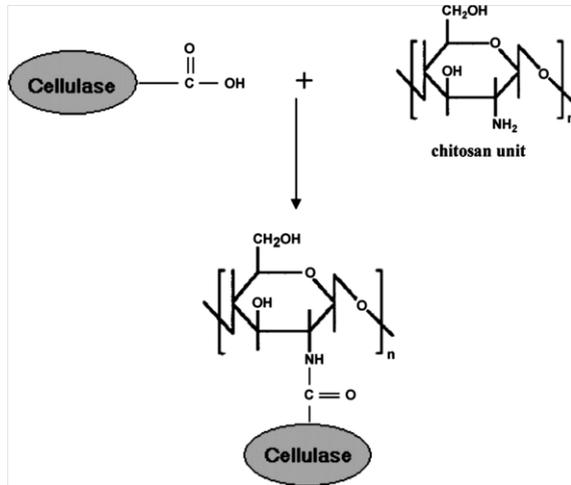
213,7nm-
1.089 μ m

Berdasarkan hasil uji SEM diketahui ukuran partikel *chitosan* pro analisis hasil pretreatment ukuran partikelnya 305,1 μ m - 815 μ m. Diketahui dari hasil uji bahwa ukuran pori tidak seragam, namun data lebar pori pada Tabel 4.6 dapat dijadikan rujukan untuk memprediksi luas bidang kontak, ikatan yang terbentuk serta daya dukung material terhadap perubahan fisika (reaksi).

IV.4 Imobilisasi Enzim

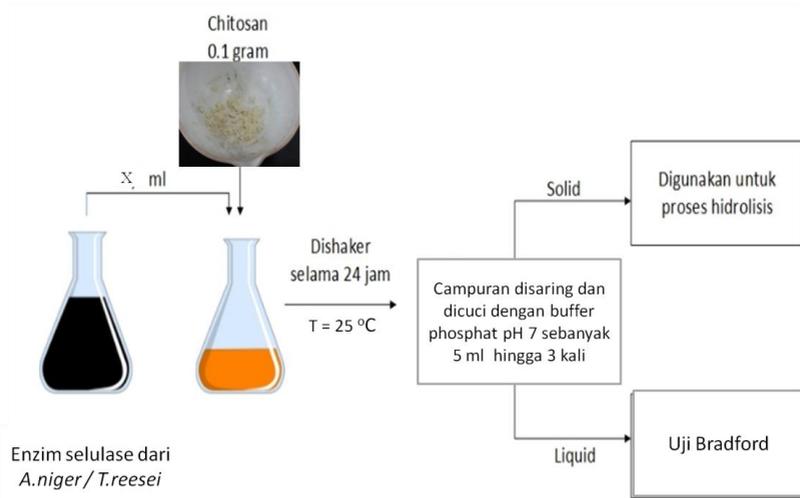
IV.4.1 Imobilisasi Enzim dengan *Chitosan*

Pada penelitian ini imobilisasi dilakukan dengan menggunakan *chitosan* sebagai *carrier* enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei*. Proses imobilisasi dilakukan pada suhu 25^oC dan kecepatan *incubator shaker* 125 rpm. Proses imobilisasi dilakukan dengan menimbang 0,1 gram *chitosan* kemudian ditambahkan kedalam enzim selulase. Penambahan enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* pada *chitosan* disesuaikan dengan kebutuhan, yang sudah diuji aktivitas dan kadar proteinnya.



Gambar 4.3 Mekanisme Reaksi antara *Chitosan* dan Selulase
(Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010)

Setelah uji protein dilakukan dan penyesuaian kebutuhan enzim selulase, enzim kemudian diimmobilisasi pada erlenmeyer ukuran 50 mL dan 100 mL yang ditaruh dalam *incubator shaker* selama 24 jam. Setelah dishaker selama 24 jam enzim yang sudah bercampur dengan *chitosan* disaring menggunakan kertas saring Whattman. Selanjutnya enzim yang tidak berikatan dipisahkan dengan *chitosan* yang sudah terimmobilisasi dengan cara dicuci sebanyak 3 kali dengan menggunakan larutan buffer fosfat pH 7 masing masing sebanyak 5 ml (Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010). Hasil enzim selulase yang tidak terimmobilisasi ke dalam *chitosan* kemudian di uji protein nya dengan uji Bradford, karena diketahui protein awal dari dan protein sisa enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei*, maka dapat diketahui protein enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* yang terimmobilisasi pada *chitosan*. Prosedur imobilisasi enzim dengan *chitosan* dapat dilihat pada gambar 4.4 berikut



Gambar 4.4 Prosedur Imobilisasi dengan *Carrier Chitosan*

Dilakukan pengujian kadar protein enzim selulase sebelum dilakukan imobilisasi dan supernatan setelah imobilisasi menggunakan metode Bradford. Imobilisasi *chitosan* yang dilakukan menggunakan 5 variabel untuk menentukan mg protein terbaik pada saat imobilisasi. Variabel penambahan mg protein yang digunakan yaitu 6 mg, 9 mg, 12 mg, 15 mg, dan 18 mg. Pengujian protein ini dilakukan untuk menunjukkan banyaknya protein yang terserap oleh *chitosan*. Enzim yang dipakai untuk pengujian variabel ini adalah enzim selulase dari *T.reesei*. Karena, enzim tersebut dapat menghasilkan hasil protein terserap oleh *chitosan* yang lebih stabil daripada enzim *A. niger*. Data hasil protein ini dapat dilihat pada tabel 4.7:

Tabel 4.8 Hasil Uji Kadar Protein Enzim Selulase dari *T. reesei* Terimobilisasi *Chitosan* dengan Metode Bradford (Bradford, 1976)

Enzim yang ditambahkan (mg protein)	Volume Reagen (mL)	Konsentrasi Protein Sisa (mg/mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)	% terimobilisasi
6 mg	1,3	0,3416	0,4441	5,556	92,60
9 mg	1,92	0,4164	0,7996	8,200	91,12
12 mg	2,56	0,4164	1,0661	10,934	91,12
15 mg	3,2	0,7674	2,4556	12,544	83,63
18 mg	3,84	0,7861	3,0186	14,981	83,23

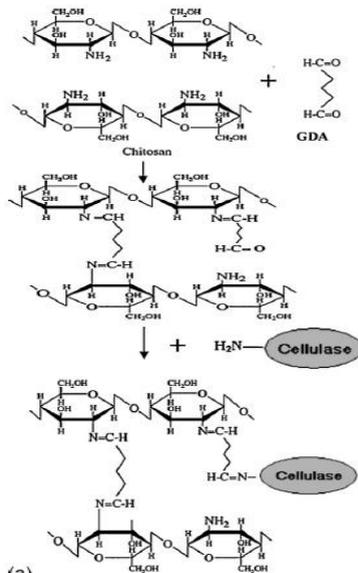
Dari tabel 4.8 dapat dilihat jumlah protein yang terserap pada *chitosan* untuk banyaknya mg protein terimobilisasi 6 mg yakni sebesar 5,556 mg, pada banyaknya mg protein terimobilisasi 9 mg yakni sebesar 8,200 mg, pada banyaknya mg protein terimobilisasi 12 mg yakni sebesar 10,934 mg, pada banyaknya mg protein terimobilisasi 15 mg yakni sebesar 12,544 mg dan pada banyaknya mg protein terimobilisasi 18 mg yakni sebesar 14,981 mg. Jika dihitung dalam persentase jumlah protein yang terserap didalam *chitosan* pada masing-masing variabel secara berturut-turut yakni 92,60%; 91,12%; 91,12%; 83,63%; dan 83,23%. Hal ini menunjukkan *chitosan* mampu menyerap protein dari enzim selulase dan % kemampuan protein terimobilisasi paling optimal berada pada banyaknya mg protein terimobilisasi 6 mg karena dapat menyerap protein hingga 92,60%. Sehingga hasil terbaik ini akan digunakan pada imobilisasi *chitosan*, imobilisasi *chitosan*-GDA, imobilisasi *chitosan*+magnet dan imobilisasi *chitosan*-GDA+magnet.

Karena telah didapatkan banyaknya mg protein terimobilisasi terbaik adalah 6 mg, maka dilakukan imobilisasi enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* pada *carrier chitosan*. Hasil imobilisasi ini akan digunakan untuk proses selanjutnya yaitu hidrolisis. Metode imobilisasi ini sama dengan metode

imobilisasi pada *carrier chitosan* yang di atas. Pada imobilisasi ini ditambahkan volume enzim untuk *T.reesei* sebanyak 1,3 ml dan untuk *A.niger* sebanyak 16,2 ml; 11,3 ml; dan 7,6 ml. Perbedaan penambahan volume enzim pada *A.niger* disebabkan karena larutan enzim yang digunakan berbeda sehingga konsentrasi proteinnya juga berbeda.

IV.4.2 Imobilisasi Enzim dengan *Chitosan*-GDA

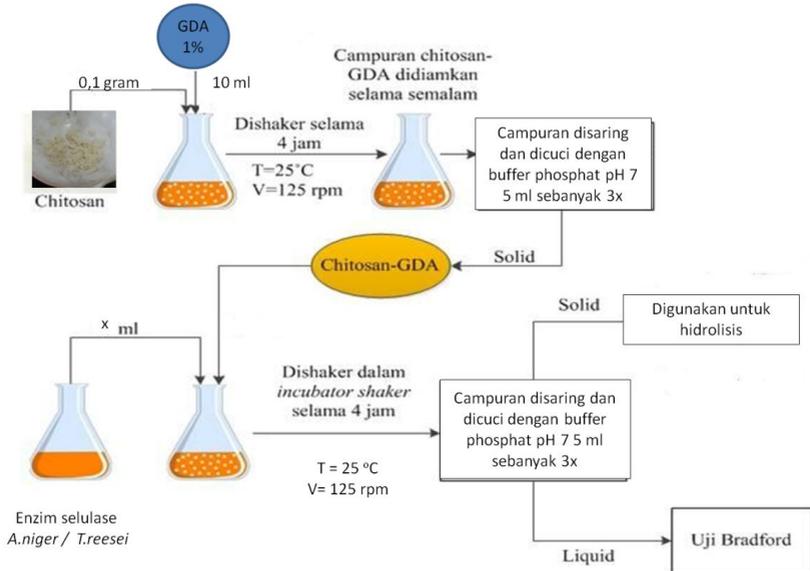
Proses imobilisasi antara enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* dengan *chitosan*-GDA adalah proses imobilisasi yang menggunakan kombinasi dua teknik imobilisasi, yakni dengan ikatan silang (*cross-linking*) antara *chitosan* dengan GDA untuk pengaktifan *carrier chitosan* yang kemudian dilanjutkan dengan ikatan kovalen antara *carrier chitosan*-GDA dengan enzim selulase seperti yang terlihat pada gambar 4.5. *Carrier* yang teraktivasi oleh GDA memungkinkan terbentuknya ikatan kovalen antar *carrier*. Hal ini dikarenakan *chitosan* memiliki gugus fungsional amino dan hidroksil yang bisa dimodifikasi secara kimia (Krajewska, 2004 dan Pillai *et al.*, 2009).



Gambar 4.5 Mekanisme Reaksi antara *Chitosan* dengan GDA dan *Chitosan*-GDA dengan Selulase (Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010)

Pada proses imobilisasi antara enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* dengan *chitosan*-GDA, awalnya pengaktifan *carrier chitosan*-GDA untuk membentuk ikatan *cross-linking*. Proses pengaktifan *carrier chitosan*-GDA dengan cara menimbang 0,1 gram *chitosan*. Kemudian memasukan *chitosan* ke dalam erlenmeyer 50/100 ml, dan menambahkan 1ml buffer fosfat pH 7. *Buffer phosphate* pH 7 berfungsi untuk mengkondisikan agar material pendukung memiliki pH yang sama dengan enzim yang akan digunakan dalam proses hidrolisis. Selanjutnya menambahkan 10 ml GDA 1%. Proses imobilisasi dilakukan dengan menggunakan *incubator shaker* pada suhu 25⁰C selama 4 jam. Setelah itu campuran *chitosan*-GDA didiamkan semalam. Hal ini dilakukan agar proses pengikatan (*cross-linking*) antara *chitosan*-GDA dengan enzim selulase berjalan dengan maksimal

(Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010). Setelah mendinginkan *chitosan*-GDA selama semalam, campuran disaring untuk memisahkan *chitosan* dan buffer fosfat pH 7 dengan menggunakan kertas saring Whattman.



Gambar 4.6 Prosedur Imobilisasi dengan *Carrier Chitosan-GDA* (Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010)

Setelah, pengaktifan ikatan *cross-linking* antara *chitosan* dengan GDA, dilanjutkan dengan ikatan kovalen antara *chitosan*-GDA dan enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei*. 0,1 gram *chitosan*-GDA ditempatkan ke dalam erlenmeyer 50 mL dan 100 mL, kemudian ditambahkan enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* sesuai kebutuhan ke dalam erlenmeyer. Campuran kemudian dishaker dengan menggunakan *incubator shaker* pada suhu 25⁰C dengan kecepatan pengadukan 125 rpm selama 4 jam. Setelah proses imobilisasi selesai, campuran kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Selanjutnya dicuci sebanyak 3 kali dengan menggunakan larutan buffer fosfat pH 7 masing masing sebanyak 5 ml, hal ini bertujuan untuk memisahkan enzim

yang tidak bereaksi dengan *chitosan*-GDA yang sudah terimobilisasi (Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010).

Enzim yang tidak terserap ke dalam *chitosan*-GDA kemudian diuji Bradford untuk mengetahui sisa protein yang tidak terserap, sehingga diperoleh hasil protein yang terserap pada *chitosan*-GDA. Protein terimobilisasi pada *chitosan*-GDA dapat dilihat pada tabel 4.9:

Tabel 4.9 Perhitungan Bradford Enzim Selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* yang Terimobilisasi pada *Chitosan*-GDA

Enzim Selulase	Konsentrasi Protein Sisa (mg/mL)	Volume Reagen (mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)	
<i>A. niger</i>	1	0,000	12,3	0,000	6,000
	2	0,187	12,3	2,302	3,698
	3	0,000	12,3	0,000	6,000
	4	0,000	12,3	0,000	6,000
	5	0,084	12,3	1,036	4,964
<i>T. reesei</i>	1	0,000	2,3	0,000	6,000
	2	0,154	2,3	0,355	5,645
	3	0,000	2,3	0,000	6,000
	4	0,000	2,3	0,000	6,000

Dari kedua tabel 4.9, dapat dilihat bahwa hasil imobilisasi dengan penggunaan *carrier chitosan*-GDA memiliki hasil yang lebih baik dari imobilisasi dengan *chitosan* saja. GDA pada percobaan ini bertindak sebagai *arm spacer* yang menyebabkan ikatan antara *chitosan* dan enzim menjadi panjang sehingga mengurangi *steric hindrance*. (Abd El-Ghaffar dan Hashem, 2010).

IV.5 Hidrolisis

Proses hidrolisis ini dilakukan pada 3 variabel yaitu hidrolisis dengan menggunakan substrat CMC yang dihidrolisa dengan *carrier chitosan* dan *chitosan-GDA* serta substrat *microcrystalline* dan sabut kelapa yang masing-masing variabel tersebut dihidrolisa dengan *chitosan*, *chitosan-GDA*, *chitosan+magnet* dan *chitosan-GDA+magnet*.

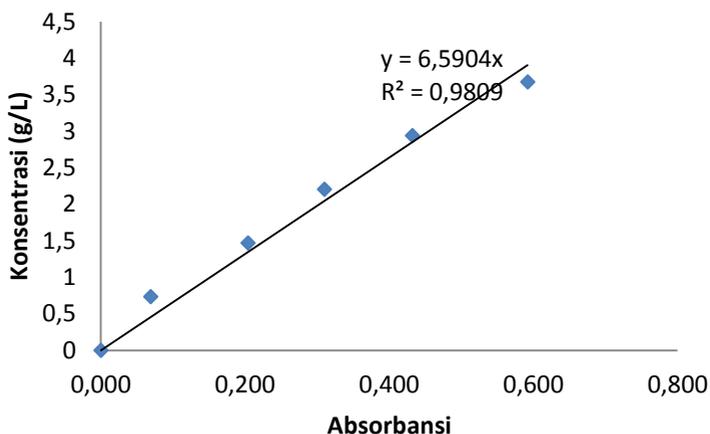
Sebelum melakukan uji glukosa enzim terimobilisasi *chitosan*, tahapan awal yang dilakukan adalah mempersiapkan kurva standar gula reduksi yang akan digunakan untuk perhitungan konsentrasi gula reduksi hasil hidrolisis. Prosedur pembuatan kurva standar ini sama seperti prosedur pembuatan kurva standar untuk mengukur keaktifan enzim, akan tetapi tidak menggunakan CMC, melainkan menggunakan *aquadest*. Hal ini dikarenakan konsentrasi yang ingin diukur adalah konsentrasi gula reduksi saja bukan konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan oleh enzim (aktivitas enzim).

Tabel 4.10 Perhitungan Kurva Standar Glukosa untuk Hidrolisis Tanpa CMC

Larutan Glukosa 0,024 M (ml)	Buffer (ml)	Diambil (ml)	Aquadest (ml)	V total (ml)	Konsentrasi (g/L)	A
0	5	0,2	1,8	5	0	0,000
1	4	0,2	1,8	5	0,735	0,069
2	3	0,2	1,8	5	1,470	0,204
3	2	0,2	1,8	5	2,204	0,310
4	1	0,2	1,8	5	2,939	0,432
5	0	0,2	1,8	5	3,674	0,592

Dari data perhitungan kurva standar glukosa pada tabel 4.10 kemudian diplot grafik dengan data x sebagai absorbansi dan y sebagai konsentrasi glukosa dalam kuvet (gram/l). Setelah itu

dilakukan regresi linier untuk mendapatkan persamaan garis linier. Berikut ini adalah grafik kurva standar glukosa tanpa CMC untuk pengujian gula reduksi hasil hidrolisis:



Gambar 4.7 Kurva Standar Glukosa Tanpa CMC

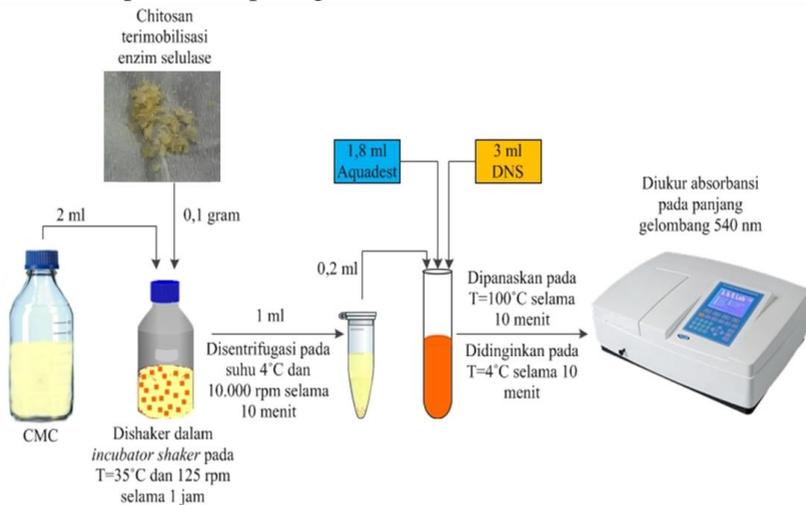
Dari gambar 4.7 didapatkan persamaan $y = 6,5904x$, dimana y adalah konsentrasi glukosa dalam tabung (gram/l) dan x adalah absorbansi, selanjutnya persamaan ini digunakan untuk menghitung konsentrasi gula reduksi yang terbentuk pada proses hidrolisis substrat.

IV.5.1 Hidrolisis Substrat CMC

Substrat yang digunakan untuk hidrolisis adalah CMC. *Carrier* pertama yang digunakan untuk hidrolisis yaitu *chitosan*. Enzim selulase yang telah terimobilisasi dengan *chitosan* kemudian diambil sebanyak 0,1 gram dan ditambahkan 2 ml CMC kedalam botol sampel kemudian dimasukkan kedalam *incubator shaker* selama 1 jam pada suhu 35°C dan kecepatan 125 rpm. Sampel sebanyak 1 ml diambil dengan menggunakan micropipet lalu dimasukkan ke dalam *microtube* kemudian ditimbang dengan neraca analitik sehingga memiliki masa gabungan (*microtube* + larutan + tutup) yang sama antara *tube* 1

dengan 13 pada *centrifuge* nantinya. Karena proses sentrifugasi dilakukan dengan *centrifuge* kecil maka ketelitian penimbangannya adalah 0,01 gram. Kemudian campuran disentrifugasi selama 10 menit, dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4⁰C. Proses sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan antara padatan (solid) dari sabut kelapa dengan larutan (*supernatant*) pada hasil hidrolisa. Setelah itu sebanyak 0,2 ml larutan (*supernatant*) dari setiap sampel diambil dengan menggunakan micropipet kemudian ditambahkan *aquadest* sebanyak 1,8 ml dan DNS sebanyak 3 ml kemudian divortex. Prosedurnya sama dengan prosedur uji aktivitas hanya saja CMC digantikan dengan *aquadest*.

Prosedur uji glukosa enzim selulase terimobilisasi *chitosan* dapat dilihat pada gambar 4.8 berikut:



Gambar 4.8 Prosedur Uji Glukosa Hasil Hidrolisa dengan Substrat CMC

Pada uji glukosa hasil imobilisasi terdapat 3 variabel yang digunakan yaitu uji glukosa dengan menggunakan enzim *A.niger*, uji glukosa dengan menggunakan enzim *T.reesei*, dan uji glukosa dengan menggunakan kombinasi massa dari enzim

T.reesei dan *A.niger* (2:1). Data hasil uji glukosa disajikan pada tabel berikut:

Tabel 4.11 Hasil Uji Kadar Gula Reduksi dengan Variabel Kombinasi Massa Imobilisasi *Chitosan* dan Enzim Selulase dari *A.niger* dan *T.reesei*

Enzim Selulase	A	Slope	Konsentrasi (g/L)
<i>A. niger</i>	0,037	6,590	0,244
<i>T. reesei</i>	0,048	6,590	0,316
Kombinasi			
<i>A. niger</i> dan <i>T. reesei</i> (1:2)	0,155	6,590	1,020
Kombinasi			
<i>A. niger</i> dan <i>T. reesei</i> (2:1)	0,123	6,590	0,906
Kombinasi			
<i>A. niger</i> dan <i>T. reesei</i> (1:1)	0,152	6,590	0,942

Dari tabel 4.11 dapat dilihat bahwa konsentrasi yang dihasilkan pada variabel kombinasi massa enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* (1:2) mempunyai hasil yang jauh lebih besar dari tanpa kombinasi. Sehingga menunjukkan bahwa pada kombinasi massa enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* (2:1) dapat menghasilkan konsentrasi yang optimal dibandingkan dengan enzim tanpa dikombinasi. Hasil ini sesuai dengan penelitian Anwar, 2011 yang mengatakan bahwa pembuatan gula reduksi dengan menggunakan enzim dari enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* terbukti dapat digunakan untuk menghasilkan gula reduksi yang optimal. Enzim selulase dari *T.reesei* mampu menghasilkan endoglukanase sampai 80% tetapi β -glukosidasenya rendah lebih rendah dari yang dibutuhkan untuk menghidrolisis selulosa sampai menjadi glukosa secara efisien, sehingga produk utama hidrolisisnya bukan glukosa melainkan

selobiosa (Martins *et al.*, 2008)(Ahamed dan Vermette, 2008). Sehingga untuk mereaksikan selobiosa tersebut diperlukan tambahan β -glukosidase dari luar. β -glukosidase banyak dihasilkan dari enzim selulase *A.niger*. (Juhász *et al.*,2003)

Untuk mengetahui pengaruh perbandingan massa kombinasi *chitosan* terimobilisasi, dilakukan juga pengujian variabel perbandingan massa kombinasi terbaik yang digunakan. Variabel yang digunakan dalam pengujian ini yaitu perbandingan massa enzim selulase dari *T.reesei* dan *A.niger* yang terimobilisasi pada *chitosan* = 2:1 ; perbandingan massa enzim selulase dari *T.reesei* dan *A.niger* yang terimobilisasi pada *chitosan* = 1:2 dan perbandingan massa enzim selulase dari *T.reesei* dan *A.niger* yang terimobilisasi pada *chitosan* = 1:1. Dari tabel 4.10 dapat dilihat untuk hasil masing-masing variabel. Perbandingan massa enzim selulase dari *T.reesei* dan *A.niger* yang terimobilisasi pada *chitosan* = 1:2 mempunyai konsentrasi gula reduksi sebesar 0,906 g/L; dan perbandingan massa enzim selulase dari *T.reesei* dan *A.niger* yang terimobilisasi pada *chitosan* = 1:1 mempunyai konsentrasi gula reduksi sebesar 0,942 g/L. Sehingga dapat disimpulkan bahwa perbandingan kombinasi massa enzim selulase dari *T.reesei* dan *A.niger* yang terimobilisasi pada *chitosan* dalam menghasilkan gula reduksi yang terbaik adalah 2:1 yakni sebesar 1,020 g/L. Perbandingan kombinasi massa enzim selulase dari *T.reesei* dan *A.niger* terbaik tersebut digunakan untuk proses selanjutnya yaitu proses hidrolisa. Kondisi terbaik untuk hidrolisa ini selanjutnya diterapkan untuk hidrolisa dengan *carrier chitosan-GDA*.

Pembuatan *carrier chitosan-GDA* telah dijelaskan pada subbab sebelumnya. Pada pengujian filtrat imobilisasi *chitosan-GDA* juga mendapatkan hasil yang bagus dengan protein yang terserap lebih banyak daripada *chitosan* saja. Dari hasil imobilisasi *chitosan-GDA* tersebut, dilakukan hidrolisis CMC untuk mengetahui hasil gula reduksi. Berikut adalah perbandingan hasil uji gula reduksi dengan substrat CMC pada *carrier chitosan-GDA* dan *carrier chitosan*

Tabel 4.12 Perbandingan Hasil Uji Gula Reduksi dengan Substrat CMC pada *Carrier Chitosan* dan *Carrier Chitosan-GDA*

Material pendukung	A	Slope	Konsentrasi (g/L)
<i>chitosan</i>	0,155	6,590	1,020
<i>chitosan-GDA</i>	0,134	6,590	0,881

Pada tabel 4.12 dapat dilihat bahwa konsentrasi gula reduksi dengan menggunakan *carrier chitosan* mempunyai nilai sebesar 1,020 g/L dan *carrier chitosan-GDA* mempunyai nilai sebesar 0,881 g/L. Ketidaksesuaian ini dapat disebabkan karena konsentrasi GDA yang dipakai sangat kecil sehingga dikhawatirkan enzim tidak hanya terikat pada GDA tetapi pada *chitosan* langsung yang menyebabkan enzim tidak terikat pada panjang ikatan yang sama. Hal ini menyebabkan protein enzim menjadi tumpang tindih sehingga menyebabkan *steric hindrance* (Biro *et.al*, 2008).

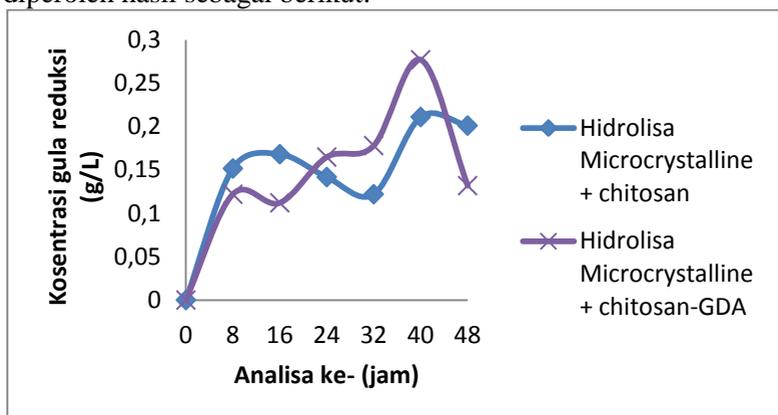
IV.5.2 Hidrolisis Substrat *Microcrystalline* dan Sabut Kelapa

IV.5.2.1 Hidrolisis *Microcrystalline*

Variabel substrat kedua yang digunakan pada hidrolisis ini yaitu *microcrystalline*. *Microcrystalline* merupakan selulosa *insoluble* yang dimurnikan dan dipolimerisasi sebagian dan mempunyai rantai kristalin lebih pendek. Produk ini dibuat dengan mengontrol *partial hyrolisis* dari *high purity wood pulp* diikuti dengan pemurnian dan pengeringan (www.dfepharma.com). Pada hidrolisis ini, *carrier* yang digunakan yaitu *chitosan* dan *chitosan-GDA*. Pertimbangan penggunaan substrat ini karena *microcrystalline* merupakan selulase yang berbentuk padat. Sehingga dapat dibandingkan bagaimana pengaruh hidrolisa dengan menggunakan selulase substrat cair, selulase substrat padat dan lignoselulosa padat.

Proses hidrolisa pada substrat *microcrystalline* sama dengan proses hidrolisa pada substrat sabut kelapa. Hanya penggantian 1 gram sabut kelapa menjadi 1 gram

microcrystalline. Berdasarkan analisa yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut:



Gambar 4.9 Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Hidrolisa Substrat *Microcrystalline* dengan *Carrier Chitosan* dan *Carrier Chitosan-GDA*

Dari gambar 4.9 dapat dilihat bahwa konsentrasi gula reduksi pada substrat *microcrystalline* tidak stabil. Peningkatan konsentrasi ini menunjukkan bahwa enzim yang terimobilisasi pada *chitosan* dan *chitosan-GDA* dapat menghidrolisis *microcrystalline* menjadi gula reduksi. Pada hidrolisa *microcrystalline* dengan *carrier chitosan* maupun *carrier chitosan-GDA* hasil konsentrasi gula reduksinya memiliki titik optimum yang sama yaitu pada jam ke-40.

IV.5.2.2 Hidrolisis Substrat Sabut Kelapa

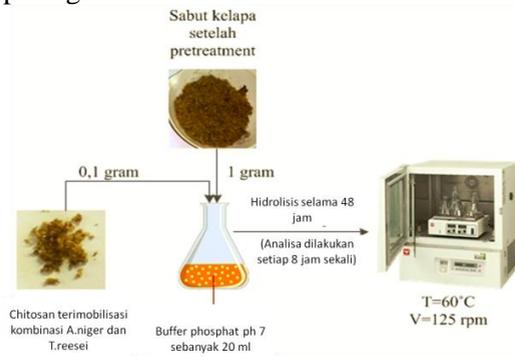
Kondisi operasi dari proses hidrolisis ini adalah pada suhu 60°C dengan pH 7. Proses hidrolisis dilakukan selama 48 jam (Anwar *et al.*, 2011) dengan waktu pengambilan sampel setiap 8 jam sekali (jam ke-8 , 16, 24, 32, 40, 48).

Pada proses hidrolisis yang digunakan sebagai variabel tetap adalah kombinasi massa enzim setelah dilakukan proses imobilisasi. Kombinasi massa enzim selulase dari *T.reesei* dan *A.niger* adalah 2:1. Sedangkan *chitosan* dan *chitosan-GDA* yang

digunakan untuk proses hidrolisis adalah 0,1 gram. Sehingga enzim yang digunakan untuk proses hidrolisa sebesar 0,067 gram untuk enzim selulase dari *T.reesei* dan 0,033 gram untuk enzim selusase dari *A.niger* pada masing-masing variabel yang akan digunakan.

Proses hidrolisis dengan menggunakan enzim (gambar 4.10) dimulai dengan menyiapkan sabut kelapa yang telah mengalami proses *pretreatment* sebanyak 1 gram ditambahkan enzim selulase dari *T.reesei* = 0,067 gram ; enzim selulase dari *A.niger* = 0,033 gram ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan buffer fosfat pH 7 kedalam enzim hingga volumenya 20 ml. Penambahan buffer digunakan untuk mengkondisikan proses hidrolisa pada pH 7. Setelah itu, erlenmeyer yang berisi sabut kelapa dan enzim dimasukkan ke dalam *incubator shaker* pada suhu 60°C dengan kecepatan 125 rpm selama 48 jam.

Metodologi hidrolisa enzim terimobilisasi ini ditunjukkan pada gambar 4.10



(a)

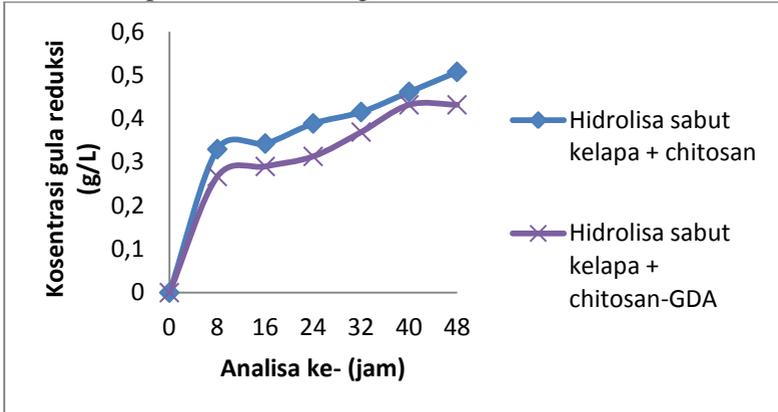


(b)

Gambar 4.10 (a) Metodologi Hidrolisis Substrat Sabut Kelapa dengan Enzim yang Terimobilisasi dengan *Chitosan*, (b) Metodologi Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim yang Terimobilisasi dengan *Chitosan-GDA*

Analisa konsentrasi gula reduksi yang terbentuk pada proses hidrolisa dilakukan dengan menggunakan metode DNS. Analisa gula reduksi dilakukan pada setiap 8 jam sekali yaitu pada jam ke-8, 16, 24, 32, 40 dan 48. Analisa DNS yang digunakan sama dengan analisa gula yang dilakukan saat pengujian hasil imobilisasi enzim dengan substrat CMC. Sampel sebanyak 1 ml diambil dengan menggunakan pipet volume lalu dimasukkan ke dalam *microtube* kemudian ditimbang dengan neraca analitik sehingga memiliki masa gabungan (*microtube* + larutan + tutup) yang sama antara *tube* 1 dengan 13 pada *centrifuge* nantinya. Karena proses sentrifugasi dilakukan dengan *centrifuge* kecil maka ketelitian penimbangannya adalah 0,01 gram. Kemudian campuran disentrifugasi selama 10 menit, dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4⁰C. Proses sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan antara padatan (*solid*) dari sabut kelapa dengan larutan (*supernatant*) pada proses hidrolisa. Setelah itu sebanyak 0,2 ml larutan (*supernatant*) dari setiap sampel diambil dengan menggunakan pipet volum kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 1,8 ml dan DNS sebanyak 3 ml kemudian divortex.

Pengulangan proses hidrolisa untuk ketiga variabel dilakukan sebanyak 2 kali. Berdasarkan analisa yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut :

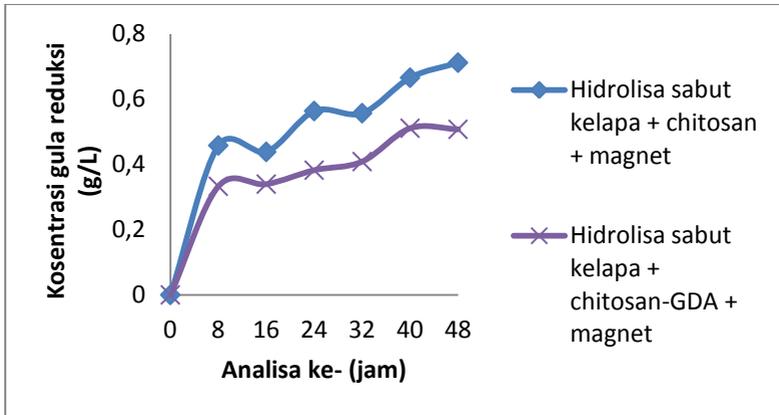


Gambar 4.11 Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Hidrolisis Substrat Sabut Kelapa dengan *Carrier Chitosan* dan *Carrier Chitosan-GDA*

Dari gambar 4.11 dapat dilihat bahwa konsentrasi gula reduksi mengalami kenaikan secara signifikan. Peningkatan konsentrasi ini menunjukkan bahwa enzim yang terimobilisasi pada *chitosan* dan *chitosan-GDA* dapat menghidrolisa sabut kelapa menjadi gula reduksi. Hasil gula reduksi yang dihasilkan oleh kedua jenis enzim menunjukkan optimum pada jam ke-48. Gambar 4.11 juga menunjukkan perbandingan hasil hidrolisa dari *carrier chitosan* dan *chitosan-GDA*. Konsentrasi gula reduksi dari hidrolisa dengan *carrier chitosan* mempunyai hasil yang lebih tinggi daripada *carrier chitosan-GDA*. Bila konsentrasi larutan glutaraldehida lebih rendah menyebabkan sisi aktif dalam kitosan kurang, jumlah enzim yang terimobilisasi juga kurang serta aktivitas enzim yang terimobilisasi lebih rendah. Dengan konsentrasi larutan glutaraldehida yang meningkat menyebabkan gugus amino kitosan diaktivasi, jumlah immobilisasi enzim juga meningkat. Namun, bila konsentrasi larutan glutaraldehida terlalu

banyak, chitosan mengikat aldehid aktif yang berlebihan, yang menyebabkan molekul enzim membentuk ikatan multi titik dengan carrier, sehingga ada hambatan struktural spasial untuk menonaktifkan enzim. Sementara jumlah enzim terikat yang meningkat pada aldehid aktif dapat mengubah struktur ruang pusat aktif (Chen *et al.*, 2013)

Salah satu tujuan imobilisasi enzim dengan menggunakan *chitosan* yaitu agar enzim dapat digunakan kembali. Namun pada penelitian ini enzim terimobilisasi yang berukuran kecil telah menyatu dan memiliki warna yang sama dengan sabut kelapa sehingga sulitnya proses pemisahan, maka dilakukan modifikasi *chitosan* dengan penambahan partikel magnet. Hasil dari modifikasi *chitosan* magnet juga dihidrolisa dengan menggunakan substrat sabut kelapa. Pembuatan *chitosan* magnet ini hampir sama dengan pembuatan *chitosan microparticle* akan tetapi ditambahkan magnet pada proses pembuatan larutan *chitosan*+asam asetat dengan perbandingan massa *chitosan* dengan magnet yaitu 1:2. Setelah *chitosan* magnet terbentuk, *chitosan* magnet tersebut juga diimobilisasi dengan perlakuan yang sama seperti sebelumnya. Enzim yang terimobilisasi pada *chitosan* magnet tersebut juga diukur kadar protein yang terabsorb. Kemudian enzim yang telah terimobilisasi tersebut dapat digunakan untuk hidrolisa. Hasil konsentrasi gula reduksi dengan *chitosan* magnet dan *chitosan*-GDA magnet adalah sebagai berikut :



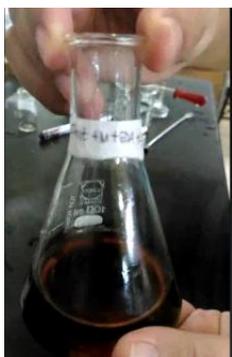
Gambar 4.12 Kurva Perbandingan Konsentrasi Gula Reduksi pada *Carrier Chitosan Magnetic* dan *Chitosan-GDA Magnetic*

Dari gambar 4.12 dapat dilihat bahwa, pada hidrolisa sabut kelapa dengan menggunakan *carrier chitosan-GDA + magnet* terjadi kenaikan yang signifikan namun pada saat jam ke-48, konsentrasi gula reduksi turun. Hasil konsentrasi gula reduksi dari hidrolisa sabut kelapa dengan *chitosan-GDA+magnet* pada jam ke-8; 16; 24; 32; 40 dan 48 berturut-turut adalah sebesar 0,03328 g/L; 0,3394 g/L; 0,3822 g/L; 0,4086 g/L; 0,5107 g/L dan 0,5074. Untuk hidrolisa sabut kelapa dengan *carrier chitosan+magnet* juga terjadi kenaikan, akan tetapi pada jam ke-32 hasil konsentrasi gula reduksi turun, kemudian naik lagi pada jam ke-48. Hasil konsentrasi gula reduksi dari hidrolisa sabut kelapa dengan *chitosan-GDA+magnet* pada jam ke-8; 16; 24; 32; 40 dan 48 berturut-turut adalah sebesar 0,458 g/L; 0,4382 g/L; 0,5634 g/L; 0,5569 g/L; 6656 g/L dan 0,7117 g/L. Dari gambar tersebut dapat disimpulkan bahwa, konsentrasi gula reduksi pada hidrolisa dengan menggunakan *chitosan+magnet* lebih tinggi dibandingkan dengan *chitosan-GDA+magnet*. Konsentrasi gula reduksi *chitosan+magnetic* yang lebih tinggi dari *chitosan* tanpa magnet ini diduga karena bentuk morfologi *chitosan* magnet yang tidak berpori seperti *chitosan* tanpa magnet sehingga meskipun jumlah enzim yang terimobilisasi lebih sedikit dari yang tanpa

magnet tetapi semua enzim terimobilisasi pada permukaan carier. Hal ini menyebabkan kontak enzim dengan subtrat menjadi lebih baik.

IV.5.2.3 Pemisahan Enzim dengan Substrat Sabut Kelapa

Seperti yang telah dijelaskan di atas, adanya kesulitan untuk memisahkan enzim selulase dengan substrat sabut kelapa. Cara yang digunakan untuk memisahkan enzim yakni dengan menggunakan magnet. Berikut adalah metodologi pemisahan sabut kelapa dengan enzim terimobilisasi dengan *chitosan magnetic*.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

Gambar 4.13 Metodologi Pemisahan Enzim dengan Sabut Kelapa

- (a) Campuran Enzim dan Sabut Kelapa, (b) Magnet, (c) Persiapan Penumpahan Ke Dalam *Beaker Glass* dengan Ditaruh Magnet Di Bawah Erlenmeyer, (d) Penumpahan Sabut Kelapa, (e) *Chitosan* Magnet Menempel Pada Dinding Erlenmeyer Karena Magnet

Halaman Ini Sengaja Dikosongkan

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan hasil analisa yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan berupa :

1. *Chitosan* yang dihasilkan merupakan *chitosan microparticle* dengan ukuran antara 815,0 μm – 305,1 μm .
2. Persentase jumlah protein yang terserap di dalam *chitosan* pada variabel 6 mg, 9 mg, 12 mg, 15 mg dan 18 mg secara berturut-turut adalah 92,60%; 91,12%; 91,12%; 83,63% dan 83,23%. Protein terimobilisasi terbaik yaitu 6 mg protein dengan % protein terimobilisasi sebesar 92,60%.
3. Protein terimobilisasi dengan menggunakan *carrier chitosan-GDA* menyerap enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* menyerap lebih baik daripada *carrier chitosan* saja dengan % protein terimobilisasi hampir 100 %
4. Kombinasi enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* dapat menghasilkan glukosa yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan tanpa kombinasi dengan perbandingan massa enzim selulase dari *T.reesei* dan *A.niger* = 2:1.
5. Konsentrasi gula reduksi hasil hidrolisa dengan kombinasi enzim *T.reesei* dan *A.niger* = 2:1 pada *carrier chitosan* sebesar 1,020 g/L dan pada *carrier chitosan-GDA* sebesar 0,881 g/L. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan GDA saat proses hidrolisa tidak memberikan pengaruh yang signifikan.
6. Penggunaan magnet yang bertujuan untuk memisahkan antara *chitosan* terimobilisasi dengan sabut kelapa dapat dilakukan.

V.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah

1. Perlu dicari kondisi optimum dalam melakukan imobilisasi enzim agar hasil yang didapatkan lebih baik, yakni %GDA yang digunakan.
2. Perlu dipertimbangkan untuk melakukan pengambilan data secara *triplo* pada saat proses imobilisasi dan hidrolisis sebagai data pembandingan agar diketahui hasil maksimal dari proses imobilisasi dan hidrolisis.
3. Perlu dipelajari lebih mendalam tentang penambahan magnet dan efeknya terhadap ikatan disekitarnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd El-Ghaffar, M.A. dan Hashem, M.S. 2010. *Chitosan* and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization. *Carbohydrate Polymers* 81(2010):507-516.
- Ahamed, A. dan Vermette, P. 2008. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma Reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal* 40 (2008):339-407.
- Ahamed, A. dan Vermette, P. 2008. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus Niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 42:41-46.
- Altfren, J., Hobley, T.J. 2014. Immobilization of cellulases on magnetic particles to enable enzyme recycling during hydrolysis of lignocellulose. *Tesis*. National Food Institute, Technical University of Denmark.
- Anwar, N., Widjaja, A., dan Winardi, S. 2011. Study of the enzymatic hydrolysis of alkaline pretreated rice straw using cellulase of various sources and compositions. *International Review of Chemical Engineering* Vol. 3, N.2.
- Asgher, M., Shahid, M., Kamal S., dan Iqbal H.M.N. 2014. Review recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 101:56–66.
- Azhar, M., Efendi, J., Syofyeni, E., Lesi, R.M., dan Novalina, S. 2010. Pengaruh konsentrasi NaOH dan KOH terhadap derajat deasetilasi kitin dari limbah kulit udang. *EKSAKTA* Vol. 1 tahun XI Februari 2010.
- Biro, E., Nemeth A.S., Sisak, C., Feczko, T., dan Gyenis J. 2008. Preparation of chitosan particle suitable for enzyme immobilization. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70(2008):1240-1246.

- Blackburn, R.S. 2005. *Biodegradable and sustainable fiber*. Woodhead Publishing Limited in association with The Textile Institute Abington Hall, Abington, Cambridge CB1 6AH, England.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254 (1976).
- Brena, B., Pombo, P.G., dan Viera, F. B. 2013. *Immobilization of enzymes and cells*. Humana Press.
- Çetinus, S.A. dan Öztop, H.N. 2003. Immobilization of catalase into chemically crosslinked *chitosan* beads. *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003) 889–894.
- Chen, H., Zhang, Q., Dang, Y., dan Shu, G. 2013. The effect of glutaraldehyde cross-linking on the enzyme activity of immobilized β -galactosidase on *chitosan* bead. *Advance Journal of Food Science and Technology* 5(7):932-935.
- Dahot, M.U. dan Noomrio, M.H. 1996. Microbial production of cellulases by *aspergillus fumigatus* using wheat straw as a carbon source. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 9:4, 119-124.
- Denkbas, E.B., Kilicay, E., Birlikseven, C., dan Ozturk, E. 2002. Magnetic *chitosan* microspheres: preparation and characterization. *Reactive & Functional Polymers* 50 (2002):225-232.
- Ikram-ul-haq., Javed, M. M., Khan, T.S., dan Siddiq, Z. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *trichoderma viride*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(3):241-245.
- Juhasz, T., Kozma, K., Szengyel, Z., dan Reczey, K. 2003. Production of β -Glucosidase in Mixed Culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30. *Food Technol. Biotechnol.* 41 (1) 49–53 (2003).
- Khan, T.A., Peh, K.K. dan Ch'ng, H.S. 2002. Reporting

- degree of deacetylation of *chitosan* : the influence of analytical methods. *J.Pharm Pharmaceut Sci* 5(3):205-212.
- Krajewska, B. 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35 : 126–139.
- Kumar, M. N. V. R. 2000. A review of chitin and *chitosan* applications. *Reactive and Functional Polymers* Vol 46, Hal. 1-27.
- Martins, L.F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J.P., dan Ramos, L.P. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology* 99 1417–1424.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Quarfermasfer Research and Engineering Center*. Vol 31 no.3.
- Mulder, M. 1991. *Basic principle of membrane technology*. 2nd ed. Kluwer Academic Publisher. Netherland.
- Muzzarelli R.A.A. 2009. Chitin and chitosan hydrogels. *Handbook of hydrocolloids*.
- Oktavia, F. 2015. Peran produk olahan sabut kelapa sebagai penunjang kelestarian ekologi. *Prosiding Konferensi Nasional Kelapa VIII* .
- Panzavolta, F., Soro, S., D'Amato, R., Palocci, C., Cernia, E., dan Russo, M.V. 2005. Acetylenic polymers as new immobilization matrices for lipolytic enzymes. *Journal of Molecular Catalyst B: Enzymatic* 32:67-76.
- Pillai, C.K.S., Paul, W., dan Sharma, C.P. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34 : 641–678.
- Pospiskova, K. dan Safarik, I. 2013. Low-cost, easy-to-prepare magnetic *chitosan* microparticles for enzymes immobilization. *Carbohydrate Polymers* 96 (2013) 545–548.
- Prado, J.M., Caneiro, T.F., Rostagno, M.A., Romero, L.A.F.,

- Filho, F.M., dan Meireles, M.A.A. 2014. Obtaining sugars from coconut husk, defatted grape seed, and pressed palm fiber by hydrolysis with subcritical water. *J. of Supercritical Fluids* 89:89–98
- Rivers, D.B., Zanin, G.M., dan Emert, G.H. 1984. Evaluation of sugar cane bagasse and rice straw as process substrates for the production of ethyl alcohol. *Biomass Research Center, University of Arkansas, Fayetteville, AR72701*.
- Roberts, G.A.F. 1992. *Chitin Chemistry*. 1st edition. The Macmillan Press Ltd. London.
- Sangian, H.F., Kristian, J., Rahma, S., Dewi, H.K., Puspasari, D.A., Agnesty, S.Y., Gunawan, S., Widjaja, A. 2015. Preparation of reducing sugar hydrolyzed from high-lignin coconut coir dust pretreated by the recycled ionic liquid [mmim][dmp] and combination with alkaline. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 10 (1): 8-22.
- Sukardati, S., Kholisoh, S.D., Prasetyo, H., Santoso, W.P., dan Mursini, T. 2010. Produksi gula reduksi dari sabut kelapa menggunakan jamur *T.reesei*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”.
- Widjaja, A. 2009. *Aplikasi bioteknologi pada industri pulp dan kertas*. Itspress. Surabaya.
- Yang, B., Dai, Z., Ding S.Y., dan Wyman, C.E. 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels* 2(4), 421-450.
- Yazdani-Pedram, M., Retuert, J., dan Quijada, R. 2000. Synthesis and swelling behavior of poly(acrylic acid) grafted chitosan. *Hydrogels based on modified chitosan, I*.
- Zhao, X., Qi, F., Yuan, C., Du, W., dan Liu, D. 2015. Lipase-catalyze process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 44:182–197.
- Zheng, P., Wang, J., Lu, C., Xu, Y., dan Sun, Z. 2013. Immobilized β -glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose. *Process Biochemistry* 48: 683-687.

APPENDIKS A

A-1 PERHITUNGAN KADAR SELULOSA, HEMISELULOSA, DAN LIGNIN PADA SABUT KELAPA MENGGUNAKAN METODE CHESSON

Tabel A.1.1 Data Massa pada berbagai Tahapan Metode Chesson

Variabel	Massa (gr)				
	a	b	c	d	e
Untreated	1,000	0,8493	0,6594	0,4359	0,0048
Pretreatment NaOH 1%	1,0005	0,7997	0,5729	0,3373	0,0015

A.1.1 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Sabut Kelapa Sebelum *Pretreatment*

1. Perhitungan Kadar Selulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,6594-0,4359)/1 \times 100\% \\ &= 22,35\%\end{aligned}$$

2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,8493-0,6594)/1 \times 100\% \\ &= 18,99\%\end{aligned}$$

3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,4359-0,0048)/1 \times 100\% \\ &= 43,11\%\end{aligned}$$

A.1.2 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Sabut Kelapa Setelah *Pretreatment* NaOH 1%

1. Perhitungan Kadar Selulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,573-0,337)/1,0005 \times 100\% \\ &= 23,55\%\end{aligned}$$

2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,799-0,573)/1,0005 \times 100\% \\ &= 22,67\%\end{aligned}$$

3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,337-0,002)/1,0005 \times 100\% \\ &= 33,56 \%\end{aligned}$$

Hasil perhitungan kadar selulosa, hemiselulosa, dan lignin sabut kelapa pada berbagai variabel ditampilkan pada tabel berikut.

Tabel A.1.2 Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Sabut Kelapa Sebelum dan Setelah Pretreatment

Variabel	Kadar (%)		
	Selulosa	Hemiselulosa	Lignin
<i>Untreated</i>	22,35	18,99	43,11
NaOH 1%	23,55	22,67	33,56

A-2

PERHITUNGAN KURVA STANDAR GLUKOSA UNTUK MENGUKUR AKTIVITAS ENZIM

$$\begin{aligned} \text{Massa glukosa} &= 0,3735 \text{ gram} \\ \text{Volume buffer sitrat pH 5,5} &= 100 \text{ ml} \\ \text{BM glukosa} &= 180 \text{ gram/mol} \\ \text{Mol glukosa} &= \text{massa glukosa/BM} \\ &= 0,3735 \text{ gram} / 180 \text{ gr/mol} \\ &= 0,002 \text{ mol} \\ &= 2075 \text{ } \mu\text{mol} \\ \text{Konsentrasi glukosa awal} &= \text{mol glukosa/ volume buffer sitrat} \\ \text{pH 5,5} &= 2075 \text{ } \mu\text{mol}/100 \text{ ml} \\ &= 20,75 \text{ } \mu\text{mol/ml} \end{aligned}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}} \\ &= \frac{20,75 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \\ &= 4,15 \text{ } \mu\text{mol/ml} \end{aligned}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Berikut adalah hasil kurva standar glukosa.

Tabel A.2.1 Data Konsentrasi dan Absorbansi Glukosa pada Kurva Standar Glukosa untuk Mengukur Aktifitas Enzim

Larutan Glukosa (ml)	Buffer (ml)	Diambil (ml)	CMC (ml)	V total (ml)	Konsentrasi ($\mu\text{mol/ml}$)	A
0	5	0,2	1,8	5	0	0,000
1	4	0,2	1,8	5	4,15	0,068
2	3	0,2	1,8	5	8,3	0,137
3	2	0,2	1,8	5	12,45	0,232
4	1	0,2	1,8	5	16,6	0,308
5	0	0,2	1,8	5	20,75	0,426

Setelah diplot antara konsentrasi gula reduksi vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapatkan persamaan $y = 51,647x$ dengan y sebagai konsentrasi glukosa ($\mu\text{mol/ml}$) dan x sebagai absorbansi.

A-3 PERHITUNGAN AKTIVITAS ENZIM

Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase dari *A.niger* dan *T.reesei*
Contoh perhitungan Enzim Selulase dari *A.niger*:

1. Pengukuran aktivitas enzim selulase

$$\text{Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1)} = 1,077$$

$$\text{Absorbansi larutan koreksi (A2)} = 0,84$$

$$\begin{aligned} \text{Absorbansi larutan setelah koreksi (A)} &= A1 - A2 \\ &= 0,237 \end{aligned}$$

2. Konsentrasi glukosa

$$= A \times \text{slope kurva standar glukosa}$$

$$= 0,237 \times 51,647$$

$$= 12,240 \mu\text{mol/ml}$$

3. Aktivitas enzim selulase (U/ml)
 = mol glukosa / (volume enzim x waktu inkubasi)
 = 12,240 μ mol / (0,2 ml x 10 menit)
 = 6,120 U/ ml

Pembuatan enzim selulase dari *A.niger* dilakukan sebanyak 3 kali dan pembuatan enzim selulase dari *T.reesei* sebanyak 1 kali dikarenakan banyaknya volume enzim yang dibutuhkan pada saat imobilisasi. Untuk aktivitas enzim yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama.

A-4 **PERHITUNGAN BRADFORD (PENGUKURAN KADAR PROTEIN)**

A.4.1. Perhitungan Kurva Standar Bradford

1. Membuat larutan standar bovine serum albumin (BSA)

Massa BSA = 0,1 gram

Volume *aquadest* = 100 ml

Konsentrasi BSA = massa BSA / volume *aquadest*

= 0,1 gram / 100 ml

= 100 mg / 100 ml

= 1 mg/ml

2. Membuat larutan NaCl 0,15 M

BM NaCl = 58,44 gram/mol

Massa NaCl = 5,844 gram

Volume *aquadest* = 666 ml

Konsentrasi NaCl = mol NaCl / Volume pelarut

= (Massa NaCl / BM NaCl) / (Volume Pelarut (ml) / 1000 ml)

= (5,844 gram / 58,44 gram/mol) / (666 ml / 1000 ml)

= 0,15 M

Kemudian dari tiap-tiap BSA diencerkan dengan konsentrasi 0,1 hingga 1. Hasil perhitungannya ditunjukkan pada tabel A.4.1 berikut

Tabel A.4.1 Data Konsentrasi dan Absorbansi Protein dengan BSA pada Kurva Standar Bradford untuk Mengukur Kadar Protein Enzim

	Volume BSA (ml)	Volume NaCl (ml)	Volume Dye Reagent (ml)	Konsentrasi	A
Blanko	0	0,1	5	0	0
1	0,01	0,09	5	2	0,09
2	0,02	0,08	5	4	0,13
3	0,03	0,07	5	6	0,218
4	0,04	0,06	5	8	0,303
5	0,05	0,05	5	10	0,337

Kemudian diplot antara konsentrasi BSA dengan absorbansinya untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapatkan persamaan $y = 28,075x$ dengan y sebagai konsentrasi protein (mg/ml) dan x sebagai absorbansi

A.4.2. Perhitungan kadar protein Enzim Selulase dari *A.niger* dan *T.reesei*

Contoh perhitungan Enzim Selulase dari *A.niger* :

1. Konsentrasi protein

$$= A \times \text{slope kurva standar protein (BSA)}$$

$$= 0,013 \times 28,075$$

$$= 0,370 \text{ mg}$$

2. Perhitungan Kebutuhan Enzim Selulase dari *A.niger*

Goal protein terimobilisasi = 6 mg protein

Kebutuhan enzim selulase

= $\frac{\text{goal protein terimobilisasi}}$

Konsentrasi enzim

= $\frac{6 \text{ mg}}$

0,370 mg/ ml

= 16,2 ml

A.4.3. Perhitungan Kadar Protein Enzim Selulase dari *A.niger*

Setelah Imobilisasi

Diambil sampel kadar protein selulase dalam *supernatant* setelah imobilisasi dengan *chitosan*

1. Konsentrasi protein

= A x slope kurva standar protein (BSA)

= 0,002 x 28,075

= 0,0562 mg

2. Kadar protein total *supernatant* Enzim Selulase dari *A.niger*

= Konsentrasi protein x (volume enzim untuk

imobilisasi+*buffer phosphate* ph 7)(ml)

= 0,0562 mg/ml x (16,2+1) ml

= 0,9658 mg

3. Total protein yang terserap pada membran Chitosan

= Kadar protein sebelum imobilisasi – kadar protein dalam supernatan

= 6 mg – 0,9658 mg

= 5,0342 mg

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, pembuatan enzim selulase dari *A.niger* dilakukan sebanyak 3 kali dan pembuatan enzim selulase dari *T.reesei* sebanyak 1 kali. Untuk konsentrasi protein enzim yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama.

A-5

PERHITUNGAN KURVA STANDAR GLUKOSA UJI GULA UNTUK HIDROLISA

A.5.1. Perhitungan Kurva Standar Gula Reduksi Hidrolisa

Massa glukosa = 0,3674 gram

Volume buffer sitrat pH 5,5 = 100 ml

Konsentrasi glukosa awal

= massa glukosa/ volume buffer sitrat pH 5,5

= 0,3674 gram/100 ml

= 0,0036 gram/ml

= 3,674 gram/L

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi

= $\frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$

= $\frac{3,674 \text{ gram/L} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$

= 0,7348 gram/L

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi gula reduksi vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan $y = 6,5904 x$ dengan y sebagai konsentrasi gula reduksi (gram/L) dan x sebagai absorbansi.

A-6 PERHITUNGAN HIDROLISIS

Perhitungan Konsentrasi, Massa, Perbandingan Gula Reduksi, dan Yield Gula Reduksi

1. Perhitungan konsentrasi gula reduksi dari hidrolisis enzim selulase

Perhitungan Kurva Standar Gula Reduksi untuk Hidrolisis telah ditunjukkan pada appendix A.5.1 dengan persamaan $y = 6,5904 x$ dengan y sebagai konsentrasi gula reduksi (gram/L) dan x sebagai absorbansi

Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis enzim selulase pada chitosan terimobilisasi dengan substrat sabut kelapa pada jam ke-8

Absorbansi = 0,050

Absorbansi (y) = 6,5904 x

Konsentrasi gula reduksi (x) = $(0,050 \times 6,5904)$
= 0,330 gram/L

A-7
PERHITUNGAN CHESSON

Variabel	Massa (gr)					
	a	b	c	d	e	
<i>Untreated</i>	1	0,8493	0,6594	0,4359	0,0048	
<i>Pretreatment</i> NaOH 1%	1,0005	0,7997	0,5729	0,3373	0,0015	
Variabel	Kadar (%)					
	HWS	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin	Abu	Total
<i>Untreated</i>	15,07	18,99	22,35	43,11	0,48	100,00
<i>Pretreatment</i> NaOH 1%	20,07	22,67	23,55	33,56	0,14993	100,00

A-8
PERHITUNGAN AKTIVITAS ENZIM SELULASE DARI *A.NIGER* DAN *T.REESEI*

Enzim		Absorbansi (A)			Slope	Konsentrasi (μmol/ml)	Aktivitas (U/ml)
		A1	A2	A			
<i>A.niger</i>	1	1,077	0,84	0,237	51,647	12,240	6,120
	2	1,406	1,199	0,207	51,647	10,691	5,345
	3	1,111	0,895	0,216	51,647	11,156	5,578
<i>T.reesei</i>	1	0,398	0,046	0,352	51,647	18,180	9,090

A-9**PERHITUNGAN KONSENTRASI PROTEIN DAN VOLUME UNTUK IMOBILISASI ENZIM
SELULASE DARI *A.NIGER* DAN *T.REESEI***

Enzim		A1	A2	A	Slope	Konsentrasi	Protein terimobilisasi (mg)	Volume (ml)
<i>A.niger</i>	1	0,011	0,015	0,013	28,075	0,370	6	16,2
	2	0,022	0,016	0,019	28,075	0,529	6	11,3
	3	0,027	0,029	0,028	28,075	0,791	6	7,6
<i>T.reesei</i>	1	0,16	0,175	0,167	28,075	4,698	6	1,3

A-10
PERHITUNGAN BRADFORD PADA ENZIM *T.REESEI* TERIMOBILISASI PADA
***CHITOSAN* UNTUK MENENTUKAN MG PROTEIN IMOBILISASI TERBAIK**

		A1	A2	A	Konsentrasi dalam reagen (mg/mL)	Volume Reagen (mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)	% terimobilisasi
<i>T.Reesei</i>	6 mg	0,004	0,020	0,012	0,3416	1,30	0,4441	5,556	92,60
	9 mg	0,021	0,009	0,015	0,4164	1,92	0,7996	8,200	91,12
	12 mg	0,013	0,017	0,015	0,4164	2,56	1,0661	10,934	91,12
	15 mg	0,027	0,027	0,027	0,7674	3,20	2,4556	12,544	83,63
	18 mg	0,030	0,026	0,028	0,7861	3,84	3,0186	14,981	83,23

A-11
**PERHITUNGAN BRADFORD ENZIM *A.NIGER* DAN *T.REESEI* TERIMOBILISASI PADA
*CHITOSAN***

	A	Slope	Konsentrasi dalam reagen (mg/mL)	Volume Reagen (mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)	
<i>A.niger</i>	1	0,012	28,075	0,3369	17,2	5,7947	0,2053
	2	0,003	28,075	0,0842	17,2	1,4487	4,5513
	3	0,008	28,075	0,2246	17,2	3,8631	2,1369
	4	0,001	28,075	0,0281	17,2	0,4829	5,5171
	5	0,012	28,075	0,3369	17,2	5,7947	0,2053
	6	0,002	28,075	0,0562	17,2	0,9658	5,0342
	A	Slope	Konsentrasi dalam reagen (mg/mL)	Volume Reagen (mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)	
<i>A.niger</i>	1	0,010	28,075	0,2808	12,3	3,453	2,547
	2	0,009	28,075	0,2527	12,3	3,108	2,892

	A	Slope	Konsentrasi dalam reagen (mg/mL)	Volume Reagen (mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)	
<i>A.niger</i>	1	0,008	28,075	0,2246	8,6	1,932	4,068
	2	0,014	28,075	0,3931	8,6	3,380	2,620
	3	0,011	28,075	0,3088	8,6	2,656	3,344
	4	0,010	28,075	0,2808	8,6	2,414	3,586

	A	Slope	Konsentrasi dalam reagen (mg/mL)	Volume Reagen (mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)	
<i>T.reesei</i>	1	0,012	28,075	0,3369	2,3	0,775	5,225
	2	0,009	28,075	0,2386	2,3	0,549	5,451
	3	0,019	28,075	0,5194	2,3	1,195	4,805
	4	0,009	28,075	0,2527	2,3	0,581	5,419
	5	0,007	28,075	0,1965	2,3	0,452	5,548
	6	0,003	28,075	0,0842	2,3	0,194	5,806

		A	Slope	Konsentrasi dalam reagen (mg/mL)	Volume Reagen (mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)
<i>T.reesei</i>	0,1 gram	0,015	28,075	0,4211	2,3	0,969	5,031
	1 gram	0,009	28,075	0,2527	14	3,537	2,463

A-12

PERHITUNGAN BRADFORD ENZIM *A.NIGER* DAN *T.REESEI* TERIMOBILISASI PADA CHITOSAN+GDA

		A	Slope	Konsentrasi dalam reagen (mg/mL)	Volume Reagen (mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)
<i>A.niger</i>	1	0,000	28,075	0,000	12,3	0,000	6,000
	2	0,007	28,075	0,187	12,3	2,302	3,698
	3	0,000	28,075	0,000	12,3	0,000	6,000
	4	0,000	28,075	0,000	12,3	0,000	6,000
	5	0,003	28,075	0,084	12,3	1,036	4,964

A-15

<i>T.reesei</i>	1	0,000	28,075	0,000	2,3	0,000	6,000
	2	0,006	28,075	0,154	2,3	0,355	5,645
	3	0,000	28,075	0,000	2,3	0,000	6,000
	4	0	28,075	0,000	2,3	0,000	6,000

A-13

PERHITUNGAN BRADFORD ENZIM *A.NIGER* DAN *T.REESEI* TERIMOBILISASI PADA CHITOSAN+MAGNET

		A	Slope	Konsentrasi dalam reagen (mg/mL)	Volume Reagen (mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)
<i>A.niger</i>	1	0,01	28,075	0,2808	8,6	2,414	3,586
	2	0,021	28,075	0,5896	8,6	5,070	0,930
<i>T.reesei</i>	1	0,045	28,075	1,2634	2,3	2,906	3,094
	2	0,052	28,075	1,4599	2,3	3,358	2,642

A-14**PERHITUNGAN BRADFORD ENZIM *A.NIGER* DAN *T.REESEI* TERIMOBILISASI PADA
CHITOSAN+*GDA*+*MAGNET***

		A	Slope	Konsentrasi dalam reagen (mg/mL)	Volume Reagen (mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)
<i>A.niger</i>	1	0,013	28,075	0,3650	12,3	4,489	1,511
	2	0,016	28,075	0,4492	12,3	5,525	0,475
<i>T.reesei</i>	1	0,058	28,075	1,6284	2,3	3,745	2,255
	2	0,047	28,075	1,3195	2,3	3,035	2,965

A-15
PERHITUNGAN HIDROLISIS DENGAN SUBSTRAT CMC

Enzim Selulase	A	Slope	Konsentrasi (g/L)
<i>A. niger</i>	0,037	6,590	0,244
<i>T. reesei</i>	0,048	6,590	0,316
Kombinasi <i>A. niger</i> dan <i>T. reesei</i> (2:1)	0,155	6,590	1,020
Kombinasi <i>A. niger</i> dan <i>T. reesei</i> (1:2)	0,123	6,590	0,906
Kombinasi <i>A. niger</i> dan <i>T. reesei</i> (1:1)	0,152	6,590	0,942

A-16
PERHITUNGAN HIDROLISIS PADA JAM KE-8

Variabel	A1	A2	A	Slope	Konsentrasi gula reduksi (g/L)
Sabut kelapa + chitosan	0,050	0,050	0,050	6,590	0,330
Microcrystalline + chitosan	0,021	0,025	0,023	6,590	0,152
Sabut kelapa + chitosan+ GDA	0,040	0,041	0,041	6,590	0,267
Microcrystalline + chitosan + GDA	0,016	0,021	0,019	6,590	0,122
Sabut kelapa + chitosan + magnet	0,074	0,065	0,070	6,590	0,458
Sabut kelapa + chitosan + GDA + magnet	0,047	0,054	0,051	6,590	0,333

A-17
PERHITUNGAN HIDROLISIS PADA JAM KE-16

Variabel	A1	A2	A	Slope	Konsentrasi gula reduksi (g/L)
Sabut kelapa + chitosan	0,052	0,052	0,052	6,590	0,343
Microcrystalline + chitosan	0,030	0,021	0,026	6,590	0,168
Sabut kelapa + chitosan+ GDA	0,045	0,043	0,044	6,590	0,290
Microcrystalline + chitosan + GDA	0,019	0,015	0,017	6,590	0,112
Sabut kelapa + chitosan + magnet	0,077	0,056	0,067	6,590	0,438
Sabut kelapa + chitosan + GDA + magnet	0,050	0,053	0,052	6,590	0,339

A-18
PERHITUNGAN HIDROLISIS PADA JAM KE-24

Variabel	A1	A2	A	Slope	Konsentrasi gula reduksi (g/L)
Sabut kelapa + chitosan	0,059	0,059	0,059	6,590	0,389
Microcrystalline + chitosan	0,024	0,019	0,022	6,590	0,142
Sabut kelapa + chitosan+ GDA	0,048	0,047	0,048	6,590	0,313
Microcrystalline + chitosan + GDA	0,028	0,022	0,025	6,590	0,165
Sabut kelapa + chitosan + magnet	0,106	0,065	0,086	6,590	0,563
Sabut kelapa + chitosan + GDA + magnet	0,051	0,065	0,058	6,590	0,382

A-19
PERHITUNGAN HIDROLISIS PADA JAM KE-32

Variabel	A1	A2	A	Slope	Konsentrasi gula reduksi (g/L)
Sabut kelapa + chitosan	0,063	0,063	0,063	6,590	0,415
Microcrystalline + chitosan	0,022	0,015	0,019	6,590	0,122
Sabut kelapa + chitosan+ GDA	0,060	0,052	0,056	6,590	0,369
Microcrystalline + chitosan + GDA	0,029	0,025	0,027	6,590	0,178
Sabut kelapa + chitosan + magnet	0,107	0,062	0,085	6,590	0,557
Sabut kelapa + chitosan + GDA + magnet	0,058	0,066	0,062	6,590	0,409

A-20
PERHITUNGAN HIDROLISIS PADA JAM KE-40

Variabel	A1	A2	A	Slope	Konsentrasi gula reduksi (g/L)
Sabut kelapa + chitosan	0,070	0,070	0,070	6,590	0,461
Microcrystalline + chitosan	0,033	0,031	0,032	6,590	0,211
Sabut kelapa + chitosan+ GDA	0,068	0,063	0,066	6,590	0,432
Microcrystalline + chitosan + GDA	0,044	0,040	0,042	6,590	0,277
Sabut kelapa + chitosan + magnet	0,125	0,077	0,101	6,590	0,666
Sabut kelapa + chitosan + GDA + magnet	0,074	0,081	0,078	6,590	0,511

A-21
PERHITUNGAN HIDROLISIS PADA JAM KE-48

Variabel	A1	A2	A	Slope	Konsentrasi gula reduksi (g/L)
Sabut kelapa + chitosan	0,077	0,077	0,077	6,590	0,507
Microcrystalline + chitosan	0,029	0,032	0,031	6,590	0,201
Sabut kelapa + chitosan+ GDA	0,066	0,065	0,066	6,590	0,432
Microcrystalline + chitosan + GDA	0,016	0,024	0,020	6,590	0,132
Sabut kelapa + chitosan + magnet	0,131	0,085	0,108	6,590	0,712
Sabut kelapa + chitosan + GDA + magnet	0,074	0,080	0,077	6,590	0,507

BIODATA PENULIS I



Lidya Lorenta Sitompul terlahir di Cimahi, Jawa Barat pada tanggal 21 November 1993. Penulis menempuh pendidikan formal di SD Negeri V Cimahi, kemudian pendidikan menengah pertama di SMP Negeri 2 Cimahi dan menengah atas di SMA Negeri 3 Cimahi dan melanjutkan pendidikan diploma III di Politeknik Negeri Bandung Jurusan Teknik Kimia. Pada tahun 2015 penulis melanjutkan pendidikan sarjana di Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS), Fakultas Teknologi Industri,

Departemen Teknik Kimia. Penulis melakukan penelitian di Laboratorium Teknologi Biokimia sampai dengan terselesaikannya buku ini. Penulis menjalani kerja praktek di PT PETROSIDA Gresik selama satu bulan (Agustus 2016).

Penulis menyelesaikan tugas Pra-Desain **“Pabrik Semen PCC”** dan skripsi yang berjudul **“Produksi Gula Reduksi Dari Sabut Kelapa Dengan Menggunakan Kombinasi Enzim Selulase Dari *A.Niger* Dan *T.Reesei* Terimobilisasi Pada *Chitosan Magnetic Microparticle*”** di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng. Apabila ada kritik dan saran yang membangun tentang penelitian ini, maka pembaca dapat menghubungi penulis via email: lidyalorenta@gmail.com.

BIODATA PENULIS II



Irma Nurhanifah Fenda Putri terlahir di Surabaya, Jawa Timur pada tanggal 12 Juli 1994. Penulis menempuh pendidikan formal di SD Negeri Kendangsari II/277, Surabaya, kemudian pendidikan menengah pertama di SMP Negeri 13 Surabaya dan menengah atas di SMA Negeri 16 Surabaya dan melanjutkan pendidikan diploma III di Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya Jurusan Teknik Kimia. Pada tahun 2015 penulis melanjutkan pendidikan sarjana di

Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS), Fakultas Teknologi Industri, Departemen Teknik Kimia. Penulis melakukan penelitian di Laboratorium Teknologi Biokimia sampai dengan terselesaikannya buku ini. Penulis menjalani kerja praktek di PT PETROSIDA Gresik selama satu bulan (Agustus 2016).

Penulis menyelesaikan tugas Pra-Desain **“Pabrik Semen PCC”** dan skripsi yang berjudul **“Produksi Gula Reduksi Dari Sabut Kelapa Dengan Menggunakan Kombinasi Enzim Selulase Dari *A.Niger* Dan *T.Reesei* Terimobilisasi Pada *Chitosan Magnetic Microparticle*”** di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng. Apabila ada kritik dan saran yang membangun tentang penelitian ini, maka pembaca dapat menghubungi penulis via email: irmanfp@gmail.com