



TESIS - 142541

**IMOBILISASI SELULASE DAN XYLANASE PADA
MAGNETIC KITOSAN UNTUK PRODUKSI GULA
REDUKSI**

**SIDRATU AINIYAH
02211550012002**

DOSEN PEMBIMBING

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

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

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

IMOBILISASI SELULASE DAN XYLANASE PADA MAGNETIK
KITOSAN UNTUK PRODUKSI GULA REDUKSI

Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar

Magister Teknik (MT)

di

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

Sidratu Ainiyah

Nrp. 02211550012002

Tanggal Ujian : Januari 2018

Periode Wisuda : Maret 2018

Disetujui oleh :

- | | | |
|--|--------------|---|
| 1. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng | (Pembimbing) |  |
| NIP. 19660523 199102 1 001 | | |
| 2. Setyo Gunawan ST, PhD | (Penguji 1) |  |
| NIP. 19760323 2002121 001 | | |
| 3. Dr. Lailatul Qadariyah ST, MT | (Penguji 2) |  |
| NIP. 19760918 2003122 002 | | |
| 4. Siti Zulfaiqah ST, MT, Ph.D | (Penguji 3) |  |
| NIP. 19780716 2008122 002 | | |

Dekan Fakultas Teknologi Industri

Institut Teknologi Sepuluh Nopember



Dr. Bambang Lelono Widjiantoro, ST., MT

NIP. 19690507 199512 1 001

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

Imobilisasi Selulase dan Xylanase Pada *Magnetic* Kitosan Untuk Produksi Gula Reduksi

Nama Mahasiswa : Sidratu Ainayah
NRP : 02211550012002
Pembimbing : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng.

ABSTRAK

Teknologi enzim menjadi salah satu metode yang paling banyak dikembangkan saat ini. Enzim menjadi salah satu biokatalis spesifik yang bekerja untuk memecah ataupun membentuk ikatan kimia. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh imobilisasi selulase dan xylanase pada *magnetic* kitosan dan untuk mengetahui kondisi operasi yang optimal pada imobilisasi selulase dan xylanase. Pada penelitian ini, tahapan awal imobilisasi enzim dilakukan untuk mengetahui kondisi operasi optimum enzim terimobilisasi. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui variable (temperatur dan rpm) yang signifikan berpengaruh. Pendekatan yang digunakan adalah analisis ANOVA. Sedangkan untuk karakterisasi material kitosan digunakan SEM serta uji FTIR menggunakan kombinasi metode *covalent attachment & cross-linking*. Berdasarkan hasil uji SEM diketahui bahwa material *magnetic* kitosan berukuran antara 0.1748 - 4.092 μ m, selain itu hasil FTIR menunjukkan hasil yang positif terjadi perubahan gugus pada kitosan non magnet setelah berikatan dengan magnet dan setelah terimobilisasi enzim. Sedangkan metode analisis gula reduksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah DNS (asam dinitrosalisilat) dan metode untuk analisis kadar protein adalah Bradford. Tahapan akhir penelitian dilakukan imobilisasi xylanase & selulase serta mengukur parameter degradasinya pada lignoselulosa. Material *support* yang digunakan untuk imobilisasi enzim pada penelitian ini adalah *magnetic* kitosan. *Magnetic* kitosan mampu menjaga stabilitas enzim terimobilisasi terhadap kondisi operasi serta *reusable*. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa kadar protein enzim yang terimobilisasi pada *magnetic* kitosan mencapai 100% untuk selulase, sedangkan 88% untuk xylanase. Aplikasi xylanase bersama dengan selulase yang terimobilisasi pada magnetik kitosan (perbandingan 1:1) mampu menghasilkan *yield* gula reduksi 0.05gr (tertinggi).

Kata kunci: Imobilisasi, selulase, xylanase, *magnetic* kitosan, gula reduksi.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

Cellulase and Xylanase Immobilized to Chitosan Magnetic for Production Reduction Sugar

Student Name : Sidratu Ainiyah
NRP : 02211550012002
Advisor : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng.

ABSTRACT

Enzyme technology is one of the most developed methods enzymes become one of the specific biocatalysts to break down or form chemical bonds. The aim of this research was to determine the effect of immobilization of cellulase & xylanase on magnetic chitosan and to know the optimal operating conditions. The first step of this research was enzyme immobilization to determine the optimum condition immobilized enzyme. Target of this step is, to determine the variables (temperature and rpm) that significantly influence. Then, analysis approach assisted with ANOVA. For cellulase immobilization process, temperature, rotation and interaction between temperature and rotation had a significant effect (P value <0.05). While xylanase immobilization process, only temperature and interaction between temperature and rotation had different significant effect. The optimum operating conditions obtained was at 25°C 150rpm. For characterization of chitosan materials assisted with SEM and FTIR. Based on SEM results known that size of magnetic material chitosan about 0.1748 - 4.092 μ m, in addition FTIR results showed that the covalent and cross linking binding were change after immobilized enzyme. The analysis method for reducing sugar used DNS (Dinitrosalisilat Acid) and method for protein content analysis used Bradford reagen. The final step of this research were immobilized xylanase & cellulase and measured its degradation parameters on lignocellulose. The material support used for enzyme immobilization in this research is magnetic chitosan. Magnetic chitosan used to maintain immobilized enzyme stability against operating conditions and reusable. Based on the result of research known that enzyme immobilized protein level on magnetic chitosan reach 100% for cellulase, while 88% for xylanase. The highest yield of reducing sugar 0.05gr with enzyme coupling (1: 1 ratio, cellulase:xylanase).

Keywords: Immobilization, cellulases, xylanases, chitosan magnetic, reducing sugar.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

KATA PENGANTAR

Dengan mengucap syukur Alhamdulillah kepada ALLAH SWT atas berkat rahmat dan hidayah-Nya, akhirnya penulis dapat menyelesaikan laporan kemajuan 1 tesis dengan judul **Imobilisasi Selulase dan Xylanase Pada *Magnetic* Kitosan Untuk Produksi Gula Reduksi.**

Laporan sebagai salah satu syarat untuk kelulusan program Magister di Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya (FTI – ITS). Pada kesempatan ini, saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bantuan dalam penyelesaian laporan kemajuan ini kepada :

1. Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi sebagai pemberi beasiswa penelitian.
2. Bapak Juwari ST.M.Eng. PhD selaku Ketua Jurusan Teknik Kimia FTI – ITS.
3. Bapak Dr. Tantular Nurtono, ST. M.Eng .selaku Ketua Program PascasarjanaJurusanTeknik Kimia FTI – ITS.
4. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja M.Eng. selaku Dosen Pembimbing
5. Saudara Afan Hamzah ST. selaku pendamping dan koordinator penelitian.
6. Seluruh anggota Laboratorium Teknologi Biokimia atas bantuan dan kerja samanya.
7. Rekan – rekan angkatan 2015 Pascasarjana Jurusan Teknik Kimia FTI – ITS.
8. Ibu dan Ayah (keluarga), suami tercinta yang selalu memberikan dukungan serta doa yang tiada henti. Serta semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu. Semoga laporan kemajuan tesis ini dapat menambah ilmu pengetahuan khususnya dibidang Teknik Kimia serta bagi masyarakat dan bangsa Indonesia.

Surabaya, 19 Desember 2017

Penulis

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan.....	4
BAB 2 KAJIAN PUSTAKA	5
2.1 Imobilisasi Enzim.....	5
2.1.1 Faktor Yang Mempengaruhi Aktifitas Enzim Pada Proses Imobilisasi ...	6
2.1.1.1 Pengaruh Temperatur	6
2.1.1.2 Pengaruh Shear	7
2.1.1.3 Pengaruh pH	7
2.2 Selulase.....	7
2.3 Xylanase	9
2.4 Kitosan.....	11
2.5 Magnetik Kitosan	13
2.6 Imobilisasi Multi Enzim	14
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN.....	17
3.1 Rancangan Penelitian	17
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	18
3.3 Alat dan Bahan	18
3.4 Preparasi	19

3.4.1 Pembuatan larutan DNS (Asam dinitrosalisilat) (Widjaja, 2009).....	19
3.4.2 Pembuatan larutan CMC (<i>Carboxymetil Cellulose</i>) (Widjaja, 2009)	19
3.4.3 Pembuatan kurva standar glukosa untuk mengukur aktifitas enzim (Widjaja, 2009)	19
3.4.4 Preparasi sederhana mikropartikel kitosan untuk imobilisasi enzim.	20
3.4.5 Preparasi sederhana mikropartikel <i>magnetic</i> kitosan untuk imobilisasi enzim dengan metode <i>Entrapped Magnetic</i> (ENCH) (Pospiskova and Safarik, 2013).....	20
3.4.6 Imobilisasi enzim ((Biró, Sz, <i>et al.</i> , 2008) termodifikasi untuk optimasi).....	20
3.4.7 Imobilisasi enzim dengan <i>magnetic</i> kitosan ((El-Ghaffar and Hashem, 2010) termodifikasi).....	20
3.4.8 Imobilisasi enzim dengan <i>magnetic</i> kitosan termodifikasi menggunakan GDA (El-Ghaffar and Hashem, 2010; Pospiskova and Safarik, 2013)	21
3.4.9 Pretreatmen sabut kelapa (lignocelulosa) secara kimiawi (NaOH 1%)	21
3.5 Uji Enzim Terimobilisasi	22
3.5.1 Persiapan uji enzim terimobilisasi dengan metode Bradford.....	22
3.5.2 Pembuatan larutan standar protein (Bradford, 1976).....	22
3.5.3 Analisis enzim terimobilisasi dengan metode Bradford (Bradford, 1976)	22
3.5.4 Uji enzim terimobilisasi dengan FTIR (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>).....	23
3.6 Pengukuran Kadar Glukosa	23
3.6.1 Pembuatan kurva standar glukosa untuk uji aktivitas enzim terimobilisasi dan hidrolisis glukosa.....	23
3.6.2 Analisis kadar glukosa (substrat: CMC) enzim terimobilisasi dengan metode DNS ((‘Anwar(2008) termodifikasi)	23

3.6.3 Analisis kadar glukosa (substrat: xylan) enzim terimobilisasi dengan metode DNS termodifikasi)	24
.....	24
3.7 Prosedur Hidrolisis dengan Enzim Terimobilisasi (Anwar, 2008)	24
.....	24
3.8 Analisis Statistik	25
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Hasil Preparasi kitosan (<i>material support</i>)	27
4.2 Kurva Standart Protein	30
4.3 Kurva Standart Glukosa	32
4.3.1 Pembuatan kurva standar glukosa untuk uji aktivitas enzim terimobilisasi dan hidrolisis glukosa	32
4.4 Imobilisasi Enzim	34
4.4.1 Analisis hasil optimasi selulase terimobilisasi	37
4.4.2 Uji asumsi yang digunakan untuk mengetahui hasil asumsi apakah sesuai dengan IIDN (Identik, Independen dan Berdistribusi Normal)	41
4.4.2.1 Asumsi distribusi normal	41
4.4.2.2 Asumsi identik	41
4.4.2.3 Asumsi independen	42
4.4.3 Analisis hasil optimasi xylanase terimobilisasi	42
4.4.3.1 Asumsi distribusi normal	46
4.4.3.2 Asumsi identik	47
4.4.3.3 Asumsi independen	47
4.5 Hidrolisis	48
4.5.1 Hidrolisis Substrat Sabut Kelapa (hasil pretreatment)	50
4.5.2 Pemisahan Enzim dengan Subtrat	51
4.6 Uji FTIR	52
4.7 Uji BET	54
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	55
5.1 Kesimpulan	55

5.2 Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA	57
Lampiran A	A
Lampiran B	E
BIODATA PENULIS	K

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Perbedaan metode imobilisasi enzim menggunakan reagen multifungsional.....	6
Gambar 2.2 Degradasi selulosa oleh sistem selulase.....	9
Gambar 2.3 Degradasi selulosa oleh sistem selulase.....	9
Gambar 2.4 Struktur xylan dan sisi aktif yang bereaksi dengan enzim <i>xylanolytic</i>	10
Gambar 2.5 Struktur kitin dan kitosan.....	11
Gambar 2.6 Penghilangan gugus asetil pada gugus asetamida.....	12
Gambar 2.7 Mekanisme reaksi kitosan.....	13
Gambar 3.1 Rancangan penelitian	18
Gambar 3.2 Rangkaian alat pretreatment NaOH 1%	22
Gambar 3.3 Model data untuk analisis statistik	25
Gambar 4.1 (a) dan (b) Kitosan hasil pretreatment (non magnet)	28
Gambar 4.2 (a) dan (b) SEM kitosan perbesaran 5000x.....	30
Gambar 4.2 (c) Magnetik kitosan	30
Gambar 4.3 Kurva standart protein.....	31
Gambar 4.4 Kurva standart CMC	32
Gambar 4.5 Kurva standart xylan	33
Gambar 4.6 Uji DNS.....	34
Gambar 4.7 (a) dan (b) Foto hasil percobaan pemisahan supernatan setelah imobilisasi.....	34
Gambar 4.7 (c) Mekanisme imobilisasi enzim	36
Gambar 4.8 Plot residual selulase	41
Gambar 4.9 Hasil <i>Levene's Test</i> Residual Selulase	42
Gambar 4.10 Plot residual xylanase.....	46
Gambar 4.11 Hasil <i>Levene's Test</i> Residual Xylanase	47
Gambar 4.12 Kurva standart glukosa tanpa CMC	49
Gambar 4.13 Grafik konsentrasi gula hasil hidrolisa sabut kelapa oleh kombinasi enzim terimobilisasi.....	50
Gambar 4.14 Foto hasil percobaan pemisahan magnetik kitosan	51
Gambar 4.15 Grafik hasil uji FTIR.....	53

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 a. Hasil SEM kitosan.....	29
Tabel 4.1 b. Perbandingan kadar protein terimobilisasi pada 25° C 150rpm pada material kitosan non magnet maupun magnetic kitosan	35
Tabel 4.2 Hasil <i>Two Way ANOVA selulase</i>	37
Tabel 4.3 Hasil uji <i>Tukey</i> kategori RPM.....	37
Tabel 4.4 Hasil uji <i>Tukey</i> kategori suhu.....	38
Tabel 4.5 Hasil pengelompokkan berdasarkan perbedaan pengaruh interaksi suhu dengan RPM pada tiap kategori.....	40
Tabel 4.6 Hasil <i>Two Way ANOVA xylanase</i>	42
Tabel 4.7 Hasil uji <i>Tukey</i> Kategori RPM xylanase	43
Tabel 4.8 Hasil uji <i>Tukey</i> kategori suhu xylanase.....	44
Tabel 4.9 Hasil pengelompokan berdasarkan interaksi RPM dengan suhu	45
Tabel 4.10 Kombinasi hidrolisis sabut kelapa oleh selulase dan xylanase	48
Tabel 4.11 a. Perhitungan kurva standart glukosa untuk hidrolisis tanpa CMC....	49
Tabel 4.11 b. Konsentrasi gula hasil hidrolisa sabut kelapa oleh kombinasi enzim terimobilisasi.....	50
Tabel 4.12 Hasil uji FTIR	52
Tabel 4.13 Hasil uji BET	54

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan teknologi terjadi hampir di seluruh lini kehidupan. Teknologi paling sederhana seperti pada bioteknologi yang melibatkan mikroorganisme mulai tergantikan dengan inovasi lebih ramah lingkungan dan efisien (Brena and Batista-viera, no date; Lee, 2001). Teknologi enzim menjadi salah satu metode yang paling banyak dikembangkan saat ini. Enzim menjadi salah satu biokatalis spesifik yang bekerja untuk memecah ataupun membentuk ikatan kimia (Lee, 2001).

Aplikasi enzim dapat diklasifikasikan menjadi 3 kategori utama yaitu enzim untuk proses industri, enzim untuk proses analisis dan enzim untuk kesehatan (Lee, 2001; Shrivastava, Lata and Shukla, 2012). Pada penelitian ini enzim diaplikasikan untuk memproduksi gula reduksi. Metode yang umum digunakan pada produksi gula reduksi mengacu pada (Pe, 2002) yaitu secara kimiawi, mekanis dan gabungan diantara keduanya. Akan tetapi hal tersebut dirasa kurang efisien. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah imobilisasi enzim. Manfaat utama teknik imobilisasi enzim adalah *reusable* dan dapat dipisahkan dengan pelarutnya serta stabil pada *continous flow reactor* (Lee, 2001). Selain itu proses hidrolisa enzimatis yang diketahui memiliki banyak keunggulan yaitu menghasilkan yield produk lebih besar (Fermentation and Yield, 1981), selektifitas lebih tinggi, membutuhkan lebih sedikit energi, kondisi operasi yang lebih moderat dan ramah lingkungan (Chen, Zhao and Xia, 2008). Namun yang juga harus diperhatikan adalah produksi gula reduksi menggunakan enzim membutuhkan ketelitian pada kondisi operasi tertentu karena umumnya enzim memiliki karakter molekul kurang stabil, resisten dan sangat spesifik (Lee, 2001; Weir and McSpadden, 2010; Sujoy and Aparna, 2013).

Imobilisasi enzim dapat dilakukan pada permukaan atau di dalam material pendukung dengan metode fisika atau kimia. Metode fisika antara lain adalah metode *adsorpsi*, *entrapment* dan *microencapsulation*, sedangkan metode kimia

antara lain *covalent attachment* dan *cross-linking*. Menurut (Lee, 2001), metode fisika secara *adsorpsi* memiliki beberapa kelemahan yaitu ikatan imobilisasinya lemah, sangat sensitif pada pH larutan dan suhu, serta jumlah enzim terimobilisasi sangat kecil. Metode fisika kedua adalah *entrapment*, teknik dimana enzim dijebak diantara polimer yang dihubungkan (*high cross-linked polymer*). Namun, teknik ini memiliki kelemahan dimana enzim yang diimobilisasi akan terdeaktifasi selama proses pembentukan gel dan rentan terjadi kebocoran (Lee, 2001). Berdasarkan penelitian Javed et.al dalam (Brena and Batista-viera, no date) metode tersebut pernah diterapkan pada enzim selulase dengan mengimobilisasi enzim β -*glucosidase* pada material polimer berskala nano (*polyurethane, latex dan silicon*). Teknik fisika ketiga adalah *microencapsulation*, yaitu dengan mengimobilisasi enzim pada membran *semipermeable* mikrokapsul. Kelemahan metode ini adalah rentan terjadinya *clogging* (penyumbatan) dan *fouling* (Brena and Batista-viera, no date).

Metode kimia secara *covalent attachment* merupakan metode imobilisasi yang paling sering digunakan karena ikatan yang terbentuk antara enzim dan material pendukung lebih kuat dari pada metode fisika (Panzavolta et al, 2005 dalam (El-Ghaffar and Hashem, 2010)). Ikatan yang dibentuk adalah ikatan antara residu asam amino non-esensial di dalam enzim seperti α -, β -, atau γ - *carboxyl group, amino group phenyl, hydroxyl, sulfhydryl* atau *imidazole group* dengan gugus fungsional dari material pendukungnya. Ikatan tersebut perlu untuk terlebih dahulu diaktifkan dengan reagen tertentu sebelum ditambahkan ke dalam enzim (Lee, 2001). Berdasarkan penelitian (El-Ghaffar and Hashem, 2010) yang melakukan imobilisasi selulase pada material pendukung kitosan, *chitosan-l-glutamic acid* dan *chitosan-4-amino butyric acid*, didapatkan bahwa kombinasi metode *covalent attachment* dengan *cross-linking* menggunakan GDA menghasilkan kestabilan dan *retained activity* yang lebih tinggi. Sehingga dalam penelitian ini akan digunakan kombinasi metode yang sama (El-Ghaffar and Hashem, 2010), ditambah dengan melakukan imobilisasi xylanase dan mengukur parameter degradasinya pada lignoselulosa. Hal tersebut dilakukan agar degradasi enzimatik selulosa oleh enzim selulase serta degradasi hemiselulosa oleh enzim xylanase dapat saling bersinergi untuk mengatasi kompleksitas struktur

lignoselulosa, yang umumnya menjadi kendala utama. Dengan demikian perolehan gula reduksinya akan dapat ditingkatkan.

Xylanase dan selulase memiliki struktur polisakarida spesifik (Howard *et al.*, 2003) dan dapat diolah menjadi gula reduksi (Ramadhani, Kumala and Widjaja, 2015). Aplikasi xylanase bersama dengan selulase diharapkan mampu menghasilkan *yield* gula reduksi yang lebih besar. Tidak hanya glukosa saja yang dihasilkan pada proses degradasi selulosa, tetapi juga xylosa sebagai hasil degradasi hemiselulosa. Kedua komponen, baik glukosa maupun xylosa dapat dikonversi menjadi biohidrogen, sehingga *yield* hidrogen akan menjadi lebih tinggi. Demikian pula untuk lebih memudahkan proses degradasi selulosa, maka digunakan xylanase. Hemiselulosa merupakan perekat antara selulosa dan lignin, sehingga dengan ikut terdegradasinya hemiselulosa oleh xylanase, maka akses selulase untuk menyerang selulosa akan lebih mudah sehingga konversi selulosa menjadi glukosa akan menjadi lebih tinggi. Selanjutnya produk gula reduksi dari proses tersebut dapat difermentasi menjadi *biofuel* (Silvério, 2013) seperti biohidrogen ataupun bioetanol serta untuk bahan baku bermacam-macam produk seperti *levulinic acid*, asam laktat, dan *5-hydroxymethylfurfural* (Fermentation and Yield, 1981; Ahmed *et al.*, 2013; Cheng and Chang, 2013).

Selain itu, yang juga menjadi perhatian utama dalam penelitian ini adalah pemilihan *material support* (matriks). Umumnya immobilisasi enzim dilakukan pada material pendukung yang *soluble* (Romo-sánchez *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Penggunaan material ini dapat memecahkan masalah transfer massa antara enzim dengan substrat *insoluble* (Lee, 2001). Tetapi muncul permasalahan bahwa *soluble material* sangat sensitif dan tidak stabil terhadap perubahan kondisi operasi (Biró, Németh, *et al.*, 2008). Di sisi lain, penelitian (El-Ghaffar and Hashem, 2010) menggunakan material *insoluble* kitosan untuk menjaga stabilitas enzim terimmobilisasi terhadap kondisi operasi. Akan tetapi, yang akan menjadi permasalahan selanjutnya adalah bagaimana memisahkan matriks dengan enzim terimmobilisasi agar dapat digunakan kembali (*reusable*). Menurut (Pospiskova and Safarik, 2013, 2015; Safarik *et al.*, 2014) matriks kitosan dapat dimodifikasi menjadi *magnetic* kitosan. Hal tersebut dilakukan untuk meningkatkan stabilitas dan aktifitas enzim terimmobilisasi. Sehingga mudah digunakan, *low cost* dan

reusable. Sangat prospektif apabila diaplikasikan pada industri kimia (Pospiskova and Safarik, 2013). Keunggulan lainnya, kitosan berukuran cukup kecil dan berasal dari material organik (*bio*) (Krajewska, 2004; Pillai, Paul and Sharma, 2009; Romo-sánchez *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Hal tersebut berhubungan semakin luas sisi aktif enzim dan *internal diffusion hindrance* berkurang jika ukuran *carrier* enzim semakin kecil (Biró, Németh, *et al.*, 2008). Kitosan terhitung cukup terjangkau, inert, hidrofilik, dan *compatible* sebagai matriks sehingga cocok untuk imobilisasi (Dittmann, 2000; Kumar and Wyman, 2009). Kitosan juga memiliki gugus amino memudahkan terjadinya ikatan kovalen (Krajewska, 2004; El-Ghaffar and Hashem, 2010; Santos-moriano, Woodley and Plou, 2016). Sehingga dalam penelitian ini akan digunakan hasil dari modifikasi kitosan menjadi *magnetic* kitosan, sebagai *material support* (matriks) dengan metode yang mengacu pada (El-Ghaffar and Hashem, 2010) dan (Pospiskova and Safarik, 2013).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, permasalahan dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Belum diterapkannya kombinasi imobilisasi enzim selulase dan xylanase pada hidrolisis lignoselulosa menggunakan *magnetic* kitosan.
2. Belum diketahui secara detil berapakah temperatur dan rpm yang optimal pada kondisi operasi imobilisasi selulase dan xylanase menggunakan matriks *magnetic* kitosan.

1.3 Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui pengaruh imobilisasi selulase dan xylanase pada *magnetic* kitosan.
2. Mengetahui kondisi operasi yang optimal pada imobilisasi selulase dan xylanase.

BAB 2 KAJIAN PUSTAKA

2.1 Imobilisasi Enzim

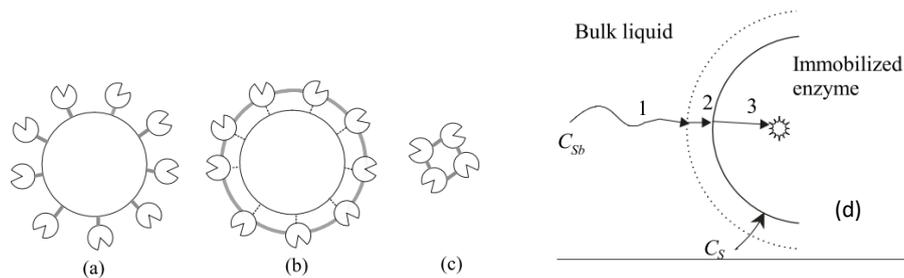
Enzim merupakan biokatalis berupa protein alami yang dihasilkan oleh sel hidup seperti pada hewan, tanaman dan mikroorganisme. Seluruh proses yang melibatkan enzim bersifat spesifik. Fungsi utama enzim adalah sebagai katalis pada pembentukan maupun penguraian ikatan kimia. Enzim mengandung protein globular yang larut di dalam air sehingga sangat sulit memisahkan enzim untuk digunakan kembali pada *batch process*. Enzim dapat diimobilisasi pada permukaan atau bagian inti matriks menggunakan metode kimiawi dan fisika. Enzim juga dapat diimobilisasi pada kondisi *soluble* dengan mempertahankannya dalam suatu membran *semipermeable* (Lee, 2001).

Manfaat utama imobilisasi enzim adalah dapat digunakan kembali dan dengan mudah dipisahkan dari pelarutnya. Teknik imobilisasi enzim diklasifikasikan menjadi dua metode yaitu secara kimiawi dan fisika. Ikatan yang terbentuk adalah ikatan yang tergantung adanya ikatan kovalen dan ikatan yang tergantung pada ikatan non kovalen. Metode fisika diantaranya adalah metode *adsorpsi*, *entrapment* dan *microencapsulation*. Sedangkan metode antara lain *covalent attachment* dan *cross-linking* (Lee, 2001).

Metode kimiawi melalui *covalent attachment* adalah metode imobilisasi yang paling sering digunakan. Ikatan yang terjadi antara enzim dengan *material support* lebih kuat dari pada yang terjadi secara fisika (El-Ghaffar and Hashem, 2010). Ikatan yang dibentuk pada *covalent attachment* adalah residu asam amino non-esensial di dalam enzim seperti α -, β -, atau γ - *carboxyl group*, α -, β -, *amino group phenyl*, *hydroxyl*, *sulfhydryl* atau *imidazole group* dengan gugus fungsional dari material pendukung yang biasanya perlu untuk terlebih dahulu diaktifkan dengan reagen tertentu sebelum ditambahkan ke dalam enzim (Lee, 2001).

Pada dasarnya metode imobilisasi enzim dibagi menjadi 3 kategori utama yaitu imobilisasi pada material pendukung (*carrier*), *entrapment* pada material polimer dan *cross-linking* antar molekul enzim (Shrivastava, Lata and Shukla, 2012). Imobilisasi enzim dengan suatu material pembawa (*insoluble*) dapat

meningkatkan resistensi perubahan kondisi pH dan temperatur agar dapat digunakan kembali. Hal tersebut meningkatkan efisiensi proses dan secara luas telah digunakan di industri sebagai katalis reaksi kimia (Shrivastava, Lata and Shukla, 2012). Seluruh proses tersebut terjadi tanpa adanya kerusakan pada struktur ruang tiga dimensi dari sisi aktif enzim, sehingga spesifitas substrat maupun gugus fungsi aktif tidak terpengaruh (Kokufuta, 1992).



Gambar 2.1 Perbedaan metode imobilisasi enzim menggunakan reagen multifungsional: (a) enzim diadsorb oleh sisi aktif dengan intermolekuler *cross-linking*, (b) grup fungsional ditambahkan pada matriks untuk mengikat enzim secara kovalen, dan (c) *cross-linked* enzim intermolekuler. (d) Diagram skematik alur substrat menuju *reaction site* pada imobilisasi enzim (Lee, 2001).

2.1.1 Faktor Yang Mempengaruhi Aktifitas Enzim Pada Proses Imobilisasi

Laju reaksi enzimatik dipengaruhi oleh variasi kondisi kimia dan fisika. Beberapa faktor penting itu adalah variasi konsentrasi (substrat, produk, enzim, kofaktor dan sebagainya), pH, temperatur dan *shear*. Faktor tersebut juga secara umum telah dijelaskan sebelumnya (Lee, 2001).

2.1.1.1 Pengaruh Temperatur

Laju reaksi kimia tergantung pada temperatur mengacu pada persamaan Arrhenius $k = A_0 e^{-E/RT} \dots \dots (2.57)$ (Lee, 2001) oleh karena itu apabila $\ln k$ diplot versus $1/T$ maka garis lurus slope $-E/R$ akan diperoleh. Temperatur berpengaruh pada seluruh reaksi katalitik enzimatik seperti yang dirumuskan Arrhenius. Hubungan antara laju reaksi dengan temperatur berbanding lurus, jadi apabila terjadi peningkatan temperatur maka laju reaksi juga akan lebih cepat. Hal tersebut terjadi karena atom pada molekul enzim memiliki tendensi energi dan pergerakan lebih besar. Namun bagaimanapun, temperatur memiliki batasan untuk suatu reaksi. Pada temperatur sangat tinggi proses denaturasi atau pelepasan ikatan antar molekul

enzim akan melemah sehingga menyebabkan kecepatan reaksi turun. Umumnya protein terdenaturasi pada temperatur 45° - 50°C. Beberapa enzim sangat resisten terdenaturasi pada temperatur sangat tinggi khususnya, enzim hasil isolasi dari organisme termofilik yang hidup pada lingkungan panas (Lee, 2001).

2.1.1.2 Pengaruh *Shear*

Enzim memiliki sifat rentan terhadap gaya disekelilingnya sehingga mampu merubah bentuk dan ukuran molekul yang menyebabkan denaturasi terjadi. Gaya mekanik secara normal menimbulkan kontak antar fluida, generasi oleh aliran fluida, pencampuran di dalam wadah atau pengadukan dengan agitator. Pengaruh *shear* pada stabilitas enzim sangat penting untuk mempertimbangkan desain reaktor memerlukan agitator atau tidak, dengan tujuan meminimalisir kegagalan *mass-transfer* (Lee, 2001).

2.1.1.3 Pengaruh pH

pH merupakan faktor penting yang sangat berpengaruh pada reaksi kimia melibatkan enzim baik secara *in vivo* maupun *invitro*. Enzim merupakan protein yang tersusun dari residu asam amino. Komponen tersebut memiliki gugus yang bersifat basa, netral maupun asam sehingga dapat menyebabkan kecenderungan positif ataupun negatif dengan penambahan pH. Enzim berperan sebagai katalis ketika residu asam amino pada sisi aktif memiliki muatan tertentu. Untuk itu fraksi aktif enzim sebagai katalis tergantung dari pH (Lee, 2001).

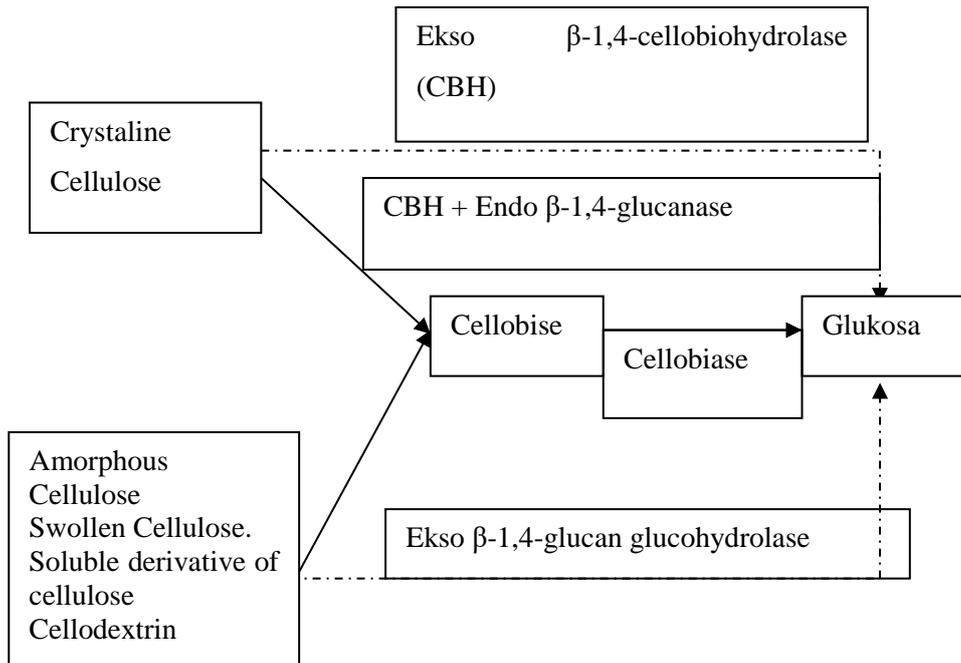
2.2 Selulase

Selulase merupakan enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis selulosa. Terdiri dari sekumpulan beberapa enzim yang bekerja secara bersama/sinergis. Pada umumnya selulase mendegradasi selulosa yang memiliki rantai yang lebih pendek dari komponen kayu (selulosa, hemiselulosa, lignin, ekstrakatif dan mineral). Rantai selulosa yang lebih pendek tersebut dapat ditemukan pada hemiselulosa (glukosa, galaktosa, manosa, xylosa, arabinosa). Komponen hemiselulosa yang mirip dengan selulosa adalah glukosa maka dari itu

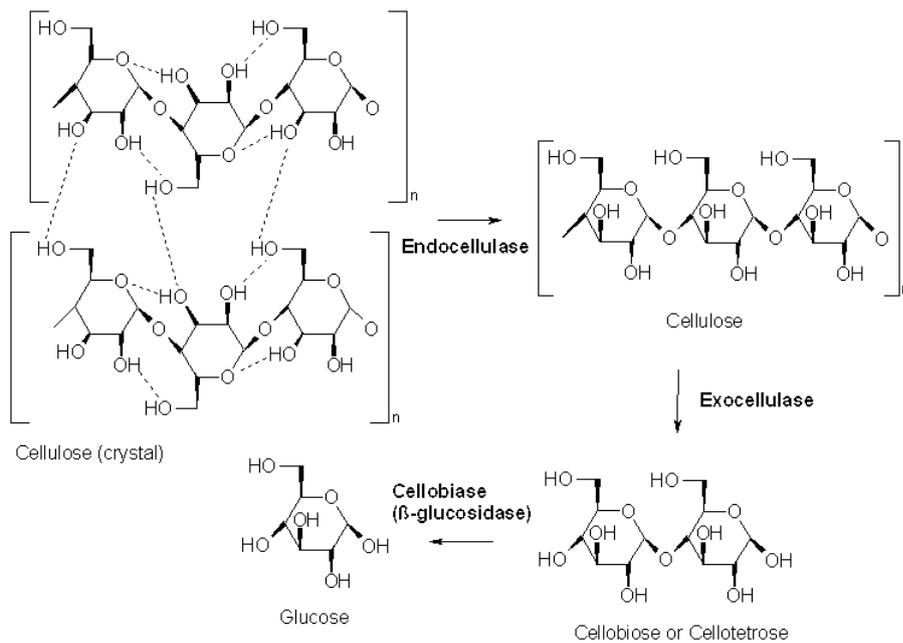
hemiselulosa terlebih dahulu terdegradasi dibandingkan dengan selulosa (Anwar, Gulfraz and Irshad, 2014).

Banyak jenis jamur yang dapat menghasilkan enzim ekstraseluler untuk mendegradasi selulosa. Diantaranya adalah *Trichoderma reesei*, *T. viride*, *T. koningi*, *T. lignorum*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium solani* dan lain sebagainya. Beberapa spesies bakteri yang juga mampu memproduksi selulase adalah *Cellulomonas* dan *Clostridium thermocellum* (Marsden and Gray, 1986). Selulase diproduksi melalui fermentasi (perendaman oleh jamur mikro selulolitik berjenis *Trichoderma* sp.) yang secara umum diklasifikasikan menjadi 3 kategori (**Gambar 2.2& 2.3**), yaitu :

1. *Endo-1,4-β-D-glucanase* (*endoselulase*, *carboxymethylcellulase* atau *CMCase*), mengurai polimer selulosa secara acak pada ikatan internal α -1,4-glikosida untuk menghasilkan oligodekstrin dengan panjang rantai yang bervariasi (Anwar, Gulfraz and Irshad, 2014). Tipe proporsi endoglukanase dan *cellobiohydrolase* pada protein ekstraseluler dari *Trichoderma reesei* yang tumbuh pada selulosa adalah 15%-20% dan 35%-85% (Marsden and Gray, 1986 dalam (Lee, 2001)).
2. *Exo-1,4-β-D-glucanase* (*cellobiohydrolase*), menghidrolisis molekul selulosa secara acak selama molekul tersebut terkombinasi dengan *cellobiohydrolases*. *Cellobiohydrolases* terurai menjadi *cellobiose* dan *glucose* dari proses non reduksi akhir pembentukan molekul selulosa (Lee, 2001).
3. β -*glucosidase* (*cellobiase*), yang mengubah selobiosa untuk menghasilkan glukosa melalui beberapa indikasi dapat mendegradasi oligosakarida (Lee, 2001).



Gambar 2.2 Degradasi selulosa oleh sistem selulase



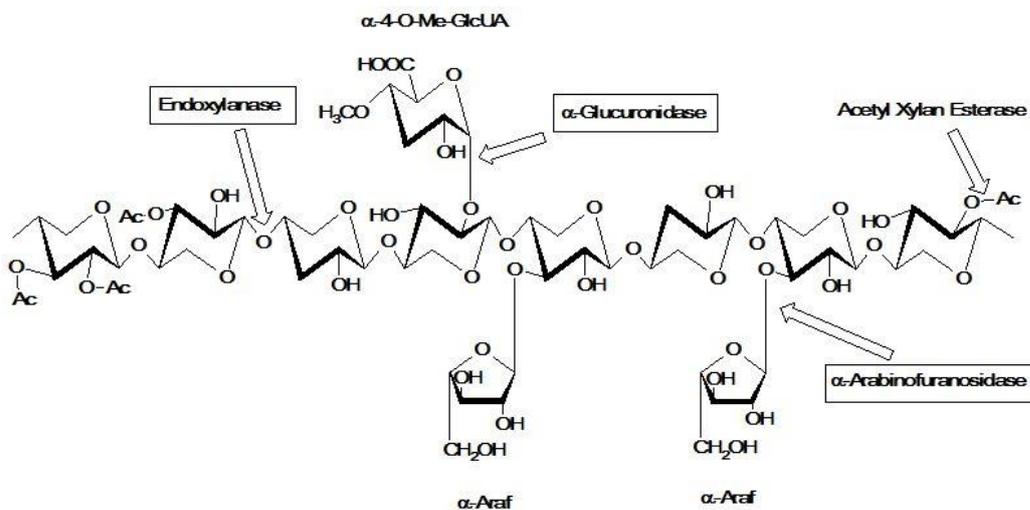
Gambar 2.3 Degradasi selulosa oleh sistem selulase

2.3 Xylanase

Xylan merupakan komponen penyusun struktur dinding sel setelah selulosa, serta jumlahnya melimpah kedua setelah polisakarida *renewable* di alam (Collins et al., 2005). Pada tumbuhan berkayu xylan ditemukan pada dinding sel sekunder bersama dengan lignin. Terbentuk dari matiks *amorphous* dan mengandung

microfibrils selulosa. Degradasi komponen ini dilakukan oleh berbagai jenis mikroorganismenya. Heterogenitas dan kompleksitas xylan menyebabkan dibutuhkannya enzim hidrolitik untuk proses degradasi (Biely, 1985; Coughlan and Hazlewood, 1993). Enzim inilah yang akan diimobilisasi dan dimanfaatkan untuk produksi gula reduksi. Sinergisitas antara xylan dengan enzim yang mampu mendegradasi secara efektif diketahui adalah xylanase dan rantai samping pembelahan enzim antara xylanase dan β -xylosidases (Coughlan et al., 1993; de Vries et al., 2000).

Xylanase (*endo- β -1,4-xylanases*, EC 3.2.1.8) terbentuk dari *xylan backbone* pada oligosakarida kecil. Keduanya merupakan kunci dari proses degradasi xylan dan polimer xylan. Xylanase aktif pada *xylooligomers* pada derajat polimerisasi lebih besar dari 2, menunjukkan peningkatan afinitas dari panjang *xylooligomers*. Xylanase termasuk enzim yang dapat melakukan hidrolisis pada ikatan dalam xylan dan bekerja secara acak. Proses tersebut dapat berpengaruh pada *yield* campuran *xylooligomers* dari polimer (Kubata et al., 1995).



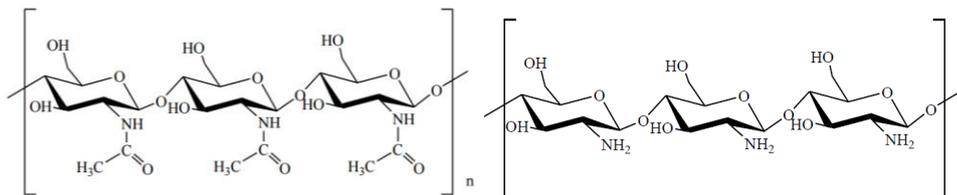
Gambar 2.4 Struktur xylan dan sisi aktif yang bereaksi dengan enzim *xylanolitik*

Seperti pada **Gambar 2.4**, rantai *backbone* pada xylan terdiri dari β -1,4-residu *xylopyranose*. Struktur *backbone* ini secara bervariasi dapat disubstitusi dengan rantai *arabinosyl*, *glucuronosyl*, *methylglucuronosyl*, *acetyl*, *feruloyl* dan residu *p-coumaroyl*. Hidrolisis *backbone* pada xylan oleh xylanase merupakan hasil hidrolisis ikatan dalam xylanase, dan β -xylosidase yang dilepaskan oleh unit *xylose* dari *xylobiose* dan *xylooligomers* ketika penghilangan rantai xylan dikatalisis oleh

α-L-arabinofuranosidases, α-D-glucuronidases, acetyl xylan esterases, ferulic acid dan residu *p-coumaric acid esterase*.

2.4 Kitosan

Kitin dan kitosan(CS) merupakan polimer alam aminopolisakarida yang memiliki struktur unik, properti multidimensi, memiliki keunggulan dapat dimanfaatkan untuk aplikasi biomedik maupun industri lain (Pillai, Paul and Sharma, 2009). Kitin tersusun dari poli-N-asetil-glukosamin(Krajewska, 2004; Ii and Kitin, 2009), sedangkan kitosan adalah kitin yang terdeasetilasi sebanyak mungkin tetapi tidak cukup sempurna untuk dinamakan sebagai poli glukosamin (**Gambar 2.5**). Kitin merupakan material yang diambil dari karapaks hewan invertebrata kelompok *Arthropoda* sp., *Molusca* sp., *Coelenterata* sp., *Annelida* sp., *Nematoda* sp.(Muzzarelli and Consulting, no date; Ii and Kitin, 2009) dan beberapa jenis jamur yang mengandung kitin (Bergey, 2005). Selain dari karapaks hewan invertebrata, kitin juga banyak ditemukan pada bagian insang ikan, *trachea*, dinding usus dan pada kulit cumi-cumi. Sumber utama kitin berasal dari deasetilasi cangkang *Crustaceae* sp., yaitu udang, lobster, kepiting, dan hewan yang bercangkang lainnya, terutama yang berasal dari laut (Muzzarelli, 1985).



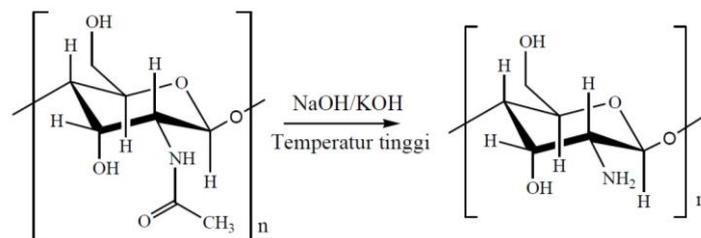
Gambar 2.5 Struktur kitin dan kitosan

Kitosan tergolong polisakarida rantai monomer lurus. Tersusun dari glukosamin yang terhubung melalui ikatan (1-4) β glikosidik (Pillai, Paul and Sharma, 2009). Kitosan merupakan padatan amorf putih yang tidak larut dalam alkali dan asam mineral kecuali pada keadaan tertentu. Kitosan merupakan molekul polimer yang mempunyai berat molekul tinggi. Keadaan tersebut menyebabkan viskositas kitosan cukup baik pada suasana asam. Kitosan hasil deasetilasi kitin larut dalam asam encer seperti asam asetat dan asam formiat (Pandey *et al.*, 2014).

Kitosan memiliki gugus amino (NH_2) yang relatif lebih banyak dibandingkan kitin sehingga lebih nukleofilik dan bersifat basa, termasuk produk biologis yang bersifat kationik, nontoksik, *biodegradable* dan biokompatibel. Kitosan tidak larut dalam air dan beberapa pelarut organik seperti dimetilsulfuroksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), pelarut alkohol organik dan piridin. Pelarut yang baik untuk kitosan adalah asam format, asam asetat dan asam glutamat. Kitosan larut dalam asam organik/mineral encer melalui protonasi gugus amino bebas (NH_2NH_3^+) pada pH kurang dari 6,5. Kelarutan kitosan menurun seiring dengan bertambah berat molekulnya. Kristalinitas kitosan yang disebabkan oleh ikatan hidrogen intermolekuler maupun intramolekuler lebih rendah dibandingkan kitin sehingga lebih mudah diaplikasikan dalam beberapa reagen. Parameter lain yang berpengaruh pada sifat kitosan adalah berat molekul (BM) dan derajat deasetilasi (DD). Derajat deasetilasi menunjukkan berkurangnya gugus asetil dari kitin menjadi gugus amino pada kitosan (Muzzarelli and Consulting, no date; Pandey *et al.*, 2014).

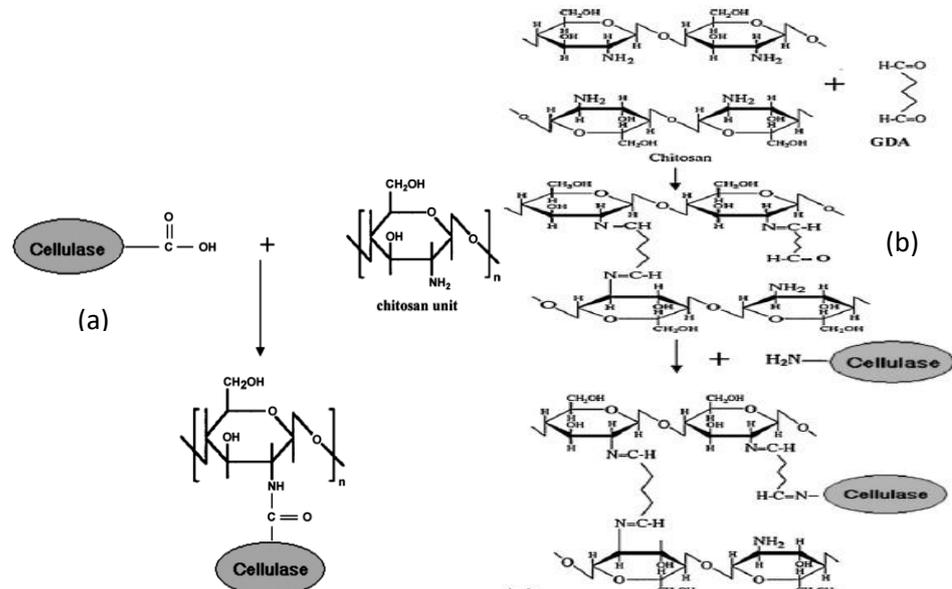
Proses penghilangan gugus asetil dinamakan deasetilasi. Proses deasetilasi bertujuan untuk memutuskan ikatan kovalen antara gugus asetil dengan nitrogen pada gugus asetamida kitin sehingga berubah menjadi gugus amina ($-\text{NH}_2$), dengan demikian pelepasan gugus asetil pada asetamida kitin menghasilkan gugus amina terdeasetilasi. Mekanisme penghilangan gugus asetil pada gugus asetamida oleh suatu basa ditunjukkan pada **Gambar 2.6**.

Proses deasetilasi kitin dilakukan menggunakan larutan NaOH pekat (Polaina Julio, 2007), yang bertujuan untuk mengubah gugus asetil dari kitin menjadi gugus amina pada kitosan (Biró, Németh, *et al.*, 2008). Perubahan ini dapat dideteksi dengan membandingkan spektra FTIR hasil deasetilasi kitin dengan sebelum dilakukan deasetilasi, pada panjang gelombang tertentu.



Gambar 2.6 Penghilangan gugus asetil pada gugus asetamida

Menurut (El-Ghaffar and Hashem, 2010) kitosan sangat baik digunakan untuk imobilisasi. Pada **Gambar 2.7** (di bawah ini) di ilustrasikan bagaimana kitosan berikatan dengan selulase.



Gambar 2.7 (a) Mekanisme Reaksi Antara Kitosan dan Selulase (b) Mekanisme Reaksi antara kitosan dengan GDA dan kitosan-GDA dengan Selulase (El-Ghaffar and Hashem, 2010).

Gugus amino pada kitosan dan kitosan-asam amino *adduct* bereaksi dengan GDA sebagai *cross-linking agent* dan kemudian selulase saling terhubung seperti pada **Gambar 2.7b**. Reaksi kitosan dengan GDA seperti telah dilakukan oleh Senay dan Oztop (2000), Wu, Hung, Giridhar dan Chiou (2003), Juang dan Min-Yun (2005), Gamze dan Senay (2007) merupakan mekanisme reaksi yang direkomendasikan untuk mereaksikan kitosan dan kitosan-asam amino dengan GDA (Lee, 2001).

2.5 Magnetik Kitosan

Imobilisasi enzim secara konvensional memiliki banyak sekali manfaat khususnya ketika di laboratorium untuk aplikasi bioteknologi. Imobilisasi enzim secara sederhana digunakan sebagai biokatalis. *Carrier* yang umum digunakan untuk imobilisasi enzim adalah kitosan (*α linear polysaccharide* terbentuk secara acak dan terdistribusi pada β-(1-4) berikatan dengan D-glucosamine dan N-acetyl-D-glucosamin). Namun, berdasarkan penelitian (Pospiskova and Safarik,

2013) diketahui bahwa penggunaan *magnetic* kitosan lebih menguntungkan karena terjangkau dan efisien. Material property *magnetic* kitosan memiliki keunggulan: *biocompatibility*, availabilitas grup fungsional yang reaktif untuk modifikasi kimia, *hydrophilicity*, stabilitas mekanik, regenerabilitas, dan mempersingkat preparasi konfigurasi geometric selama proses biotransformasi terjadi (Safarik *et al.*, 2014).

Telah banyak penelitian yang menggambarkan prosedur preparasi *magnetic* kitosan mikropartikel. Kemampuan aplikasi mereka teruji dengan imobilisasi pada dua jenis enzim. Hasil penelitian menunjukkan *carrier* dan prosedur yang digunakan sangat sederhana, *low cost* dan efisien (Pospiskova and Safarik, 2013).

2.6 Imobilisasi Multi Enzim

Imobilisasi enzim menjadi salah satu metode yang paling efisien karena dapat meminimalisir biaya produksi. Imobilisasi *single* enzim dilakukan pada material pendukung (matriks), seperti yang telah diuraikan diatas. Namun, untuk mengimobilisasi multi enzim dalam satu matriks belum pernah dilakukan. L. Betancor, 2010 dalam (Rafael *et al.*, 2016) mengatakan bahwa imobilisasi lebih dari satu enzim pada satu matriks (material pendukung) bagaimanapun itu merupakan tantangan tersendiri. Menjaga aktifitas katalitik untuk semua jenis enzim yang terlibat pada sistem dan perubahan stabilitas secara ideal. Investigasi proses imobilisasi enzim *xylanolitic* dengan metode yang berbeda-beda telah dilakukan. Dari data tersebut diketahui bahwa imobilisasi dua enzim *xylanolitic* (dalam satu matriks) telah dilakukan menurut C.R.F. Terrasan, 2015 dalam (Rafael *et al.*, 2016).

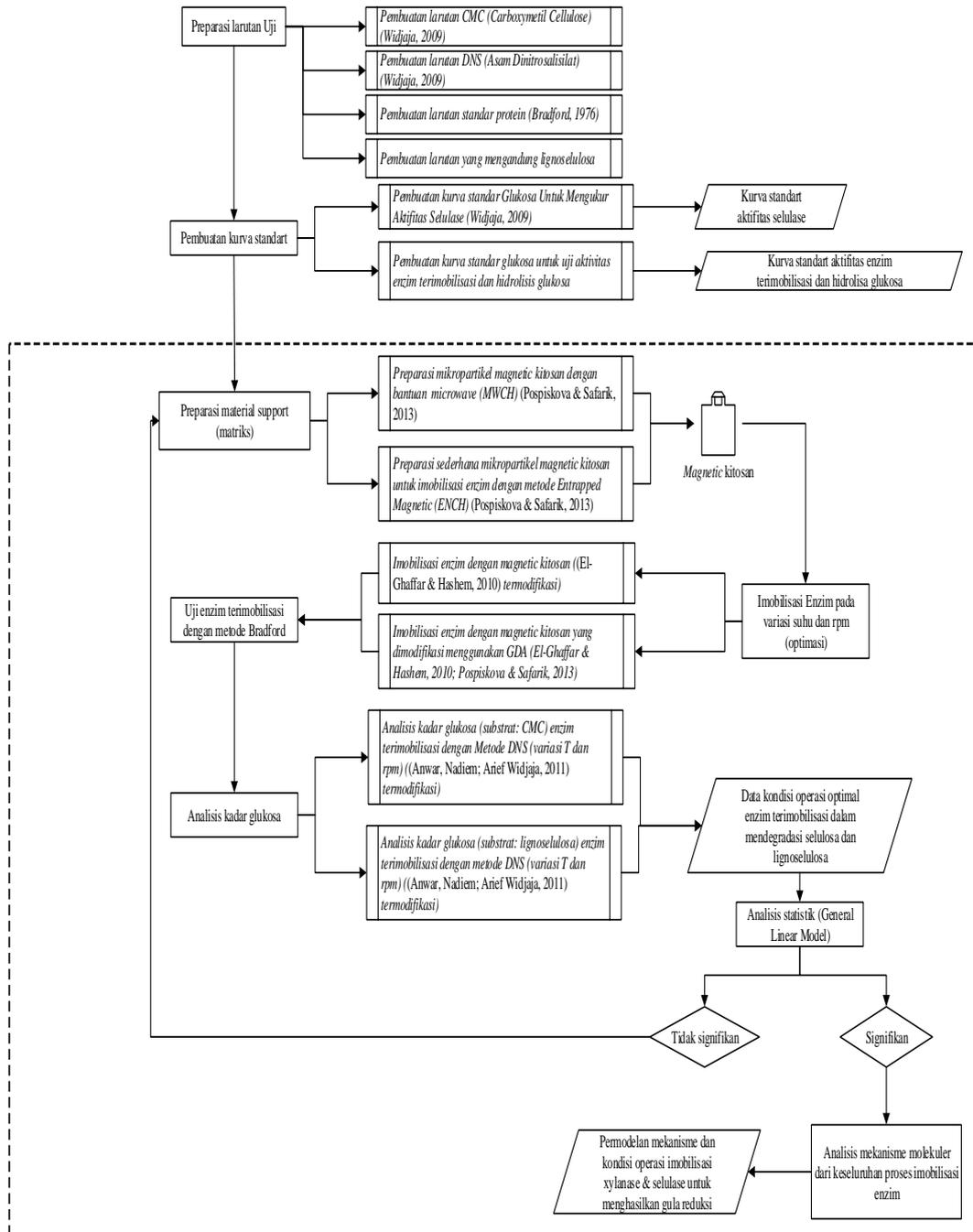
Di sisi lain, menurut (Rafael *et al.*, 2016), imobilisasi multi enzim dapat dilakukan pada crude enzim. Penelitian mengenai imobilisasi dan stabilisasi xylanase, β -xylosidase, dan α -L-arabinofuranosidase dari *Penicillium janczewskii* telah dilakukan. Hasil penelitian tersebut menjelaskan bahwa co-imobilisasi (imobilisasi multi enzim) menunjukkan aktifitas spesifik terhadap biokatalis senyawa yang kompatibel. Efisiensi mencapai 40% pada kondisi operasi. Xylanase dan α -L-arabinofuranosidase menunjukkan kondisi paling stabil dengan mempertahankan 88% aktifitasnya selama 10 kali *cycle*. Menurut (Liu *et al.*, 2015)

kebutuhan industri pada *bi-* atau multifungsional enzim menjadi pendorong dikembangkannya teknik imobilisasi enzim selama beberapa tahun terakhir. Pendekatan yang dilakukan pada penelitian terbaru dilaporkan bahwa tiap lapis novel karbon nanopartikel sebagai material pendukung, dapat terbentuk dengan sendirinya. Lapisan tersebut tersusun dari bifungsional enzim (ATXX) yang berhasil diimobilisasi pada material pendukung melalui ikatan kovalen. Menurut S. Mondal et.al, 2015 dan D. Selloum 2014 dalam (Liu *et al.*, 2015) karbon nanopartikel (CNP) sangat efisien digunakan, khususnya pada *nanoadditive*, bioteknologi dan *energy storage*.

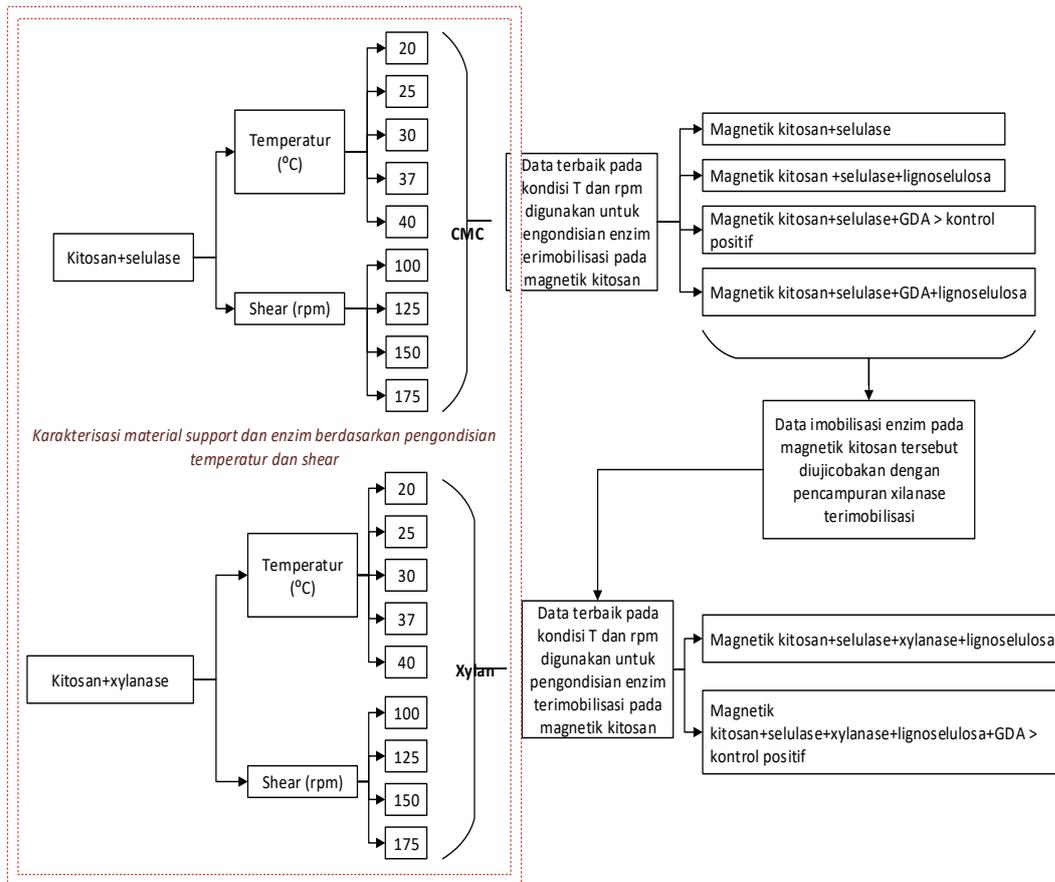
“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian



Breakdown



Keterangan:

- Variabel 1 : Kitosan+selulase, kitosan+ xylanase
- Variabel 2 : Temperatur (°C) dan shear (rpm)
- Variabel 3 : kitosan magnetik
- Pengulangan : minimal 2x

Gambar 3.1 Rancangan penelitian

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam kurun waktu satu tahun (penelitian). Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia, Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

3.3 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan (berat molekul medium, terdeasetilasi 75-85%, berat molekul Ca 400KD FLUKA; *Magnetic (Iron (II, III) oxide)* dengan ukuran partikel 5µm SIGMA-ALDRICH USA; Xylanase: *Trichoderma longibrachatum* X2G29-100G SIGMA cas 9025-57-

4; Selulase: *Aspergillus niger* C1184-25KU SIGMA Powder ≥ 3 unit/mg solid; Iron II Sulfat heptahydrate; Sodium hydroxide; DNS FLUKA cas 609-99-4; NaOH MERCK index no: 011-002-00-6; CMC FLUKA; BSA FLUKA ec no. 2329362 10mg/ml; Kitosan SIGMA-ALDRICH cas 9012-76-4; CBB MERCK cas 6104-58-1; *Microwave oven*.

3.4 Preparasi

3.4.1 Pembuatan larutan DNS (Asam dinitrosalisilat) (Widjaja, 2009)

NaOH sebanyak 16 gram dilarutkan dengan aquades hingga volume 200 mL. Kemudian sodium potassium tartrate sebanyak 30 gram dan sodium metabisulfit sebanyak 8 gram dilarutkan dengan aquades 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 aquades hingga volume 1000 mL.

3.4.2 Pembuatan larutan CMC (*Carboxymetil Cellulose*) (Widjaja, 2009)

Sebanyak 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.

3.4.3 Pembuatan kurva standar glukosa untuk mengukur aktifitas enzim (Widjaja, 2009)

Glukosa ditimbang 0,367 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 stok glukosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan volume larutan stok 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 ke dalam larutan standar glukosa dan ditambahkan 1,8 ml CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi. Setelah itu diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit dan ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya campuran tersebut divorteks 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. Selanjutnya membuat kurva standart glukosa dengan melakukan plot konsentrasi pada tabung dengan hasil absorbansi.

3.4.4 Preparasi sederhana mikropartikel kitosan untuk imobilisasi enzim

Sebanyak 4gr kitosan dilarutkan dengan 200ml asam asetat (0.2M). Setelah tercampur merata, sodium hydroxide 0.1N ditambahkan untuk mengubah kitosan terlarut menjadi kitosan gel (tidak terlarut).

3.4.5 Preparasi sederhana mikropartikel *magnetic* kitosan untuk imobilisasi enzim dengan metode *Entrapped Magnetic* (ENCH) (Pospiskova and Safarik, 2013)

Sebanyak 4gr kitosan dilarutkan dengan 200ml asam asetat (0.2M) selanjutnya 8gr magnetit komersial ditambahkan. Setelah tercampur merata, sodium hydroxide 0.1N ditambahkan untuk mengubah kitosan terlarut menjadi *magnetic* kitosan gel (tidak terlarut).

3.4.6 Imobilisasi enzim ((Biró, Sz, *et al.*, 2008) termodifikasi untuk optimasi)

Sebanyak 0.1 gram *magnetic* kitosan ditambahkan kedalam selulase (4.35ml) /xylanase (0.3404ml) (*pure*; 10mg/ml). Proses imobilisasi dilakukan selama 24 jam pada temperatur (20, 25, 30, 37, 40) dan kecepatan pengadukan 100, 125, 150, 175 rpm.. Campuran kemudian difiltrasi (dipisahkan supernatannya) untuk diukur kadar proteinnya dan enzim yang tidak bereaksi dipisahkan selanjutnya dicuci sebanyak 3 kali dengan larutan buffer fosfat pH 7. Enzim selulase/xylanase yang telah diimobilisasi kemudian disimpan pada suhu 4°C .

3.4.7 Imobilisasi enzim dengan *magnetic* kitosan ((El-Ghaffar and Hashem, 2010) termodifikasi)

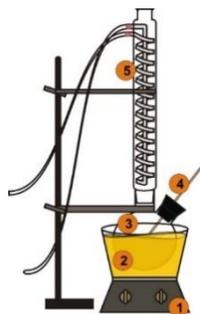
Sebanyak 1 gram *magnetic* kitosan ditambahkan kedalam selulase/xylanase (*pure*; 10mg/ml). Proses imobilisasi dilakukan selama 24 jam pada temperatur 25°C dan kecepatan pengadukan 150rpm. Campuran kemudian difiltrasi (dipisahkan supernatannya) untuk diukur kadar proteinnya dan enzim yang tidak bereaksi dipisahkan selanjutnya dicuci sebanyak 3 kali dengan larutan buffer fosfat pH 7. Enzim selulase/xylanase yang telah diimobilisasi kemudian disimpan pada suhu 4°C .

3.4.8 Imobilisasi enzim dengan *magnetic* kitosan termodifikasi menggunakan GDA (El-Ghaffar and Hashem, 2010; Pospiskova and Safarik, 2013)

Selulase dan xylanase diimobilisasi pada kedua tipe mikropartikel *magnetic* kitosan. Masing-masing enzim dimasukkan ke dalam Erlenmeyer berukuran 100ml sejumlah yang telah diketahui kemudian dimodifikasi dengan gluteraldehid (GDA) 2.5% (v/v) pada tabung reaksi dan diinkubasi (*shaker*) selama 24 jam pada suhu 25°C dan rotasi 150rpm menggunakan *automatic* rotator. Selanjutnya, enzim dipisahkan dengan supernatannya, dan dicuci menggunakan bufer fosfat pH 7 sebanyak 3 kali. Pemisahan serta pencucian enzim terimobilisasi dengan supernatan menggunakan plat magnet. Selanjutnya dapat disimpan pada suhu 4°C untuk dilakukan analisis pada masing-masing sampel tersebut (FTIR, BET dsj). .

3.4.9 Pretreatment sabut kelapa (lignoselulosa) secara kimiawi (NaOH 1% w/v)

Lignoselulosa dari sabut kelapa yang digunakan pada penelitian ini 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% sebanyak 10 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 aquades steril 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%, ditampilkan dalam gambar



Keterangan:

1. Hotplate Stirer
2. *Oil bath*
3. Labu Leher 2
4. Termometer
5. Kondensor Reflux

Gambar 3.2 Rangkaian alat pretreatment NaOH 1%

3.5 Uji Enzim Terimobilisasi

3.5.1 Persiapan uji enzim terimobilisasi dengan metode Bradford

Dilarutkan 100 mg *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 kedalam 50 ml etanol 95%. Kemudian ditambahkan 100 ml asam fosfat 85%. Campuran dihomogenkan sampai warna biru berangsur-angsur menghilang. Selanjutnya dilarutkan dengan aquades hingga 1 L dan diendapkan selama minimal satu hari satu malam.

3.5.2 Pembuatan larutan standar protein (Bradford, 1976)

0.1 gram *bovine serum albumin* (BSA) ditimbang dan dilarutkan ke dalam 100 ml aquades steril (untuk membuat larutan BSA dengan konsentrasi 1 mg/ml). 5,844 gram NaCl dilarutkan dengan 666 ml aquades steril untuk membuat larutan NaCl dengan konsentrasi 0,15 M.

3.5.3 Analisis enzim terimobilisasi dengan metode Bradford (Bradford, 1976)

0.05 ml selulase/xylanase dilarutkan dengan 0.05 ml NaCl. Larutan kemudian divortex agar homogen. Selanjutnya ditambahkan 5 ml dye reagent kedalam tabung dan diinkubasi selama 10 menit. Diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Kurva standar dibuat dengan menarik plot konsentrasi protein di dalam selulase terhadap absorbansinya. Larutan standar BSA dianalisis dengan menggunakan 5 ml reagent Bradford yang ditambahkan kedalam 0.1 ml larutan standar NaCl. Diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm menggunakan spektrofotometer.

3.5.4 Uji enzim terimobilisasi dengan FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

Sampel yang telah diketahui kondisi operasi optimal temperatur (25°C) dan rpmnya (150rpm) selanjutnya diaplikasikan pada magnetik kitosan. Hasil imobilisasi enzim tersebut dibandingkan dengan imobilisasi enzim pada magnetik kitosan GDA (kontrol +), enzim yang terimobilisasi pada kitosan non magnet, magnetik kitosan dan magnetik kitosan GDA. Selanjutnya seluruh sampel dilakukan analisa FTIR di Laboratorium Uji Material Departemen Teknik Material dan Metalurgi FTI ITS.

3.6 Pengukuran Kadar Glukosa

3.6.1 Pembuatan kurva standar glukosa untuk uji aktivitas enzim terimobilisasi dan hidrolisis glukosa

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 stok glukosa diencerkan dengan konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) volume larutan dari stok 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 (*dinitrosalicylic acid*) kedalam tabung reaksi. Kemudian campuran tersebut divorteks dan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm. Kemudian membuat kurva kalibrasi dengan menarik plot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

3.6.2 Analisis kadar glukosa (substrat: CMC) enzim terimobilisasi dengan metode DNS (Anwar, 2008) termodifikasi)

0,1 gram selulase terimobilisasi pada *magnetic* kitosan ditambah 2 ml CMC dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi dengan *incubator shaker* selama 1 jam pada suhu dan kecepatan rotasi optimum. Kemudian diambil masing-masing 1 ml dan dimasukkan ke dalam *microtube* uk 1.5 ml, kemudian disentrifugasi

selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C untuk memisahkan endapan. Setelah disentrifugasi larutan diambil 0,2 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1,8 ml aquadest. Kemudian ditambahkan 3 ml larutan DNS dan divorteks 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 standart glukosa.

3.6.3 Analisis kadar glukosa (substrat: xylan) enzim terimobilisasi dengan metode DNS (Anwar, 2008) termodifikasi)

0,1 gram xylanase terimobilisasi pada *magnetic* kitosan ditambah 2 ml xylan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi dengan *incubator shaker* selama 1 jam pada suhu dan kecepatan rotasi optimum. Kemudian diambil masing-masing 1 ml dan dimasukkan ke dalam *microtube* uk 1.5 ml, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C untuk memisahkan endapan. Setelah disentrifugasi larutan diambil 0,2 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1,8 ml aquadest. Kemudian ditambahkan 3 ml larutan DNS dan divorteks 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 standart glukosa.

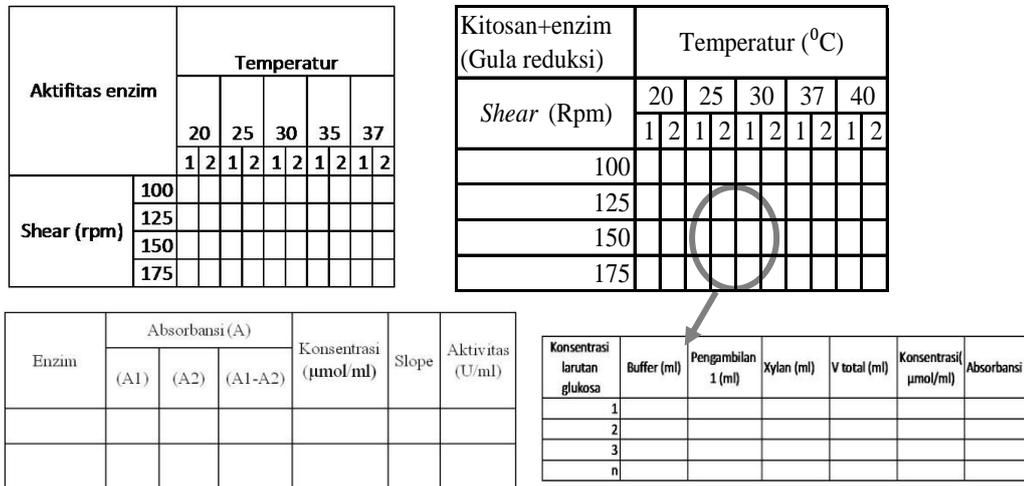
3.7 Prosedur Hidrolisis dengan Enzim Terimobilisasi (Anwar, 2008)

Pada tahap hidrolisis selulosa menjadi glukosa langkah - langkahnya adalah, 1 gram sabut kelapa (120 mesh) yang sudah dipretreatment secara kimiawi dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100ml. Kemudian ditambahkan enzim selulase dan xylanase yang telah terimobilisasi pada masing-masing matriks dan sudah diukur konsentrasi proteinnya. Selanjutnya ditambahkan buffer fosfat 0.1M pH 7 ke dalam larutan enzim dan sabut kelapa sampai volume 20ml. Proses hidrolisis dilakukan dengan inkubator shaker 150rpm suhu 60°C selama 48 jam dengan

pengambilan sampel setiap 2 jam sekali. Pada proses hidrolisis yang digunakan adalah kombinasi massa enzim setelah dilakukan imobilisasi. Berdasarkan penelitian sebelumnya (Lidya & Irma, 2017) kombinasi massa selulase dari T. Resei dan A. Niger adalah 2:1. Sedangkan massa magnetik kitosan dan magnetik kitosan GDA adalah 0.1 gr. Sehingga enzim yang digunakan untuk proses hidrolisa sebesar 0.067gr.

3.8 Analisis Statistik

Hipotesis dalam penelitian ini adalah terdapat pengaruh signifikan antara suhu dan rpm terhadap imobilisasi selulase dan xylanase pada *magnetic* kitosan untuk produksi gula reduksi. Teknik analisis yang akan digunakan untuk menguji hipotesis adalah GLM (General Linear Model) dengan menggunakan software minitab. Analisis GLM representatif untuk menggambarkan normalitas, homogenitas dan variabel yang signifikan berpengaruh terhadap hasil akhir penelitian ini. Selain itu, kesimpulan yang didapatkan juga bersifat spesifik tergeneralisasi.



Gambar 3.3 Model data untuk analisis statistik

”Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh imobilisasi selulase dan xylanase pada *magnetic* kitosan; mengetahui kondisi operasi yang optimal pada imobilisasi selulase dengan xylanase; serta untuk mendapatkan gambaran mekanisme imobilisasi selulase dan xylanase pada *insoluble matrix*. Tahap awal penelitian dimulai dari tanggal 3 April 2017 di laboratorium Teknologi Biokimia Jurusan Teknik Kimia FTI ITS. Penelitian meliputi *pretreatment* kitosan sebagai *material support* (non magnet dan magnet), analisis SEM (*Scanning Electron Microscopy*), pembuatan kurva standart protein (Bradford), pembuatan kurva standart CMC & xylan (DNS), analisis protein terimobilisasi selulase & xylanase serta analisis gula reduksi enzim terimobilisasi, serta analisis FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) dan analisis BET (*Brunauer-Emmet-Teller*).

4.1 Hasil Preparasi Kitosan (*material support*)

Tahap awal penelitian dilakukan dengan melakukan *pretreatment material support* (kitosan). Tahapan ini perlu dilakukan agar kitosan dapat digunakan sebagai *material support* ketika melakukan imobilisasi enzim. Preparasi kitosan dilakukan pada 2 jenis kitosan, yaitu kitosan teknis dan kitosan pro analisis. Hal tersebut dilakukan sebagai pembanding awal penelitian. Berdasarkan hipotesa, kitosan hasil *pretreatment* diharapkan dapat dibentuk berukuran mikro sebagai upaya meningkatkan luas bidang kontak. Langkah tersebut selanjutnya dijadikan rujukan untuk *pretreatment* kitosan menggunakan magnet. Prosedur *pretreatment* kitosan berukuran mikro adalah sebagai berikut: material pendukung kitosan dibuat dengan melarutkan 4gr kitosan dengan 200ml asam asetat (0.2M). Kitosan yang digunakan (Sigma Aldrich) berupa padatan amorf putih tidak larut dalam alkali dan asam mineral kecuali pada keadaan tertentu. Dilarutkannya kitosan dalam asam asetat dapat menyebabkan viskositasnya cukup baik. Hal tersebut dapat terjadi karena kitosan merupakan molekul polimer yang mempunyai berat molekul tinggi. Kitosan larut dalam asam organik/mineral encer melalui protonasi gugus amino bebas ($NH_2NH_3^+$) pada pH kurang dari 6,5. Setelah larutan terbentuk, selanjutnya

sodium hydroxide 0.1N ditambahkan untuk mengubah kitosan terlarut menjadi kitosan gel (tidak terlarut). Kitosan yang bersifat basa, dinetralkan menggunakan aquades (s/d pH 7), dan dimasukkan ke dalam oven bersuhu 60°C selama minimal 5 jam (sampai kitosan dapat dibentuk menjadi ukuran μm). Selanjutnya kitosan dimasukkan ke dalam desikator hingga benar-benar kalis dan dibentuk menggunakan saringan teh. Kitosan yang telah di *pretreatment* disimpan pada suhu ruang.

Gambar 4.1 a dan b menunjukkan kitosan hasil *pretreatment* yang berwarna putih susu. Kitosan tersebut dibentuk menggunakan saringan teh (ukuran pori ± 80 mesh). Bentuk awal kitosan setelah keluar dari oven masih berupa padatan/gumpalan berukuran makro. Kemudian diseragamkan dengan memperluas bidang kontak dengan menyaringnya menggunakan saringan teh. Uji kualitatif ukuran partikel menggunakan mistar tidak dapat dilakukan karena partikel berukuran sangat kecil. Oleh karena itu uji kuantitatif dilakukan dengan SEM (*Scanning Electron Microscope*) (dilakukan di laboratorium Departemen Material dan Metalurgi FTI ITS).

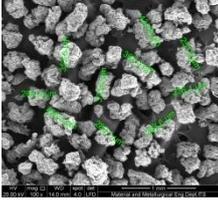
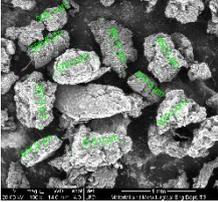
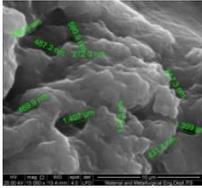
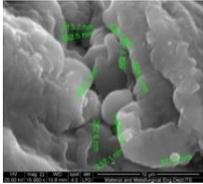


(a)

(b)

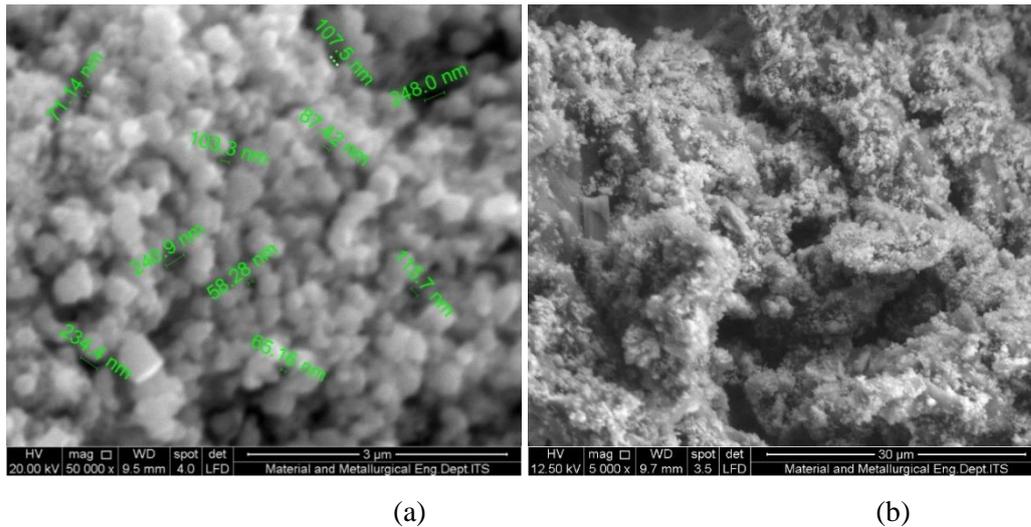
Gambar 4.1 (a) Kitosan *pro analisis* hasil *pretreatment*, (b) Kitosan teknis hasil *pretreatment*

Tabel 4.1 a. Hasil SEM kitosan

Perbesaran	Kitosan Teknis	Keterangan	Kitosan Pro analisis	Keterangan
Perbesaran 100x		Ukuran partikel: 251.6 μ m-426.3 μ m		Ukuran partikel: 305.1 μ m-815 μ m
Perbesaran 15000x		Ukuran pori: 174.8nm-1.407 μ m		213.7nm-1.089 μ m

Berdasarkan hasil uji SEM diketahui ukuran partikel kitosan teknis hasil pretreatment adalah 251.6 μ m - 426.3 μ m sedangkan ukuran partikel kitosan pro analisis hasil *pretreatment* ukuran partikelnya 305.1 μ m - 815 μ m. Kitosan pro analisis sedikit lebih besar range ukurannya karena kitosan gel yang terbentuk cenderung lebih lembek (lengket), sehingga lebih sulit dibentuk daripada *treatment* pada kitosan teknis. Gambaran lain yang dapat diketahui dari uji SEM pada penelitian ini adalah ukuran pori. Diketahui dari hasil uji bahwa ukuran pori tidak seragam, namun data lebar pori pada **Tabel 4.1** dapat dijadikan rujukan untuk memprediksi luas bidang kontak, ikatan yang terbentuk serta daya dukung material terhadap perubahan fisika (reaksi).

Selanjutnya dilakukan preparasi material *magnetic* kitosan dan material kitosan *freezdry* sebagai pembanding.. Sebanyak 4gr kitosan dilarutkan dengan 200ml asam asetat (0.2M) selanjutnya 8gr magnetik komersial ditambahkan (dalam penelitian ini digunakan Iron II Sulfat heptahydrate). Setelah tercampur merata, *sodium hydroxide* 0.1N ditambahkan untuk mengubah kitosan terlarut menjadi *magnetic* kitosan gel (tidak terlarut). Sedangkan prosedur preparasi kitosan freezdry sama seperti preparasi material kitosan namun proses pengeringan dilakukan menggunakan alat *freez drying*.



Gambar 4.2 (a). Kitosan *freezdry* (b). Magnetik kitosan. SEM perbesaran 5000x

Berdasarkan hasil SEM (**Gambar 4.2 a & b**) untuk material kitosan dengan *freez dry* dan magnetik kitosan diketahui bahwa pori pada material terlihat lebih kecil dan lebih jelas. Material kitosan yang dikeringkan menggunakan *freez dry* memiliki kadar air yang jauh lebih rendah dari pada yang tidak. Meskipun secara ukuran dapat dibentuk lebih kecil daripada kitosan non magnet biasa namun ketika digunakan untuk imobilisasi material ini sulit untuk bercampur (teraduk). Sehingga kurang mendukung untuk dijadikan material pendukung pada imobilisasi enzim. Sedangkan untuk kitosan magnetik, meskipun metode pengeringan sama-sama menggunakan *freez dry* namun Iron II Sulfat heptahydrate membuat massa material kitosan lebih berat sehingga cocok digunakan untuk mengimobilisasi enzim (**Gambar 4.2 c**).



Gambar 4.2 c Magnetik kitosan

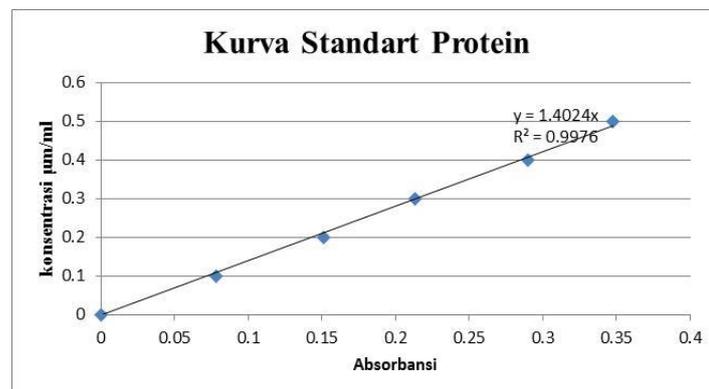
4.2 Kurva Standart Protein

Tahapan penelitian selanjutnya adalah pembuatan kurva standart protein melalui uji *Bradford*. Uji *Bradford* merupakan suatu uji untuk mengukur

konsentrasi protein total dengan secara kolorimetri dalam suatu larutan. Dalam uji Bradford melibatkan pewarna *Coomassie Brilliant Blue (CBB)* yang berikatan dengan protein dalam suatu larutan bersifat asam sehingga memberikan warna (kebiruan). Secara kolorimetri dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri (Lambert-Beer) pada panjang gelombang 465 - 595 nm (cahaya tampak) (Anam, 2010).

Pembuatan reagen Bradford dilakukan dengan melarutkan 100 mg *Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250* kedalam 50 ml etanol 95%. Kemudian ditambahkan 100 ml asam fosfat 85%. Campuran dihomogenkan sampai warna biru berangsur-angsur menghilang. Selanjutnya dilarutkan dengan aquades hingga 1 L dan diendapkan selama sehari semalam didalam kulkas penyimpanan ($T=4^{\circ}\text{C}$).

Sampel standart protein yang digunakan pada uji ini adalah *bovine serum albumin (BSA)* dari sigma. Sebanyak 0.1 gram ditimbang dan dilarutkan ke dalam 100 ml aquades steril (untuk membuat larutan BSA dengan konsentrasi 1 mg/ml). Digunakannya *bovine serum albumin (BSA)* dalam penelitian ini karena bahan tersebut merupakan sampel protein standart yang umum. Diekstrak dari turunan protein hewan mamalia dan beberapa tanaman berbiji (Albumin, 1990). Selanjutnya, untuk membuat pelarut sampel, sebanyak 5,844 gram NaCl dilarutkan dengan 666 ml aquades steril dengan konsentrasi 0,15 M. Setelah preparasi protein dan pelarut sampel, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer (merk:Cecil)



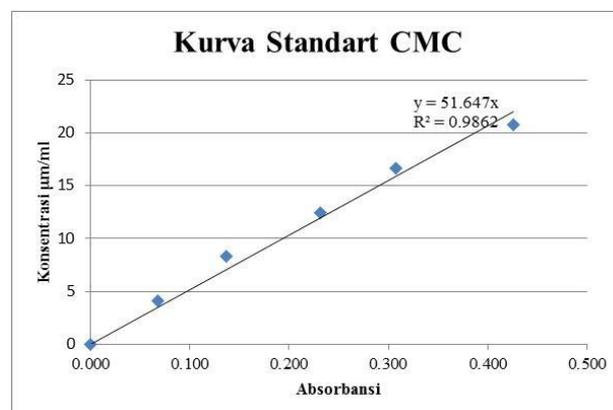
Gambar 4.3 Kurva standart protein

Dari kurva pada **Gambar 4.3** diketahui persamaan regresi linier $y = 1.4024x$ dengan y sebagai konsentrasi protein (BSA) dalam mg/ml dan x sebagai absorbansi. Data dari absorbansi berfungsi sebagai konversi kadar protein. Selanjutnya dilakukan penghitungan data total protein melalui absorbansi yang didapatkan dari spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

4.3 Kurva Standart Glukosa

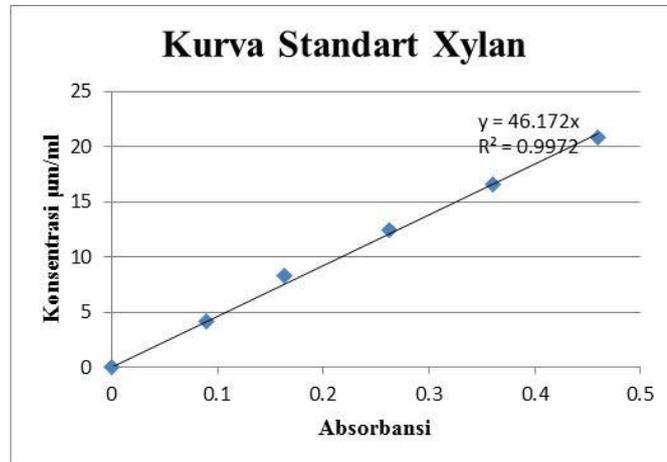
4.3.1 Pembuatan kurva standar glukosa untuk uji aktivitas enzim terimobilisasi dan hidrolisis glukosa

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 ke dalam labu ukur. Larutan stok glukosa diencerkan dengan konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) volume larutan dari stok 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 ke dalam larutan standard glukosa dan ditambahkan 1,8 ml aquadest ke dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi. Kemudian campuran tersebut divorteksdan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm. Kemudian membuat kurva kalibrasi dengan menarik plot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi. Mengacu pada tujuan penelitian, larutan standart glukosa yang digunakan ada 2 jenis yaitu CMC (*Carboxymetil Cellulose*) dan xylan.



Gambar 4.4 Kurva standart CMC

Dari kurva pada **Gambar 4.4** diketahui persamaan regresi linier $y = 51.647x$ dengan y sebagai konsentrasi glukosa dalam $\mu\text{mol/ml}$ dan x sebagai absorbansi.



Gambar 4.5 Kurva standart xylan

Dari kurva pada **Gambar 4.5** diketahui persamaan regresi linier $y = 46.172x$ dengan y sebagai konsentrasi glukosa dalam $\mu\text{mol/ml}$ dan x sebagai absorbansi. Data absorbansi dikoversi menjadi konsentrasi glukosa untuk pengukuran aktivitas enzim.

Kurva standar glukosa yang sudah didapat merupakan hasil pengulangan dari beberapa percobaan. Salah satu kendala dalam penelitian ini adalah kondisi alat (spektrofotometer). Oleh karena itu, untuk mendapatkan data yang *representative*, diperlukan pengulangan sampai data yang didapatkan selisihnya kecil (sama/stabil).

Pembahasan selanjutnya adalah pengujian aktivitas enzim. Aktivitas enzim ini diuji dengan metode DNS. Pengukuran aktivitas dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Pada λ ini, reaksi gula reduksi dengan reagen DNS akan menghasilkan warna merah atau jingga setelah dipanaskan dan didinginkan (**Gambar 4.6**). Warna ini yang akan terbaca absorbansinya oleh spektrofotometer (Miller, 1959). Kurva pada **Gambar 4.4** diperoleh dari pembacaan absorbansi larutan glukosa yang ditambahkan dengan *Carboxymetil Cellulose* (CMC) sedangkan kurva pada **Gambar 4.5** diperoleh dari pembacaan absorbansi larutan glukosa yang ditambahkan dengan xylan. CMC

digunakan karena dapat dihidrolisis oleh enzim selulase dan menghasilkan glukosa, begitu pula dengan xylan.



Gambar 4.6 Uji DNS

4.4 Imobilisasi Enzim

Proses imobilisasi enzim pada penelitian ini dilakukan dengan 2 tipe variabel, yaitu variabel suhu & rpm (16 kombinasi) dan variabel jenis enzim (selulase & xylanase). Penelitian pendahuluan yang dilakukan sebelumnya, telah dilengkapi pada laporan ini. Beberapa variabel mengalami perubahan namun kondisi operasi sama. Hal tersebut dilakukan agar data yang diperoleh dapat disimpulkan secara holistic. Variasi variabel suhu menjadi 20, 25, 30, 35 sedangkan variabel rpm menjadi 100rpm, 125rpm, 150rpm dan 175rpm. Imobilisasi selulase & xylanase non magnetik dilakukan dengan menimbang 0,1 gram kitosan kemudian ditambahkan enzim yang sudah diketahui aktivitas dan kadar proteinnya (4.35ml selulase & 0.34045 ml xylanase) ke dalam Erlenmeyer 50 ml (**Gambar 4.7 b**) kemudian dimasukkan ke dalam inkubator *shaker* selama 24 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam enzim yang sudah bercampur dengan kitosan difiltrasi menggunakan bantuan kertas saring (**Gambar 4.7 a**). Selanjutnya enzim yang tertinggal di dasar erlenmeyer dicuci sebanyak 3 kali dengan menggunakan larutan buffer fosfat pH7. Enzim yang telah diimobilisasi kemudian disimpan pada suhu 4°C sebelum dianalisis untuk menjaga kondisinya agar tetap baik.



(a)

(b)

Gambar 4.7 (a) Residu kitosan enzim terimobilisasi pada proses pemisahan supernatan, (b) imobilisasi dilakukan dengan Erlenmeyer 50ml

Tabel 4.1 b. Tabel perbandingan kadar protein enzim sebelum dan sesudah terimobilisasi menggunakan material support *magnetic* kitosan maupun kitosan non magnet

Material Support	Sampel	Konsentrasi protein tidak terimobilisasi (mg/ml)	Konsentrasi protein terimobilisasi (mg/ml)	%
Magnetik kitosan	<i>A.niger 1</i>	0	2.24384	100%
	<i>A.niger 2</i>	0	2.24384	100%
	<i>A.niger 3</i>	0	2.24384	100%
	<i>T. resei 1</i>	0	2.24384	100%
	<i>T. resei 2</i>	0	2.24384	100%
	<i>T. resei 3</i>	0	2.24384	100%
	Xylanase	2.047504	14.641056	88%
	Xylanase	2.561717333	14.12684267	85%
Kitosan non magnet	<i>Selulase</i>	0.177637333	2.066202667	92%
	Xylanase	2.949714667	13.73884533	82%

*Keterangan: data selulase *T. resei* ditunjukkan karena pada proses hidrolisa digunakan sebagai kombinasi, merujuk pada penelitian sebelumnya.

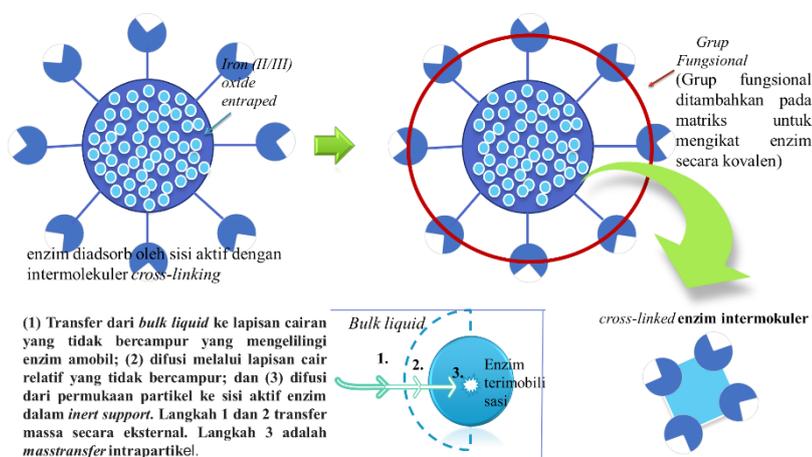
Pengujian keberhasilan dari hasil optimasi imobilisasi enzim selulase dan xylanase, dilakukan pengukuran kadar protein kembali setelah proses imobilisasi. Enzim yang telah terimobilisasi dengan kitosan maupun *magnetic* kitosan kemudian diambil supernatannya dan dilakukan pengujian dengan metode Bradford. Dari hasil pengujian didapatkan perbandingan hasil kadar protein sebelum dilakukan imobilisasi dan supernatan enzim setelah diimobilisasi pada kondisi operasi yang diasumsikan optimum (25°C/150rpm). Data perbandingan ini dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Berdasarkan **Tabel 4.1** yaitu imobilisasi selulase dan xylanase pada *magnetic* kitosan, diketahui sebagian besar terimobilisasi sempurna (100%). Didukung oleh penelitian (Safarik *et al.*, 2014) bahwa magnetik kitosan memiliki keunggulan *biocompatibility*, availabilitas grup fungsional yang reaktif untuk modifikasi kimia, *hydrophilicity*, stabilitas mekanik, regenerabilitas, dan mempersingkat preparasi konfigurasi geometric selama proses biotransformasi terjadi. Kitosan memang mampu menyerap protein dari enzim selulase yang diimobilisasi meski dalam jumlah kecil. Menurut Knorr (1984) chitosan mampu

mengikat air dan minyak karena mempunyai gugus polar dan non polar. Jumlah air yang dapat diikat chitosan sekitar 325-440 (w/w). Kemampuan pengikatan tersebut yang membuat kitosan dapat bertindak sebagai penstabil dan pengental serta digunakan dalam proses imobilisasi.

Selain itu penggunaan *magnetic* kitosan lebih menguntungkan karena terjangkau dan efisien. Selain itu. Kemampuan aplikasi mereka teruji dengan imobilisasi pada dua jenis enzim (Pospiskova and Safarik, 2013). Pada penelitian ini prosedur mengacu pada hasil riset Pospiskova & Safarik, 2013. Selanjutnya data di atas akan digunakan untuk hidrolisa sabut kelapa dengan kombinasi dari kedua jenis enzim yang merujuk pada penelitian sebelumnya.

Dari parameter yang telah diukur dapat disimpulkan bahwa mekanisme imobilisasi enzim digambarkan menjadi 3 kategori utama (**Gambar 4.7c**) yaitu imobilisasi pada material pendukung (*carrier*), *entrapment* pada material polimer dan *cross-linking* antar molekul enzim sesuai dengan penelitian (Shrivastava, Lata and Shukla, 2012). Imobilisasi enzim dengan suatu material pembawa (*insoluble*) dapat meningkatkan resistensi perubahan kondisi pH dan temperatur agar dapat digunakan kembali. Hal tersebut meningkatkan efisiensi proses dan secara luas telah digunakan di industri sebagai katalis reaksi kimia (Shrivastava, Lata and Shukla, 2012). Seluruh proses tersebut terjadi tanpa adanya kerusakan pada struktur ruang tiga dimensi dari sisi aktif enzim, sehingga spesifitas substrat maupun gugus fungsi aktif tidak terpengaruh (Kokufuta, 1992).



Gambar 4.7 (c) Mekanisme imobilisasi enzim

4.4.1 Analisis Hasil Optimasi Selulase Terimobilisasi

Hasil uji *two-way ANOVA* yang menunjukkan perbedaan pada variabel Rotasi dan Suhu, dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 4.2 Hasil *Two Way ANOVA* Selulase

Source	DF	SS	MS	F	P
Rotasi (RPM)	3	0.1550	0.0517	13.6	0.0000
Suhu (°C)	3	0.1800	0.0600	15.79	0.0000
Rotasi*Suhu	9	0.8151	0.0906	23.84	0.0000
Error	16	0.0608	0.0038		
Total	31	1.2109			

Variabel rotasi dan suhu diduga memiliki pengaruh terhadap selulase. Pada **Tabel 4.2** diketahui bahwa variabel rotasi, suhu dan interaksi antara rotasi dan suhu memiliki perbedaan yang signifikan terhadap selulase. Hal ini ditunjukkan nilai P yang kurang dari α yang digunakan yaitu 5% (0,05), yaitu untuk rotasi, suhu dan interaksi antara rotasi dan suhu memiliki nilai P yang sama yaitu sebesar 0,000 maka didapatkan keputusan Tolak H_0 karena $P\text{-value} < \alpha$ ($0,000 < 0,05$). *Sehingga dapat disimpulkan rotasi, suhu dan interaksi antara rotasi dan suhu terhadap selulase memberi pengaruh yang berbeda di setiap perlakuannya.*

Uji Tukey digunakan untuk mengetahui perbedaan di setiap kategori variabel

a. RPM

Di bawah ini merupakan tabel perbedaan pengaruh RPM pada setiap kategori terhadap selulase yang diteliti dengan menggunakan uji *Tukey*.

Tabel 4.3 Hasil uji *Tukey* kategori RPM

RPM	Pembanding	Rata-Rata Selisih	P-value
100	125	-0.1150	0.0089
	150	0.0445	0.4927
	175	-0.1120	0.0110
125	100	0.1150	0.0089
	150	0.1590	0.0005
	175	0.0032	0.9996
150	100	-0.0445	0.4927
	125	-0.1590	0.0005
	175	-0.1560	0.0006
175	100	0.1120	0.0110

125	-0.0032	0.9996
150	0.1560	0.0006

Berdasarkan **Tabel 4.3** yang merupakan hasil dari uji *Tukey* menunjukkan bahwa antara kategori 100 RPM memiliki hasil selulase berbeda dengan 125 RPM dan 175 RPM dengan nilai signifikansi berturut-turut 0.0089 dan 0.0110 atau kurang dari 0.05 yang artinya terdapat perbedaan hasil selulase antara 100 RPM dengan 125 dan 175 RPM. Akan tetapi, 100 RPM tidak memiliki perbedaan dengan 150 RPM dalam hal mengimobilisasi selulase karena nilai signifikansi lebih dari 0,05 yaitu 0.4927 yang berarti tidak terdapat perbedaan hasil diantara keduanya.

Kemudian untuk 125 RPM juga memiliki hasil berbeda dengan 150 RPM selain dengan 100 RPM yang sebelumnya telah dibahas dengan nilai signifikansi 0.0005 yang kurang dari 0.05, artinya terdapat perbedaan hasil perbedaan hasil antara 125 RPM dan 150 RPM. Selain itu, pada kategori 125 RPM memiliki kesamaan dengan 175 RPM karena hasil nilai P lebih besar dari 0.05 dengan nilai 0.9996 yang artinya tidak ada perbedaan hasil protein selulase yang dihasilkan dengan 125 RPM dan 175 RPM.

Lalu untuk kategori 150 RPM diketahui telah memiliki perbedaan hasil dengan 125 RPM juga berbeda dengan 175 RPM yang didapatkan nilai P atau signifikansi sebesar 0.0006 yang kurang dari 0.05 yang artinya terdapat perbedaan hasil diantara kedua RPM.

Sedangkan untuk kategori 175 RPM semuanya telah dijelaskan sebelumnya, karena 175 RPM memiliki hasil yang berbeda dengan 100 RPM dan 150 RPM, serta memiliki kesamaan dengan 125 RPM dalam hal jumlah prtein yang tidak terimobilisasi.

b. Suhu

Berikut dijelaskan perbedaan pengaruh suhu pada setiap kategori imobilisasi selulase yang diteliti dengan menggunakan uji *Tukey* pada **Tabel 4.4** di bawah ini.

Tabel 4.4 Hasil *Uji Tukey* Kategori Suhu

Suhu	Pembandingan	Rata-Rata Selisih	P-value
20	25	-0.0259	0.4135
	30	-0.0853	0.0137
	35	-0.1949	0.0000

25	20	0.0259	0.4135
	30	-0.0595	0.0716
	35	-0.1690	0.0001
30	20	0.0853	0.0137
	25	0.0595	0.0716
	35	-0.1095	0.0026
35	20	0.1949	0.0000
	25	0.1690	0.0001
	30	0.1095	0.0026

Tabel 4.4 merupakan hasil dari uji *Tukey* yang menunjukkan perbedaan hasil antara masing-masing kategori suhu. Didapatkan hasil antara kategori suhu 20°C memiliki hasil selulase berbeda dengan suhu 30°C dan 35°C dengan nilai signifikansi berturut-turut 0.0137 dan 0.0000 atau kurang dari 0.05 yang artinya terdapat perbedaan hasil selulase antara suhu 20°C dengan suhu 30°C dan 35°C. Akan tetapi, suhu 20°C memiliki hasil yang sama dengan suhu 25°C dalam hal menghasilkan mengimobilisasi selulase karena nilai signifikansi lebih dari 0,05 yaitu 0.4135.

Kemudian untuk suhu 25°C juga memiliki hasil yang sama dengan suhu 30°C selain dengan suhu 20°C yang tadi sudah dijelaskan dengan nilai signifikansi 0.0716 yang lebih dari 0.05, artinya terdapat kesamaan hasil antara suhu 25°C dengan suhu 30°C. Selain itu, pada kategori suhu 25°C memiliki perbedaan dengan suhu 35°C karena nilai P lebih kecil dari 0.05 dengan nilai 0.0001 yang artinya ada perbedaan hasil selulase terimobilisasi pada suhu 25°C dan suhu 35°C.

Lalu untuk kategori suhu 30°C diketahui telah memiliki perbedaan hasil dengan suhu 20°C juga berbeda dengan suhu 35°C dimana didapatkan nilai P atau signifikansi sebesar 0.0026 yang kurang dari 0.05 yang artinya terdapat perbedaan hasil diantara keduanya.

Sedangkan untuk kategori suhu 35°C semuanya telah dijelaskan, karena suhu 35°C memiliki hasil yang berbeda dengan semua kategori suhu.

c. RPM*Suhu

Berikut dijelaskan perbedaan pengaruh interaksi suhu dengan RPM pada setiap kategori terhadap selulase yang diteliti dengan menggunakan uji *Tukey* dapat dilihat pada **Tabel 4.5**. Berdasarkan hasil Uji *Tukey* didapatkan hasil pengelompokan pengaruh antara interaksi RPM dan suhu terhadap hasil protein selulase pada **Tabel 4.5** berikut,

Tabel 4.5 Hasil pengelompokkan berdasarkan perbedaan pengaruh interaksi suhu dengan RPM pada tiap kategori

RPM	Suhu	Kelompok				
		1	2	3	4	5
125	25	0.3				
150	35	0.3	0.3			
175	35	0.2	0.2	0.2		
175	20	0.1	0.1	0.1		
125	35	0.1	0.1	0.1		
175	25	0.1	0.1	0.1		
100	25	0.1	0.1	0.1		
100	35	0.1	0.1	0.1		
150	30	0.1	0.1	0.1		
100	30		0.1	0.1		
175	30			0.1		
125	30			0		
125	20			0	0	
150	20			0	0	
100	20				-0.2	
150	25					-0.5

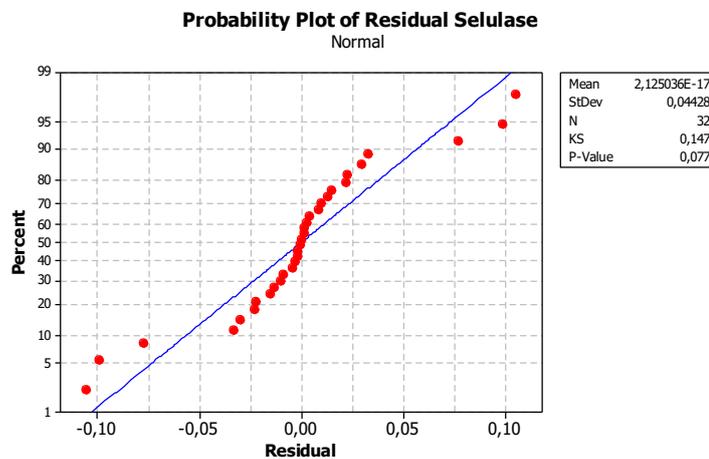
Berdasarkan **Tabel 4.5** di atas diketahui bahwa interaksi antara RPM dan suhu memiliki rata-rata hasil selulase yang berbeda sehingga terdapat 5 kelompok dengan rata-rata yang memiliki kesamaan satu sama lain. Seperti kelompok 1 yang memiliki 9 anggota, 8 diantaranya memiliki kesamaan dengan kelompok 2, dimana kelompok 1 yang memiliki perbedaan hasil diperoleh dari interaksi 125 RPM pada suhu 25°C. Kemudian kelompok 2 yang beranggotakan 9 anggota berinteraksi pula dengan kelompok 3 yang memiliki 8 anggota dengan hasil yang sama, dimana interaksi antara 150 RPM dengan suhu 35°C berbeda dengan karakteristik kelompok 3 tetapi sama dengan kelompok 1, dan interaksi antara 100 RPM dengan suhu 30°C memiliki perbedaan dengan kelompok 1 tetapi sama dengan kelompok 3. Begitupula kelompok 3 yang beranggotakan 12 anggota. Interaksi antara RPM dengan suhu memiliki kesamaan 2 anggota dengan kelompok 4 yaitu pada interaksi antara 125 RPM dengan suhu 20°C dan interaksi antara 150 RPM dengan suhu 20°C. Sedangkan untuk Kelompok 4 yang beranggotakan hanya 3 anggota interaksi terdapat 1 interaksi yaitu antara 100 RPM dengan suhu 20°C yang berbeda dengan anggota kelompok manapun. *Kelompok 5 adalah kelompok paling unik dengan hanya beranggotakan satu interaksi antara 150 RPM dengan suhu 25°C yang tentunya menyisakan selulase tidak terimobilisasi berbeda dengan interaksi yang lainnya.*

4.4.2 Uji asumsi yang digunakan untuk mengetahui hasil asumsi apakah sesuai dengan IIDN (Identik, Independen dan Berdistribusi Normal)

Dalam menganalisis Two-Way ANOVA diperlukan asumsi-asumsi sebelum melakukan pengolahan pada data. Berikut merupakan pengujian asumsi:

4.4.2.1 Asumsi distribusi normal

Distribusi normal merupakan salah satu asumsi sebelum melakukan pengujian Two-Way ANOVA. Dimana nilai residual pada ANOVA harus berdistribusi normal. Berikut ini adalah hasil pengujian asumsi distribusi normal menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*.



Gambar 4.8 . Plot Residual Selulase.

Gambar 4.8 di atas dapat diketahui bahwa *residual telah mengikuti garis distribusi normal yang artinya residual telah memenuhi asumsi distribusi normal*. Sedangkan berdasarkan *p-value*, *residual telah memenuhi asumsi distribusi normal* karena *p-value* (0,077) > α (0,05). Sehingga residual selulase telah memenuhi asumsi distribusi normal.

4.4.2.2 Asumsi identik

Setelah residual memenuhi asumsi distribusi normal selanjutnya akan dilakukan pengujian asumsi identik. Pada pengujian asumsi identik, digunakan *Levene Test* untuk melihat apakah residual memenuhi asumsi identik atau tidak. Berikut merupakan hasil pengujian asumsi identik dengan *Levene's Test*.

Test and CI for Two Variances: RES11 vs C10					
Method					
Null hypothesis	Sigma(1) / Sigma(2) = 1				
Alternative hypothesis	Sigma(1) / Sigma(2) not = 1				
Significance level	Alpha = 0,05				
Tests					
			Test		
Method	DF1	DF2	Statistic	P-Value	
Levene's Test (any continuous)	1	30	0,15	0,702	

Gambar 4.9. Hasil *Levene's Test* Residual Selulase.

Gambar 4.9 di atas merupakan hasil *Levene's Test* dalam pengujian asumsi identik. *P-value* pada gambar sebesar 0,702 yang artinya residual memenuhi asumsi identik karena *p-value* ($0,702 > \alpha$ ($0,05$)). Sehingga *residual selulase telah memenuhi asumsi identik*.

4.4.2.3 Asumsi independen

Asumsi independen merupakan asumsi sebelum melakukan analisis dengan Two-Ways ANOVA. Pengujian asumsi independen ini dilakukan menggunakan pengujian Durbin Watson. Setelah melakukan pengujian Durbin Watson didapatkan nilai statistik uji Durbin Watson sebesar 3,061. Nilai statistik uji ini akan dibandingkan dengan nilai tabel Durbin Watson dengan $n=32$ dan banyaknya variabel adalah 3 maka nilai tabel Durbin Watson *Lower* (DL) sebesar 1,309 serta nilai tabel Durbin Watson *Upper* (DU) sebesar 1,573. Pada pengujian Durbin Watson nilai Durbin Watson (DW) $>$ nilai tabel Durbin Watson *Lower* (DL) artinya residual tidak terdapat korelasi positif antar pengamatan. Sedangkan nilai $(4-DL)$ sebesar 2,69, maka residual terdapat korelasi negatif antar pengamatan karena nilai $DW > (4-DL)$. Sehingga *belum memenuhi asumsi independen*.

4.4.3 Analisis Hasil Optimasi Xylanase Terimobilisasi

Hasil uji *two-way ANOVA* yang menunjukkan perbedaan pada variabel Rotasi dan Suhu, dapat dilihat pada **Tabel 4.6** berikut.

Tabel 4.6 Hasil *Two Way ANOVA* xylanase

Source	DF	SS	MS	F	P
Rotasi	3	0.13276	0.13276	2.46	0.101
Suhu	3	0.23588	0.23588	4.36	0.020
Rotasi*Suhu	9	0.92825	0.92825	5.72	0.001
Error	16	0.28832	0.28832		
Total	31	1.5852			

Variabel rotasi diduga tidak memiliki pengaruh terhadap xylanase. Pada **Tabel 4.6** di atas diketahui bahwa variabel suhu dan interaksi antara rotasi dan suhu memiliki perbedaan yang signifikan terhadap xylanase. Hal ini ditunjukkan nilai P yang kurang dari α yang digunakan yaitu 5% (0,05), yaitu untuk suhu dan interaksi antara rotasi dan suhu memiliki nilai P berturut-turut sebesar 0,020 dan 0.001 maka didapatkan keputusan Tolak H_0 karena $P\text{-value} < \alpha$ ($0,000 < 0,05$). *Sehingga dapat disimpulkan suhu dan interaksi antara rotasi dan suhu terhadap selulase memberi pengaruh yang berbeda di setiap perlakuannya.* Kemudian variabel rotasi tidak memiliki perbedaan dalam mengimobilisasi xylanase, hal ini diketahui dari nilai P yang lebih dari α yang digunakan, sehingga didapatkan keputusan Gagal Tolak H_0 karena $P\text{-value} > \alpha$ ($0,101 > 0,05$).

Uji Tukey yang digunakan untuk mengetahui perbedaan di setiap kategori variabel
a. RPM

Berikut dijelaskan perbedaan pengaruh RPM pada setiap kategori terhadap imobilisasi xylanase yang diteliti dengan menggunakan uji *Tukey* pada **Tabel 4.7** di bawah ini.

Tabel 4.7 Hasil uji *Tukey* Kategori RPM xylanase

RPM	Pembanding	Rata-Rata Selisih	P-value
100	125	-0.0460	0.5026
	150	0.0780	0.2625
	175	-0.0973	0.1665
125	100	0.0460	0.5026
	150	0.1240	0.0833
	175	-0.0513	0.4562
150	100	-0.0780	0.2625
	125	-0.1240	0.0833
	175	-0.1752	0.0189
175	100	0.0973	0.1665
	125	0.0513	0.4562
	150	0.1752	0.0189

Berdasarkan **Tabel 4.7** di atas yang merupakan hasil dari uji *Tukey* menunjukkan bahwa antara semua kategori 100 RPM dengan RPM lainnya dan 125 RPM dengan semua RPM lainnya memiliki hasil xylanase yang sama, hal ini diketahui dengan nilai signifikansi berturut-turut untuk 100 RPM adalah 0.5026

untuk 125 RPM, lalu 0.2625 untuk 150 RPM dan 0.1665 untuk 175 RPM. Pada 100 RPM semua nilai P memiliki nilai yang lebih dari α , sehingga didapatkan kesimpulan tidak ada perbedaan hasil protein xylanase yang dihasilkan di semua kategori 100 RPM.

Kemudian untuk 125 RPM juga memiliki hasil sama dengan kategori RPM yang lain. Hal ini dikarenakan hasil nilai P lebih besar dari 0.05 dengan nilai berturut-turut untuk 100 RPM sebesar 0.5026, 150 RPM sebesar 0.0833 dan 175 RPM sebesar 0.4562 yang artinya tidak ada perbedaan hasil imobilisasi xylanase pada 125 RPM dengan semua RPM yang lain.

Lalu untuk kategori 150 RPM diketahui memiliki perbedaan hasil dengan 175 RPM, didapatkan nilai P atau signifikansi sebesar 0.0189 yang kurang dari 0.05 yang artinya terdapat perbedaan hasil kadar protein sisa xylanase diantara kedua RPM. Sedangkan untuk kategori 175 RPM telah dijelaskan pada uraian sebelumnya.

b. Suhu

Berikut dijelaskan perbedaan pengaruh Suhu pada setiap kategori terhadap xylanase yang diteliti dengan menggunakan uji *Tukey* pada **Tabel 4.8** di bawah ini,

Tabel 4.8 Hasil uji *Tukey* kategori suhu xylanase

Suhu	Pembandingan	Rata-Rata Selisih	P-value
20	25	0.0345	0.6138
	30	-0.1873	0.0131
	35	-0.0873	0.2119
25	20	-0.0345	0.6138
	30	-0.2218	0.0045
	35	-0.1218	0.0883
30	20	0.1873	0.0131
	25	0.2218	0.0045
	35	0.1000	0.1557
35	20	0.0873	0.2119
	25	0.1218	0.0883
	30	-0.1000	0.1557

Berdasarkan **Tabel 4.8** di atas yang merupakan hasil dari uji *Tukey* menunjukkan bahwa antara kategori suhu 20°C dengan 30°C memiliki hasil yang berbeda, hal ini diketahui dengan nilai signifikansi yaitu 0.0131 atau kurang dari

0.05 yang artinya terdapat perbedaan hasil antara suhu 20°C dengan 30°C. Sedangkan antara suhu 20°C dengan 25°C dan 35°C tidak memberikan hasil yang berbeda karena nilai P berturut-turut 0.6138 dan 0.2119 diketahui lebih dari nilai α , sehingga didapatkan kesimpulan tidak ada perbedaan hasil antara suhu 20°C dengan 25°C dan suhu 20°C dengan 35°C.

Antara suhu 25°C dengan 35°C memberikan hasil sama karena nilai P 0.0883 yang diketahui bahwa lebih besar dari α , sehingga didapatkan kesimpulan tidak ada perbedaan hasil protein sisa xylanase pada suhu 25°C dengan 35°C. Selain itu, suhu 25°C dengan 30°C memiliki perbedaan pengaruh hal ini dikarenakan nilai P yang kurang dari α ($0.0045 < 0.005$). Kemudian untuk suhu 30°C yang belum dijelaskan hanyalah tidak ada perbedaan hasil apabila dibandingkan dengan suhu 35°C, hal ini dikarenakan nilai P yang lebih besar α yaitu sebesar 0.1557 sementara nilai α sebesar 0.05.

Lalu untuk kategori suhu 35°C diketahui memiliki hasil yang sama dengan 20°C, 25°C dan 35°C dalam hal menyisakan protein xylanase tidak terimobilisasi, sehingga didapatkan nilai P atau signifikansi lebih besar dari 0.05.

c. RPM*Suhu

Berikut dijelaskan perbedaan pengaruh interaksi suhu dengan RPM pada setiap kategori terhadap xylanase yang diteliti dengan menggunakan uji *Tukey* dapat dilihat pada **Tabel 4.9**. Berdasarkan hasil uji *Tukey* didapatkan hasil pengelompokan pengaruh antara interaksi RPM dan suhu terhadap sisa kadar protein terimobilisasi pada **Tabel 4.9** berikut,

Tabel 4.9 Hasil Pengelompokan berdasarkan Interaksi RPM dengan suhu

RPM	Suhu	Kelompok	
		1	2
125	25	0.3	
150	35	0.3	
175	35	0.2	
175	20	0.2	
125	35	0.2	
175	25	0.2	
100	25	0.2	
100	35	0.2	
150	30	0.1	
100	30	0.1	
175	30	0.1	
125	30	0.1	
125	20	0	

150	20	0	0
100	20	-0.1	-0.1
150	25		-0.6

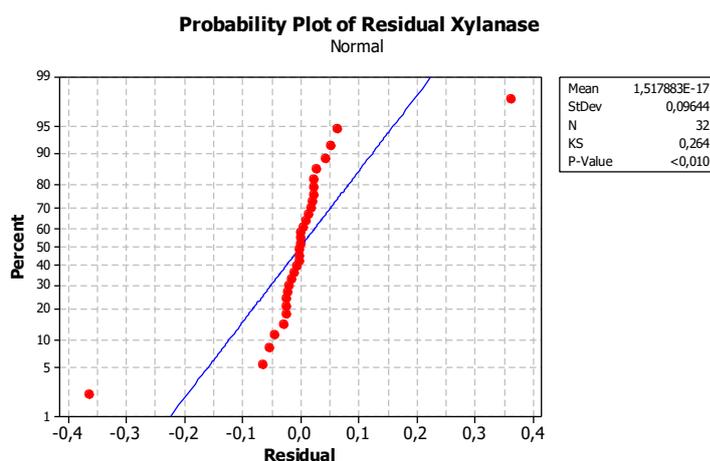
Berdasarkan **Tabel 4.9** di atas diketahui bahwa interaksi antara RPM dan suhu memiliki rata-rata hasil selulase yang berbeda sehingga terdapat 2 kelompok dengan rata-rata yang memiliki kesamaan antar dua kelompok tersebut. Seperti kelompok 1 yang memiliki 15 anggota, 2 diantaranya memiliki kesamaan dengan kelompok 2, dimana anggotanya adalah interaksi antara 150 RPM dengan suhu 20°C dan 100 RPM dengan suhu 20°C sedangkan selainnya tidak memiliki kesamaan dengan kelompok 2.

Kelompok 2 beranggotakan 3 anggota diinteraksikan pula dengan 2 anggota juga memiliki kesamaan dengan kelompok 1 seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya, sedangkan interaksi antara 150 RPM dengan suhu 25°C memiliki hasil yang berbeda dengan karakteristik kelompok 1.

Berikut merupakan pengujian asumsi-asumsi sebelum melakukan analisis dengan menggunakan Two-Ways ANOVA untuk xylanase .

4.4.3.1 Asumsi Distribusi Normal

Distribusi normal merupakan salah satu asumsi yang harus terpenuhi sebelum melakukan pengujian Two-Way ANOVA. Dimana nilai residual pada ANOVA harus berdistribusi normal. Berikut ini adalah hasil pengujian asumsi distribusi normal menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*.



Gambar 4.10. Plot residual ylanase

Pada **Gambar 4.10** di atas merupakan hasil plot distribusi normal dan pengujian asumsi distribusi normal menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Dapat

diketahui bahwa plot residual mengikuti garis normal yang artinya berdistribusi normal. Akan tetapi secara statistik dilakukan pengujian dengan uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan *p-value* sebesar kurang dari 0,01. Artinya residual belum memenuhi asumsi distribusi normal karena *p-value* < 0,05. Sehingga *residual xylanase belum memenuhi asumsi distribusi normal*.

4.4.3.2 Asumsi Identik

Setelah dilakukan pengujian distribusi normal pada residual selanjutnya akan dilakukan pengujian asumsi identik. Pada pengujian asumsi identik, digunakan *Levene Test* untuk melihat apakah residual memenuhi asumsi identik atau tidak. Berikut merupakan hasil pengujian asumsi identik dengan *Levene's Test*.

Test and CI for Two Variances: RESI2 vs C10				
Method				
Null hypothesis	Sigma(1) / Sigma(2) = 1			
Alternative hypothesis	Sigma(1) / Sigma(2) not = 1			
Significance level	Alpha = 0,05			
Tests				
			Test	
Method	DF1	DF2	Statistic	P-Value
Levene's Test (any continuous)	1	30	1,74	0,197

Gambar 4.11 Hasil *Levene's Test* Residual Xylanase.

Gambar di atas merupakan hasil *Levene's Test* dalam pengujian asumsi identik. *P-value* pada gambar di atas sebesar 0,197 yang artinya residual memenuhi asumsi identik karena *p-value* (0,197) > α (0,05). Sehingga *residual xylanase telah memenuhi asumsi identik*.

4.4.3.3 Asumsi Independen

Asumsi independen merupakan asumsi sebelum melakukan analisis dengan Two-Ways ANOVA. Pengujian asumsi independen ini dilakukan menggunakan pengujian Durbin Watson. Setelah melakukan pengujian Durbin Watson didapatkan nilai statistik uji Durbin Watson sebesar 4,574. Nilai statistik uji ini akan dibandingkan dengan nilai tabel Durbin Watson dengan $n=32$ dan banyaknya variabel adalah 3 maka nilai tabel Durbin Watson *Lower* (DL) sebesar 1,309 serta nilai tabel Durbin Watson *Upper* (DU) sebesar 1,573. Pada pengujian Durbin Watson nilai Durbin Watson (DW) > nilai tabel Durbin Watson *Lower* (DL) artinya residual tidak terdapat korelasi positif antar pengamatan. Sedangkan nilai (4-DL)

sebesar 2,69, maka residual terdapat korelasi negatif antar pengamatan karena nilai $DW > (4-DL)$. Sehingga *belum memenuhi asumsi independen*.

4.5 Hidrolisis

Hidrolisis dilakukan dengan 3 kombinasi yang menggunakan substrat sabut kelapa hasil pretreatment. Merujuk pada penelitian sebelumnya (Lidya, Irma, 2017) yang menggunakan perbandingan massa untuk melakukan imobilisasi, maka dalam penelitian ini menggunakan metode yang sama. Metode tersebut dimodifikasi dengan mengambil proporsi perbandingan massa dari penelitian sebelumnya dan merubah kombinasi seperti **Tabel 4.10** di bawah ini.

Tabel 4.10 Kombinasi hidrolisis sabut kelapa oleh selulase dan xylanase

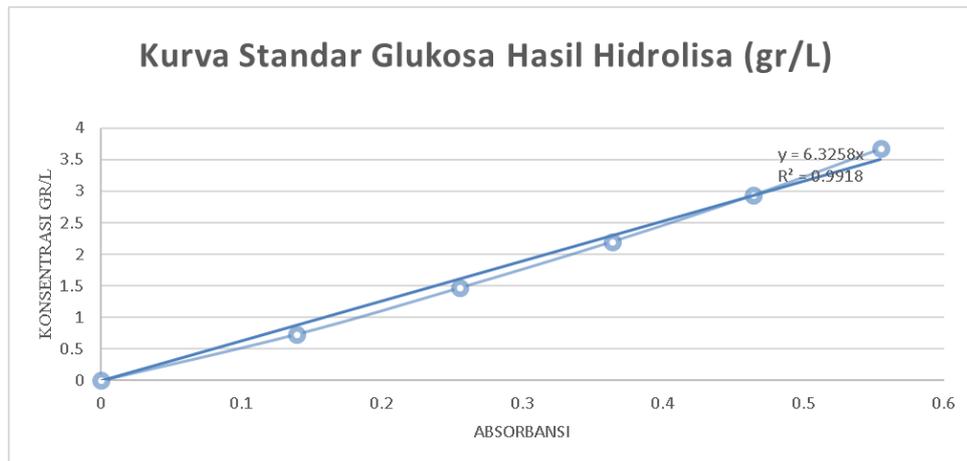
Kombinasi	Perbandingan Massa (gr)		
	Selulase		Xylanase
	An	Tr	
A	2		1
	0.67		0.333
	0.446	0.223	0.333
B	Selulase		Xylanase
	An	Tr	
	1		1
	0.5		0.5
	0.334	0.1667	0.5
C	Selulase		Xylanase
	An	Tr	
	1		2
	0.333		0.667
	0.222	0.111	0.667

Sebelum melakukan uji glukosan enzim diimobilisasi pada magnetic kitosan selama 24 jam pada kondisi operasi optimum (sesuai kesimpulan data optimasi). Tahapan selanjutnya adalah mempersiapkan kurva standart gula reduksi yang akan digunakan untuk perhitngn konsentrasi gula reduksi hasil hidrolisis. Prosedur pembuatan kurva standart ini sama seperti prosedur pembuatan kurva standart untuk mengukur keaktifan enzim, akan tetapi tidak menggunakan CMC melainkan menggunakan akuades. Hal ini dikarenakan konsentrasi yang ingin diukur adalah konsentrasi gula reduksi saja bukan konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan oleh enzim (aktifitas enzim).

Tabel 4.11 (a) Perhitungan kurva standart glukosa untuk hidrolisis tanpa CMC

Larutan Glukosa 0,024 M (ml)	Buffer (ml)	V total (ml)	Konsentrasi				Absorbansi
			µmol/ml		gr/L		
			Di tabung	Di kuvet	Di tabung	Di kuvet	
0	5	5	0	0	0	0	0
1	4	5	4.0822222	0.163289	0.7348	0.029392	0.139
2	3	5	8.1644444	0.326578	1.4696	0.058784	0.255
3	2	5	12.246667	0.489867	2.2044	0.088176	0.364
4	1	5	16.328889	0.653156	2.9392	0.117568	0.464
5	0	5	20.411111	0.816444	3.674	0.14696	0.555

Dari data kurva tersebut kemudian diplot grafik dengan data x sebagai absorbansi dan y sebagai konsentrasi glukosa dalam kuvet (gr/L). Setelah itu dilakukan regresi linear untuk mendapatkan persamaan garis linier. Berikut merupakan grafik kurva standart glukosa tanpa CMC untuk pengujian gula reduksi hasil hidrolisis.



Gambar 4.12 Kurva standart glukosan tanpa CMC

Dari **Gambar 4.12** di atas didapatkan persamaan $y=6,3258x$ dimana y adalah konsentrasi glukosan dalam tabung (gr/L) dan x adalah absorbansi, selanjutnya persamaan ini digunakan untuk menghitung konsentrasi gula reduksi yang terbentuk pada proses hidrolisis substrat.

4.5.1 Hidrolisis Substrat Sabut Kelapa (hasil *pretreatment*)

Substrat yang digunakan untuk hidrolisis adalah sabut kelapa yang telah dipretreatment secara mekanis dan kimiawi. Sedangkan carrier yang digunakan adalah magnetic kitosan. Enzim yang telah terimobilisasi ditimbang dengan massa total 0.1gr (**Tabel 4.11 a**). dan ditambahkan 1 gr sabut kelapa (120 mess) ke dalam Erlenmeyer 100ml kemudian dimasukan ke dalam *incubator shaker* selama minimal 48 jam pada suhu 60C. Selanjutnya sampling dilakukan mulai jam ke-0 dengan mengambil supernatant masing-masing sampel sebanyak 1ml menggunakan mikropipet dan memasukkan ke dalam *microtube* uk 1.5ml. Sampling dilakukan setiap 6 jam selama minimal 48 jam (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60). Kemudian sampel dalam *microtube* dipisahkan supernatannya menggunakan *microcentrifuge* selama 15 menit 15000rpm, selanjutnya 0.2ml supernatant diambil untuk diuji DNS.



Gambar 4.13 (a) Grafik konsentrasi gula hasil hidrolisa sabut kelapa oleh kombinasi enzim terimobilisasi

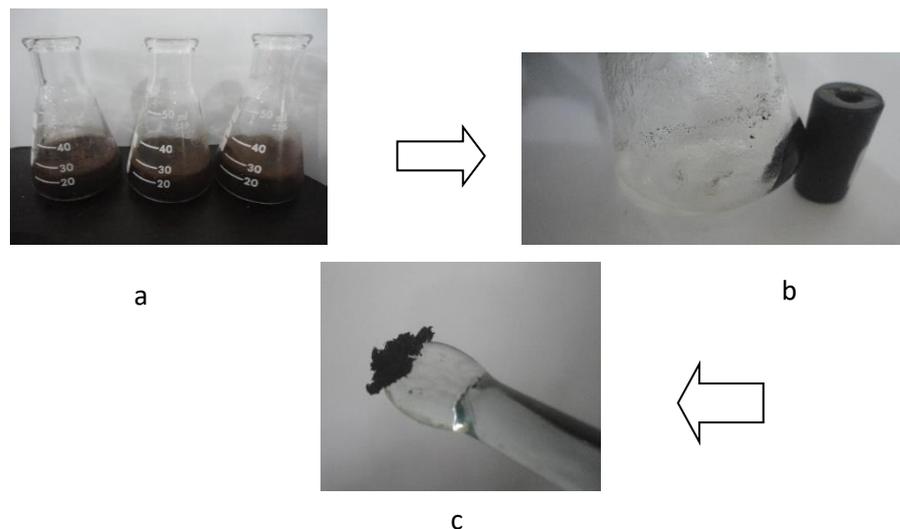
Tabel 4.11 (b) Konsentrasi gula hasil hidrolisa sabut kelapa oleh kombinasi enzim terimobilisasi

Hidrolisis	Sampel	Konsentrasi gula reduksi($\mu\text{m/ml}$)	Konsentrasi gula (gr/L)	Massa gula reduksi (gr)	Yield (gr/gr sabut kelapa)	Yield(gr Gula/gr Hemiselulososa+selulososa)
Kombinasi	A10	4.8323	0.8697975	0.01739595	0.01739595	0.029656
	B10	7.977688	1.4359566	0.02871913	0.028719132	0.048959
	C10	6.85308	1.233531	0.02467062	0.02467062	0.042057

Dari **Gambar 4.13** di atas diketahui bahwa konsentrasi yang dihasilkan pada variable kombinasi B menghasilkan data yang paling besar dari pada kombinasi yang lain (hasil akhir pada sampling ke-10). Merujuk pada penelitian Anwar, 2011 yang menyatakan bahwa pembuatan gula reduksi dengan enzim *A. niger* dan *T. resei* menghasilkan hasil yang optimal, dan dalam penelitian ini ditambahkan xylanase dengan perbandingan 1:1 (selulase:xylanase) ternyata mampu menghasilkan hasil gula reduksi paling tinggi yaitu 1.436g/L (*yield*=0.049 gr) pada jam ke 60. Sedangkan untuk kombinasi A menghasilkan konsentrasi gula reduksi sebanyak 0.87g/L (*yield*=0.03) dan kombinasi C sebanyak 1.233g/L (*yield*=0.042gr). Dapat disimpulkan bahwa kombinasi ini juga mampu menghasilkan gula reduksi cukup signifikan sesuai dengan teori dalam buku Arief Widjaja 2016 yang menyatakan bahwa ikut terdegradasinya hemiselulosa oleh xylanase, maka akses selulase untuk menyerang selulosa akan lebih mudah sehingga konversi selulosa menjadi glukosa akan menjadi lebih tinggi.

4.5.2 Pemisahan Enzim dengan Substrat

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa salah satu luaran dalam penelitian ini adalah untuk menciptakan enzim terimobilisasi pada matriks yang reusable maka cara yang digunakan untuk memisahkan enzim dari supernatan/substrat adalah dengan menggunakan magnet.



Gambar 4.14 (a) sampel hidrolisis, (b) dipisahkan enzim terimobilisasinya dengan magnet, (c) *magnetic* kitosan yang telah terpisah dari pelarutnya

Berdasarkan **Gambar 4.14** diketahui bahwa magnetic kitosan hasil modifikasi dapat dipisahkan dari pelarut/campurannya. Sehingga dapat digunakan kembali, sesuai dengan (Safarik et al., 2014) bahwa *magnetic* kitosan memiliki keunggulan: *biocompatibility*, availabilitas grup fungsional yang reaktif untuk modifikasi kimia, *hydrophilicity*, stabilitas mekanik, regenerabilitas, dan mempersingkat preparasi konfigurasi geometric selama proses biotransformasi terjadi. Selain dari data hasil gula reduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisis oleh enzim yang terimobilisasi pada *magnetic* kitosan, parameter lain yang ingin dilaporkan adalah keberadaan gugus fungsi atau ikatan antar enzim dengan *magnetic* kitosan dengan melakukan uji FTIR.

4.6 Uji FTIR

Spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) merupakan metode yang penting untuk karakterisasi struktur yang memberikan informasi pada ikatan rentang pendek dan rentang panjang yang diakibatkan oleh elektrostatis kisi (Smith, 2011). Hasil uji FTIR sampel pada penelitian ini ditunjukkan pada tabel di bawah ini (**Tabel 4.12**).

Tabel 4.12 Hasil uji FTIR

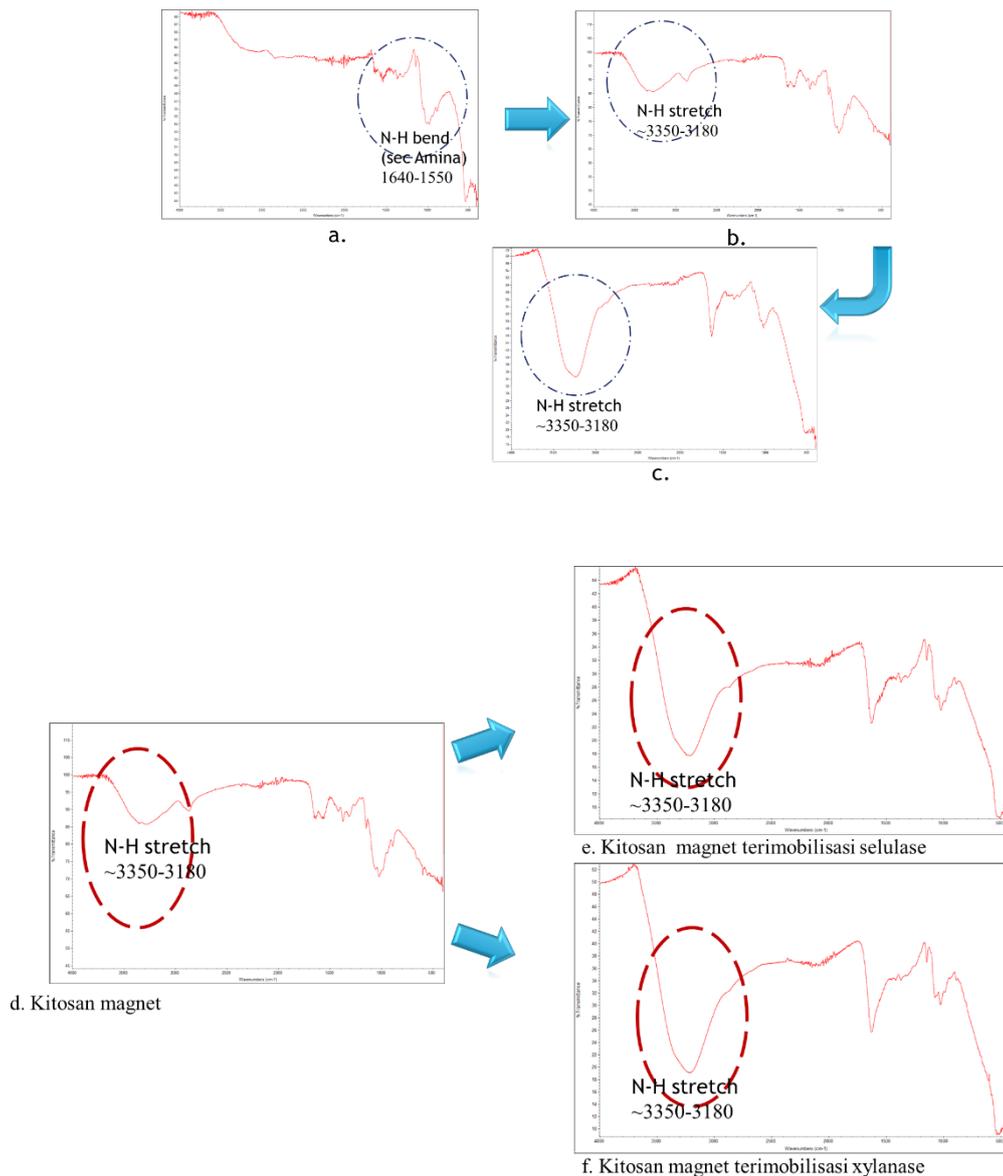
Wave number	Fungsional grup	Sampel								
		K	KM	KMGDA	K. A. niger	KM. xylanase	KM. xylanase	KM. T.resei	KMGDA. T. resei	KMGDA. xylanase
3350 & 3180	N-H stretch	v			v		v			
3400-3200	O-H	v	v	v	v	v	v	v	v	v
1300-1100	C-O stretch	v			v (sec)	v		v	v	
2860-2800	C-H stretch	v		v	v	v		v		
1700-1680	C=O	v	v	v	v	v		v		v
1640-1550	N-H bend (sec amina)	v	v	v	v			v	v (sec)	v
1350-1000	C-N stretch	v	v	v	v	v	v	v	v	v

Keterangan:

- K : Kitosan
- KM : Kitosan magnetik
- KM GDA : Kitosan magnetik yang berikatan dengan Gluteraldehid
- Sec : ikatan sekunder

Berdasarkan **Tabel 4.12** dan **Gambar 4.15 abc** dan **def** diketahui bahwa sampel yang diuji mengandung gugus amina, alkane, alcohol, dan alkena baik ikatan primer maupun sekunder. Data tersebut sesuai dengan (Pillai, Paul and Sharma, 2009) bahwa kitosan mengandung gugus fungsi tersebut. Selain itu kitosan sendiri mengandung ikatan hidrogen intermolekuler maupun intramolekuler lebih

rendah dibandingkan kitin sehingga **lebih mudah diaplikasikan** dalam beberapa reagen. Kitosan yang telah dimodifikasi dengan magnet dan diimobilisasi dengan enzim masih mampu mempertahankan gugus fungsinya (stabil). Berdasarkan (Safarik *et al.*, 2014) *Magnetic* kitosan memiliki grup fungsional yang reaktif untuk modifikasi kimia, *hydrophilicity*, stabilitas mekanik, regenerabilitas, dan mempersingkat preparasi konfigurasi geometric selama proses biotransformasi terjadi (Safarik *et al.*, 2014)



Gambar 4.15 (a) Kitosan non magnet, (b) kitosan magnetik, (c) kitosan magnetic GDA, (d)(e) & (f) perubahan gugus setelah terimobilisasi enzim

4.7 Uji BET

Surface Area Analyzer (SAA) menggunakan prinsip **Brunauer–Emmett–Teller (BET)** merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk karakterisasi material. Alat yang digunakan dalam penelitian ini berfungsi untuk menentukan luas permukaan material, distribusi pori dari material dan isotherm adsorpsi suatu gas pada suatu bahan. Prinsip karakterisasi mengacu pada mekanisme adsorpsi gas, umumnya nitrogen, argon dan helium, pada permukaan suatu bahan padat yang akan dikarakterisasi pada suhu konstan atau pada suhu didih dari gas tersebut. Alat yang digunakan pada dasarnya hanya mengukur jumlah gas yang dapat dijerap oleh suatu permukaan padatan pada tekanan dan suhu tertentu. Sehingga dapat diketahui volume gas spesifik yang dapat dijerap oleh suatu permukaan padatan pada suhu dan tekanan tertentu dan dapat diketahui secara teoritis luas permukaan dari satu molekul gas yang dijerap, maka luas permukaan total padatan tersebut dapat dihitung.

Uji BET dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Elektrokimia Departemen Teknik Kimia FTI Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Tabel 4.13 Hasil uji BET

Kitosan non magnet	Kitosan magnet
1. BET summary Slope = -90.021 Intercept = -8.897e+00 Correlation coefficient, r = 0.993723 C constant = 11.118 Surface Area = 0.000 m ² /g 2. Total pore volume = 5.204e-01 cc/g for pores smaller than 1720.8 nm (Diameter) at P/Po = 0.99889	1. BET summary Slope = 11533.798 Intercept = -1.272e+03 Correlation coefficient, r = 0.525679 C constant = -8.069 Surface Area = 0.339 m ² /g 2. Total pore volume = 2.177e-02 cc/g for pores smaller than 117.1 nm (Diameter) at P/Po = 0.98332

Sampel yang diuji BET adalah sampel material kitosan non magnet dan kitosan magnetik. Tujuan dilakukannya uji ini adalah untuk mengetahui perubahan kondisi (luas permukaan maupun volume pori) kedua material tersebut. Berdasarkan **Tabel 4.13** diketahui bahwa luas permukaan kitosan non magnet 0m²/g sedangkan kitosan magnet 0.339m²/g. Di sisi lain, diketahui bahwa volume pori kitosan non magnet mengalami reduksi dari 5.204e-01 cc/g menjadi 2.177e-02 cc/g setelah dimodifikasi dengan iron dioxide. Dari data tersebut belum dapat disimpulkan secara jelas, karena slope yang didapat bernilai sangat kecil bahkan negatif. Hal tersebut bias saja terjadi dikarenakan beberapa hal diantaranya gas yang digunakan untuk BET menyebabkan beberapa dekomposisi senyawa, jadi membebaskan air atau komponen lainnya, selain itu juga dapat terjadi apabila molekul pelarut yang teradsorpsi pada permukaan hadir dalam sampel. Sehingga diperlukan kehati-hatian selama melakukan analisa (Thommes *et al.*, 2015)

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan:

1. Imobilisasi selulase dan xylanase pada *magnetic* kitosan dipengaruhi oleh **temperatur dan shear (rotasi)**. Setelah dilakukan optimasi pada variabel tersebut diperoleh kondisi optimal imobilisasi enzim pada temperatur **25C 150rpm**.
2. **Kadar protein selulase** yang terimobilisasi pada magnetic kitosan mencapai **100%**, sedangkan **kadar protein xylanase mencapai 88%** (pada 150rpm/25°C). Di sisi lain prosentase kadar protein kedua enzim tersebut yang terimobilisasi pada **kitosan non magnet lebih rendah (selulase 92%, xylanase 82%)**.
3. Setelah diketahui kondisi operasi yang terbaik, selanjutnya dilakukan imobilisasi enzim dengan mengombinasikan selulase dan xylanase untuk mendegradasi lignoselulosa (sabut kelapa). **Kombinasi enzim yang menghasilkan gula reduksi paling tinggi** adalah perbandingan **1:1 (selulase:xylanase) sebesar 1.434 gr/L pada jam ke-60**.
4. Berdasarkan **hasil uji FTIR** diketahui bahwa imobilisasi selulase dan xylanase pada magnetik kitosan terdapat gugus amina, aldehyd, keton dan alkohol, hal tersebut menunjukkan immobilisasi selulase dan xylanase pada matriks *magnetic* kitosan (*insoluble matrix*) telah terjadi secara kovalen dan *cross link* selama proses imobilisasi.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah melakukan pengulangan uji BET pada kitosan non magnet dan kitosan magnet. Hal tersebut dilakukan untuk menggambarkan luas pori material pendukung sebelum dan sesudah modifikasi serta melakukan uji degradasi lignoselulosa menggunakan kombinasi enzim yang terbaik (ditambah GDA) sebagai pembanding (kontrol positif).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, I. N. *et al.* (2013) 'Subcritical water and dilute acid pretreatments for bioethanol production from *Melaleuca leucadendron* shedding bark', *Biochemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 78, pp. 44–52. doi: 10.1016/j.bej.2013.03.008.
- Albumin, B. P. (1990) 'Albumin from bovine serum', *SigmaAldrich*, 815(1), pp. 2–5.
- Anam, K. (2010) 'Pengukuran Kadar Protein'.
- 'Anwar(2008)Study of The Enzymatic Hydrolysis of Alkaline Pretreated Rice Strow Using Cellulase of Various Sources and Compositions.pdf' (no date).
- Anwar, Z., Gulfraz, M. and Irshad, M. (2014) 'ScienceDirect Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review', *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. Elsevier Ltd, 7(2), pp. 163–173. doi: 10.1016/j.jrras.2014.02.003.
- Bergey, D. H. (2005) 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol 2: The Proteobacteria Part A - Introductory Essays', *Springer-Verlag New York Inc.*, p. 332. doi: 10.1345/aph.1P777.
- Biró, E., Sz, Á., *et al.* (2008) 'Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization', 70, pp. 1240–1246. doi: 10.1016/j.jprot.2007.11.005.
- Brena, B. M. and Batista-viera, F. (no date) 'Immobilization of Enzymes A Literature Survey'.
- Chen, M., Zhao, J. and Xia, L. (2008) 'Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars', *Carbohydrate Polymers*, 71(3), pp. 411–415. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.06.011.
- Cheng, C. and Chang, K. C. (2013) 'Development of immobilized cellulase through functionalized gold nano-particles for glucose production by continuous hydrolysis of waste bamboo chopsticks', *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier Inc., 53(6–7), pp. 444–451. doi: 10.1016/j.enzmictec.2013.09.010.
- Dittmann, S. (2000) 'Zonation of benthic communities in a tropical tidal flat of north-east Australia (Vol 43, pg 33, 2000)', *Journal of Sea Research*, 43(2),

p. 178.

- El-Ghaffar, M. A. A. and Hashem, M. S. (2010) 'Chitosan and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 81(3), pp. 507–516. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.02.025.
- Fermentation, A. and Yield, L. (1981) 'Acidogenic Fermentation of Lignocellulose-Acid Yield and Conversion of Components', XXIII, pp. 2167–2170.
- Howard, R. L. *et al.* (2003) 'Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production', *African Journal of Biotechnology*, 2(12), pp. 602–619. doi: 10.5897/AJB2003.000-1115.
- Ii, B. A. B. and Kitin, S. (2009) 'Gambar 1. Struktur Kitin (Muzzarelli, 1977)'.
Kokufuta, E. (1992) 'Prog. Polym. Sci.', 17, pp. 647–697.
- Krajewska, B. (2004) 'Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review', 35, pp. 126–139. doi: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
- Kumar, R. and Wyman, C. E. (2009) 'Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments', *Biotechnology and Bioengineering*, 103(2), pp. 252–267. doi: 10.1002/bit.22258.
- Lee, J. M. (2001) 'Biochemical Engineering'.
- Liu, M. *et al.* (2015) 'Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic An immobilized bifunctional xylanase on carbon-coated chitosan nanoparticles with a potential application in xylan-rich biomass bioconversion', 'Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic'. Elsevier B.V., 120, pp. 119–126. doi: 10.1016/j.molcatb.2015.07.002.
- Muzzarelli, R. A. A. and Consulting, M. (no date) *Chitin and chitosan hydrogels, Handbook of hydrocolloids*. Woodhead Publishing Limited. doi: 10.1533/9781845695873.849.
- Pandey, S. *et al.* (2014) 'Effect of Various Physiological Parameters and Different Carbon Sources on Cellulase and Xylanase Induction by Different Strains of Trichoderma Species', 3(1), pp. 1–5. doi: 10.4172/2329-6674.1000120.

- Pe, J. (2002) 'Biodegradation and biological treatments of cellulose , hemicellulose and lignin : an overview', pp. 53–63. doi: 10.1007/s10123-002-0062-3.
- Pillai, C. K. S., Paul, W. and Sharma, C. P. (2009) 'Progress in Polymer Science Chitin and chitosan polymers : Chemistry , solubility and fiber formation', 34, pp. 641–678. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001.
- Polaina Julio, A. P. M. (2007) *Industrial enzym: structure, function and application*. Valencia, spanyol: Springer.
- Pospiskova, K. and Safarik, I. (2013) 'Low-cost , easy-to-prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 96(2), pp. 545–548. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.04.014.
- Pospiskova, K. and Safarik, I. (2015) 'Low-temperature magnetic modification of sensitive biological materials', *Materials Letters*. Elsevier, 142, pp. 184–188. doi: 10.1016/j.matlet.2014.11.163.
- Rafael, C. *et al.* (2016) 'Co-immobilization and stabilization of xylanase , α -xylosidase and α -l-arabinofuranosidase from *Penicillium janczewskii* for arabinoxylan hydrolysis', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 51(5), pp. 614–623. doi: 10.1016/j.procbio.2016.02.014.
- Ramadhani, D., Kumala, G. E. and Widjaja, A. (2015) 'Produksi Gula Reduksi Dengan Hidrolisis Sabut Kelapa Hasil Pretreatment Alkali Menggunakan Crude Enzim Terimobilisasi'.
- Romo-sánchez, S. *et al.* (2014) 'Immobilization of Commercial Cellulase and Xylanase by Different Methods Using Two Polymeric Supports', (May), pp. 517–526.
- Safarik, I. *et al.* (2014) 'Mechanochemical synthesis of magnetically responsive materials from non-magnetic precursors', *Materials Letters*. Elsevier, 126, pp. 202–206. doi: 10.1016/j.matlet.2014.04.045.
- Santos-moriano, P., Woodley, J. M. and Plou, F. J. (2016) 'Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Continuous production of chitooligosaccharides by an immobilized enzyme in a dual-reactor system', *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*. Elsevier B.V., 133, pp. 211–217. doi: 10.1016/j.molcatb.2016.09.001.

- Shrivastava, S., Lata, S. and Shukla, P. (2012) ‘An Insight on Recent Advances on Immobilization Methods for Industrial Enzymes and its Relevance to Xylanases’.
- Silvério, S. (2013) *SUSTAINABLE DEGRADATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS - TECHNIQUES , APPLICATIONS AND Edited by Anuj K . Chandel.*
- Smith, B. C. (2011) *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy.* London, New York.
- Sujoy, B. and Aparna, A. (2013) ‘Enzymology , Immobilization and Applications of Urease Enzyme’, *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(6), pp. 51–56.
- Thommes, M. *et al.* (2015) ‘Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report)’, *Pure and Applied Chemistry*, 87(9–10), pp. 1051–1069. doi: 10.1515/pac-2014-1117.
- Weir, E. and McSpadden, C. (2010) ‘Production of Industrial Enzymes in Fermentation’, *Enzymes in Food Technology*, pp. 45–46.

Lampiran A

A. Perhitungan volume enzim untuk imobilisasi

ENZIM	Konsentrasi Enzim (ml)	A (rata-rata)	Slope	Konsentrasi	Konsentrasi (mg/ml)	Rata-rata konsentrasi	Aktifitas U/ml	Rata-rata aktifitas	Aktifitas spesifik (Unit/mg)	Aktifitas spesifik	Kebutuhan mg protein (ml)	
											6mg	Rata-rata (ml)
Xylanase	0.05	0.628	1.4024	0.8807072	17.614144	17.62349333	0.023085	0.0807975	0.001310594	0.0045829	0.3406353	0.340454731
	0.05	0.6286667	1.4024	0.881642133	17.63284267		0.13851		0.007855228		0.3402741	
Selulase <i>A.niger</i>	0.05	0.0453333	1.4024	0.063575467	1.271509333	1.388376	6.765757	7.333874	5.321043914	5.2853449	4.7188014	4.352434816
	0.05	0.0536667	1.4024	0.075262133	1.505242667		7.901991		5.249645904		3.9860682	
Selulase <i>T. reesei</i>	0.05	0.1366667	1.4024	0.191661333	3.833226667	4.581173333	6.0685225	6.0814343	1.583136879	1.3633651	1.5652609	1.3455752
	0.05	0.19	1.4024	0.266456	5.32912		6.094346		1.143593314		1.1258895	

B. Hasil perhitungan gula reduksi

No.	Kombinasi enzim (Pengambilan jam ke-)	A (rata-rata)	Slope (Non CMC)	Konsentrasi gula reduksi(µm/ml)	Slope (Glukosa hasil hidrolisa)	Konsentrasi gula (gr/L)
1	A0	0	35.144	0	6.3258	0
2	B0	0.0045	35.144	0.158148	6.3258	0.0284661
3	C0	0	35.144	0	6.3258	0
4	A1	0.010166667	35.144	0.357297333	6.3258	0.0643123
5	B1	0.0075	35.144	0.26358	6.3258	0.0474435
6	C1	0.011	35.144	0.386584	6.3258	0.0695838

7	A2	0.011333333	35.144	0.398298667	6.3258	0.0716924
8	B2	0.0135	35.144	0.474444	6.3258	0.0853983
9	C2	0.0175	35.144	0.61502	6.3258	0.1107015
10	A3	0.0155	35.144	0.544732	6.3258	0.0980499
11	B3	0.017	35.144	0.597448	6.3258	0.1075386
12	C3	0.019	35.144	0.667736	6.3258	0.1201902
13	A4	0.019	35.144	0.667736	6.3258	0.1201902
14	B4	0.0245	35.144	0.861028	6.3258	0.1549821
15	C4	0.02	35.144	0.70288	6.3258	0.126516
16	A5	0.0265	35.144	0.931316	6.3258	0.1676337
17	B5	0.034	35.144	1.194896	6.3258	0.2150772
18	C5	0.0265	35.144	0.931316	6.3258	0.1676337
19	A6	0.0365	35.144	1.282756	6.3258	0.2308917
20	B6	0.058	35.144	2.038352	6.3258	0.3668964
21	C6	0.0675	35.144	2.37222	6.3258	0.4269915
22	A7	0.0505	35.144	1.774772	6.3258	0.3194529
23	B7	0.079	35.144	2.776376	6.3258	0.4997382
24	C7	0.1085	35.144	3.813124	6.3258	0.6863493
25	A8	0.0685	35.144	2.407364	6.3258	0.4333173
26	B8	0.118	35.144	4.146992	6.3258	0.7464444
27	C8	0.127	35.144	4.463288	6.3258	0.8033766
28	A9	0.093	35.144	3.268392	6.3258	0.5882994
29	B9	0.1605	35.144	5.640612	6.3258	1.0152909
30	C9	0.1485	35.144	5.218884	6.3258	0.9393813
31	A10	0.1375	35.144	4.8323	6.3258	0.8697975

32	B10	0.227	35.144	7.977688	6.3258	1.4359566
33	C10	0.195	35.144	6.85308	6.3258	1.233531

Keterangan

Massa Glukosa	0.3674	
Volume larutan	100	
BM Glukosa	180	
Mol	0.0020411	mol
	2.0411111	mmol
Konsentrasi Glukosa		
Awal	0.0000204	mol/ml
	20.4111111	μ mol/ml
Konsentrasi Glukosa	3.674	gr / L

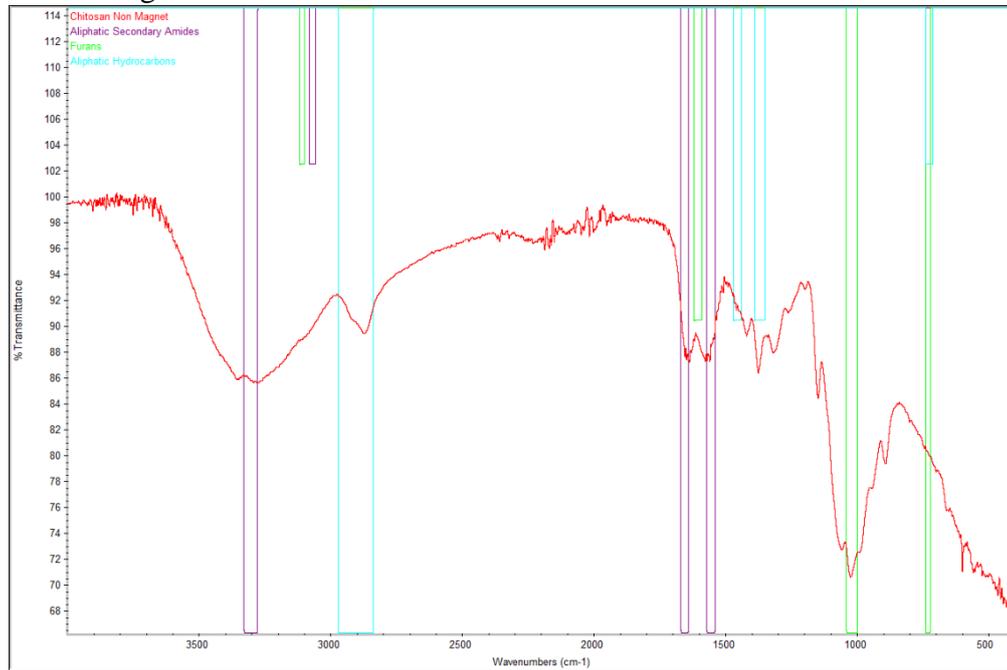
Komposisi substrat untuk degradasi lignoselulosa

Enzim yang dimasukkan	0.1	gr
Lignoselulosa	1	gr
Buffer Phospat pH 7	20	ml

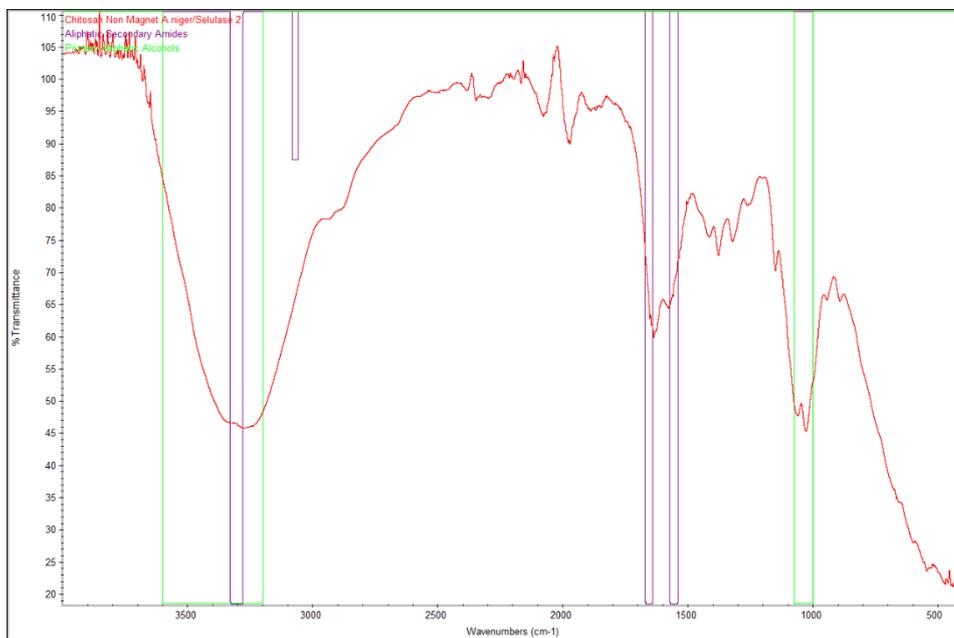
“Halaman ini sengaja dikosongkan”

Lampiran B

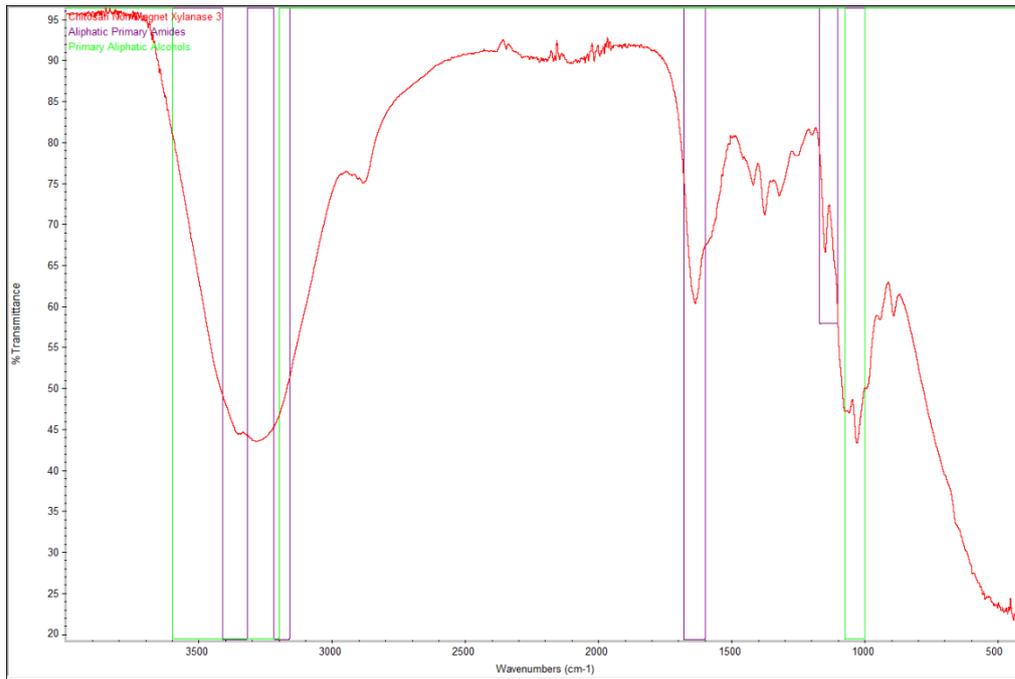
1. Magnetik Kitosan



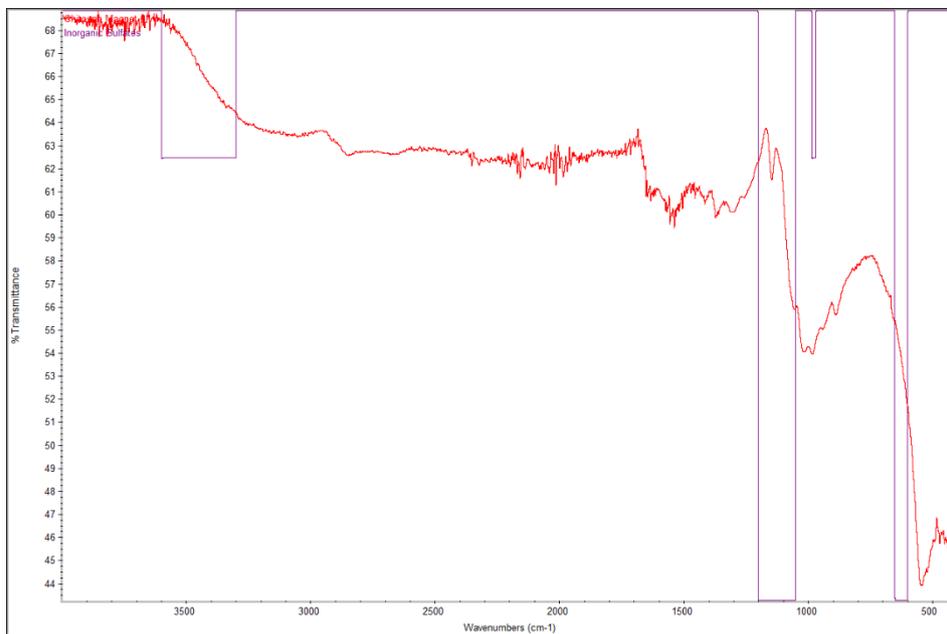
2. Kitosan non magnet terimobilisasi A. niger



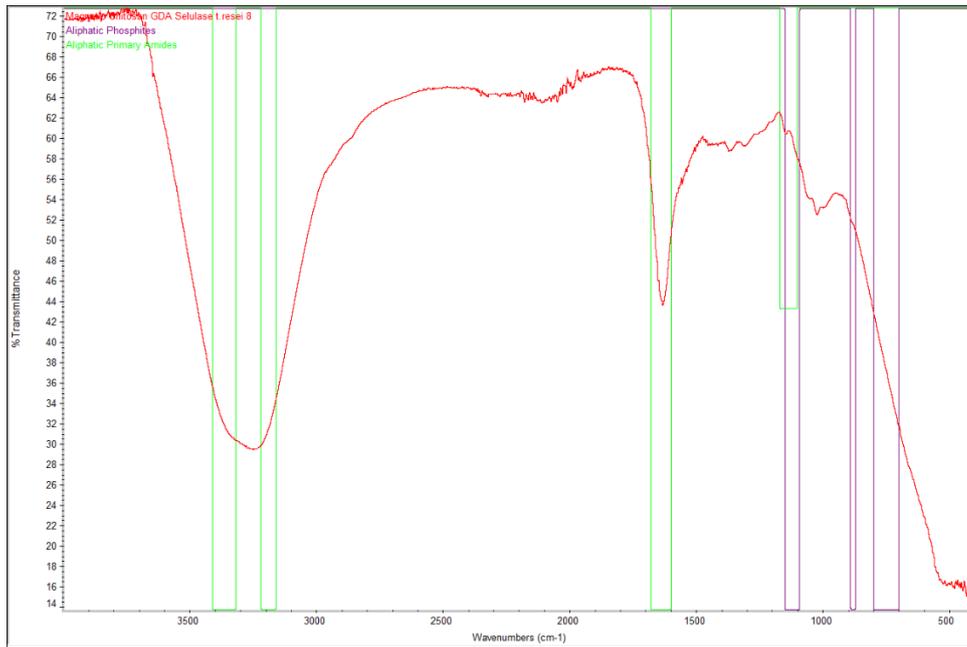
3. Kitosan magnet terimobilisasi xylanase



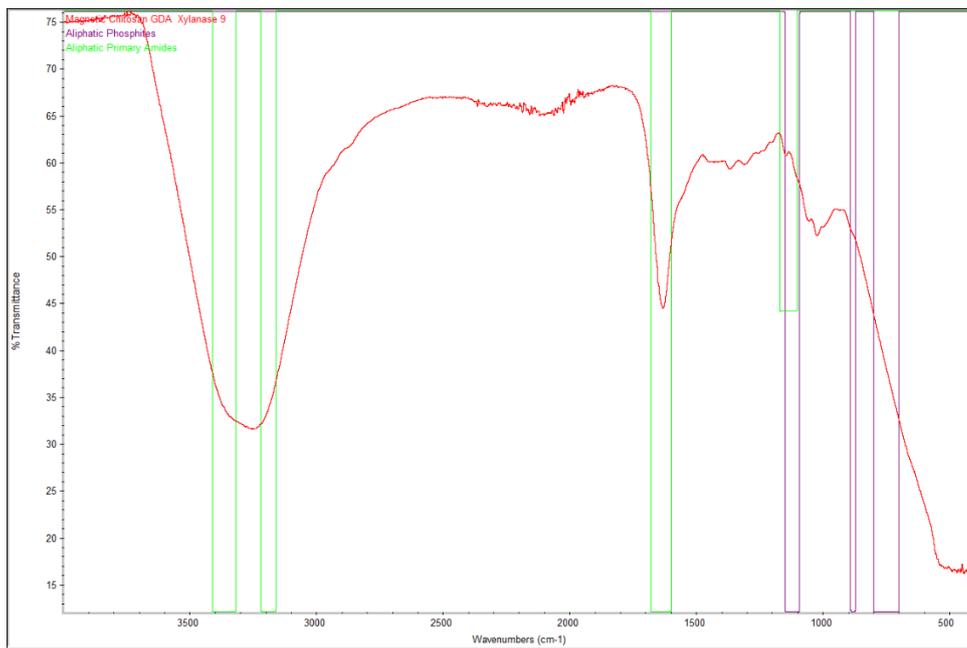
4. Kitosan non magnet



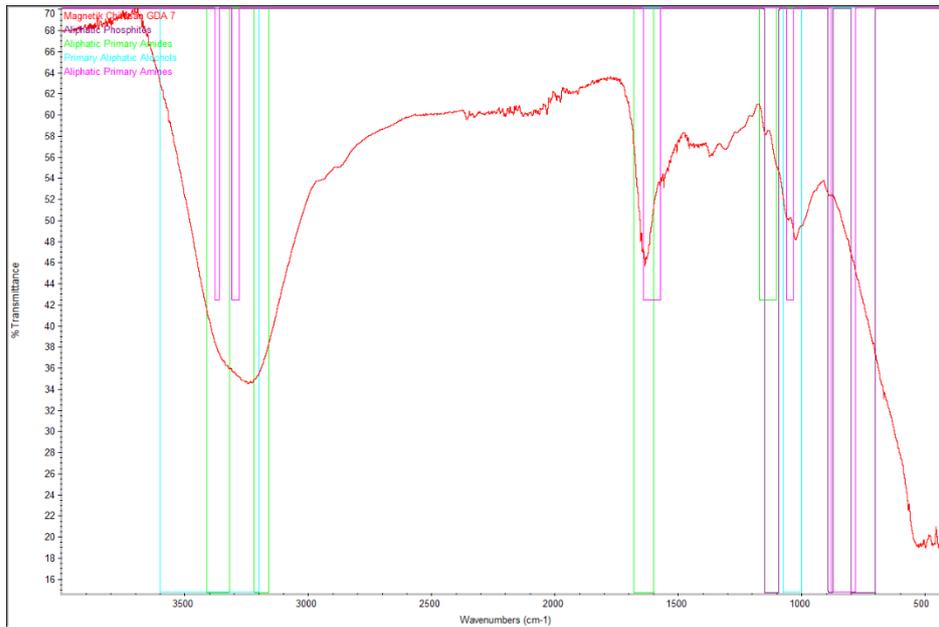
5. Kitosan magnetic GDA terimobilisasi T. resei




6. Kitosan magnet GDA terimobilisasi xylanase




7. Magnetik kitosan GDA



8. Magnetik kitosan terimobilisasi xylanase



9. Magnetik kitosan terimobilisasi T. resei



“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BIODATA PENULIS



Penulis adalah istri dari Muhammad Yusuf Hasbi Avissena dan putri bungsu dari pasangan Bapak Robbien dan Ibu Sringah yang dilahirkan pada tanggal 12 November 1992 di Surabaya (Jawa Timur). Penulis merupakan alumni dari TK Dharmawanita Keboan Anom, SDN Keboan Sikep 1, SMPN 1 Sidoarjo, SMAN 1 Gedangan dan menyelesaikan studi S1 Biologi (Prodi Mikrobiologi dan Bioteknologi) di Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya tahun 2014. Penulis melanjutkan studi S2 Teknik Kimia di Institut Teknologi Sepuluh Nopember sejak semester genap tahun ajaran 2015-2016. Selama menempuh studi S2, penulis pernah mengikuti seminar internasional sebagai pembicara di *International Conference on Engineering and Applied Technology* (UM Mataram Indonesia, November 2017). Penulis menyelesaikan Tesis yang berfokus pada bidang *Bochemical Optimation Handling Process*, khususnya pada proses mobilisasi selulase dan xylanase pada kitosan magnet untuk produksi gula reduksi. Penulis memiliki hobi berpetualang dan menemukan hal baru.

Email : sidratu.marinebiology@gmail.com atau niya.sidratu@gmail.com