

PEMURNIAN ENZIM SELULASE DARI RUMEN SAPI MENGUNAKAN TEKNOLOGI EXPANDED BED ADSORPTION

PURIFICATION OF CELLULASE FROM COW RUMEN LIQUID BY USING EXPANDED BED ADSORPTION

Indah Hartati¹

¹Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik
Universitas Wahid Hasyim Semarang
Jalan Menoreh Tengah X no 22 Sampangan Semarang
Email:hartatiprasetyo@gmail.com

Abstrak

Keluasan lingkup penggunaan enzim telah mendorong pertumbuhan pasar dan produksi enzim. Salah satu jenis enzim hidrolase yang memiliki pangsa pasar cukup besar adalah selulase. Saat ini produksi enzim selulase dari ruminansia belum banyak dilirik. Namun demikian selulase yang berasal dari ruminansia, seperti cairan rumen sapi, sangat berpotensi untuk diproduksi mengingat ketersediaan sumber isolat yang besar. Potensi limbah cairan rumen sapi di Indonesia mencapai 54,25 juta liter/tahun pada tahun 2007. Isolat enzim dari rumen sapi disebutkan memiliki berbagai kelebihan dibandingkan enzim komersial, diantaranya, lebih stabil pada suhu tinggi, aktivitas spesifik lebih tinggi, pH optimum lebih tinggi dan biaya produksi yang lebih rendah. Proses pemurnian enzim merupakan tahapan krusial dalam proses produksi enzim. Salah satu teknik pemurnian protein adalah expanded bed adsorption (EBA). EBA adalah teknik kromatografi pemisahan dan pemurnian produk biologi langsung dari umpan, tanpa melalui proses sentrifugasi, mikrofiltrasi dan tahap penjernihan lainnya. Mengingat unggun pada kolom dapat terekspansi, maka luas permukaan kontak adsorben lebih besar sehingga interaksi adsorben dengan molekul target lebih efektif. Dalam proses pemurnian protein menggunakan EBA, perlu ditelaah karakteristik ekspansi dan hidrodinamikanya, seperti indeks Richardson-Zaki (n), bilangan Bodenstein (B_o) dan koefisien dispersi aksial (D_{axl}) yang mewakili kondisi dispersi cairan dan sifat fluidisasi.

Kata Kunci: selulase, cairan rumen sapi, EBA.

Pendahuluan

Enzim adalah molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi kimia dengan tingkat spesififikasi dan peningkatan

laju reaksi yang tinggi (Richana, 2002; Beilen & Li, 2002).

Berbagai industri telah mengganti proses produksi konvensional yang menggunakan bahan kimia dengan proses enzimatik. Proses-proses konvensional tersebut diganti karena menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan dan peralatan proses.

Sementara proses enzimatik memiliki berbagai kelebihan diantaranya: stereoselektif, regioselektif, bekerja pada temperatur rendah (0-110°C), konsumsi energi yang lebih rendah, aktif pada pH 2-12, menghasilkan lebih sedikit produk samping, tidak beracun jika digunakan dengan benar, dapat digunakan kembali (jika diimobilisasi), dapat didegradasi secara biologis, dan dapat diproduksi dalam jumlah yang tidak terbatas.

Segmen utama industri pengguna enzim adalah industri makanan, industri pakan ternak dan aplikasi teknis (Schafer, 2011). Keluasan lingkup penggunaan enzim dalam berbagai industri telah mendorong pertumbuhan pasar dan produksi enzim. Perdagangan enzim di pasar dunia diharapkan mencapai US 7 milyar pada tahun 2012/23, dengan peningkatan rata-rata mencapai 6,3%, dimana sebagian besar enzim digunakan untuk industri farmasi dan katalis (Hasan dkk., 2010).

Hingga kini lebih dari 2000 enzim telah diisolasi, namun hanya 14 enzim yang telah diproduksi secara komersial. Kebanyakan dari enzim yang telah diproduksi secara komersial adalah enzim hidrolase seperti amilase, protease, pektinase, dan selulase. Saat ini, dari berbagai jenis enzim hidrolase yang telah diproduksi secara komersial, enzim selulase menempati 20% dari pasar enzim dunia (Bhat, 2000).

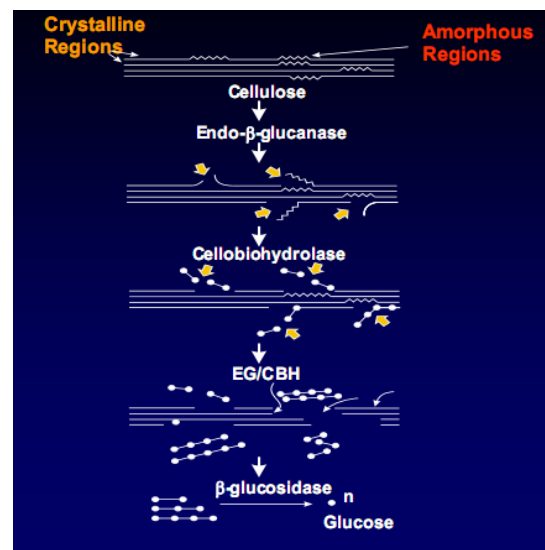
Enzim selulase

Selulase adalah enzim kompleks yang memotong secara bertahap rantai selulosa menjadi glukosa. Enzim selulase terbagi menjadi tiga tipe yakni (Ulhaq dkk., 2005):

1. Endo-1,4-β-D-glucanase (carboxymethyl cellulase/EC.3.2.1.4), yang mengurai ikatan β secara random pada bagian selulosa yang amorph.

2. Exo-1,4-β-D-glucanase (cellobiohydrolase/EC.3.2.1.91), yang menghidrolisa cellobiose dari ujung pereduksi maupun non pereduksi dari bagian kristal selulosa.
3. β-glucosidase (cellobiase/EC.3.2.1.21), yang melepaskan glukose dari cellobiose dan cellooligosakarida rantai pendek.

Adapun mekanisme aksi selulase terhadap selulosa disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Aksi selulase terhadap selulosa

Bioteknologi selulase dimulai pada awal 1980-an, dimana selulase digunakan dalam industri pakan ternak dan kemudian diikuti penggunaannya dalam industri makanan. Secara bertahap, selanjutnya selulase digunakan dalam industri tekstil, laundry, pulp dan kertas. Dalam industri tekstil, enzim selulase merupakan alat bagi pabrik untuk menghasilkan produk yang bernilai lebih tinggi, dimana selulase digunakan untuk memperhalus permukaan kain dengan mencegah terbentuknya butiran-butiran dipermukaan kain. Dalam industri denim, selulase digunakan untuk proses bio-stoning. Industri detergent

menggunakan selulase untuk membersihkan dan mempercerah kain katun. Industri pakan ternak menggunakan selulase bersama dengan enzim hidrolase yang lain untuk mendegradasi polisakarida non-pati guna meningkatkan laju konversi pakan. Industri makanan menggunakan selulase bersama dengan enzim pendegradasi dinding sel yang lain dalam proses pengolahan buah dan sayuran. Dalam industri pulp dan kertas, selulase digunakan dalam proses deinking (Oinonen, 2004; Sukumaran, Singhanian & Pandey, 2005; Ali & Saad 2008; Wirawan, Rismijana & Hidayat, 2008). Selain berbagai area aplikasi enzim selulase tersebut di depan, area aplikasi enzim selulase yang kini mendapat perhatian besar adalah aplikasi enzim selulase dalam proses hidrolisa selulosa untuk produksi etanol.

Penggunaan enzim memiliki berbagai kelebihan dibandingkan penggunaan proses konvensional menggunakan bahan kimia. Namun demikian kendala utama aplikasi enzim pada industri adalah harga enzim yang mahal dan enzim tidak bisa digunakan secara berulang (Huey, 2008; Troger & Niranjana, 2010; Wibisono, 2010).

Salah satu langkah guna mengatasi permasalahan tersebut diatas adalah dengan menggali potensi sumber-sumber penghasil enzim terutama sumber enzim selulase guna menggantikan enzim komersial, serta menggali potensi aplikasi teknologi terkini pada proses produksi enzim.

Sumber-sumber enzim selulase

Selulase dapat diproduksi oleh fungi, bakteri, dan ruminansia. Produksi enzim secara komersial biasanya menggunakan fungi atau bakteri. Fungi yang bisa

menghasilkan selulase antara lain dari genus *trichoderma*, *aspergillus*, dan *penicillium*, sementara bakteri penghasil selulase antara lain *acidothermus*, *bacillus*, *clostridium*, *pseudomonas* dan *rhodothermus* (Tabel 1) (Sukumaran, Singhanian & Pandey, 2005).

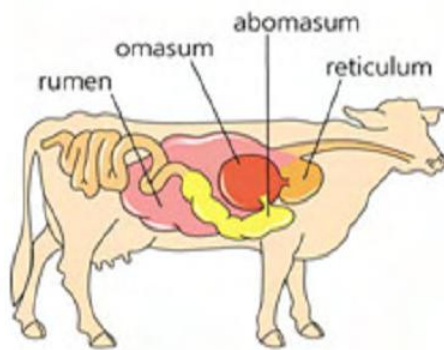
Tabel 1. Sumber-sumber penghasil enzim selulase

| Kelompok | Mikroorganisme | |
|---------------|--------------------|-------------------|
| | Genus | Spesies |
| Fungi | Aspergillus | A. niger |
| | | A. nidulans |
| | | A. oryzae |
| | Fusarium | F. solani |
| | | F. oxysporum |
| | Humicola | H. insolens |
| | | H. grisea |
| | Penicillium | P. brasilianum |
| | | P. occitanis |
| | | P. decumbans |
| Trichoderma | T. reesei | |
| | T. longibrachiatum | |
| | T. harzianum | |
| | | |
| Bakteri | Acidothermus | A. cellulolyticus |
| | Bacillus | Bacillus sp |
| | | Bacillus subtilis |
| | Clostridium | C. acetobutylicum |
| | | C. thremocellum |
| | Pseudomonas | P. cellulosa |
| | | R. marinus |
| | | |
| Actinomycetes | Cellulomonas | C. fimi |
| | | C. bioazotea |
| | | C. uda |
| | Streptomyces | S. drozdowiczii |
| | | S. lividans |
| | Thermonospora | T. fusca |
| | T. curvata | |

Produksi enzim selulase dari ruminansia belum banyak dilirik namun demikian selulase yang berasal dari ruminansia sangat berpotensi untuk diproduksi mengingat ketersediaannya yang cukup besar. Salah satu sumber isolat enzim selulase yang berasal dari ruminansia adalah dari cairan rumen sapi.

Rumen sapi merupakan salah satu ruang dalam lambung sapi (Gambar 2). Sapi memiliki 4 lambung yang berfungsi untuk mencerna makanan. Lambung-lambung tersebut

yaitu retikulum, omasum, abomasum, dan rumen. Setelah sapi makan maka makanan akan menuju rumen lalu akan dimuntahkan kembali ke retikulum. Setelah di retikulum maka makanan akan menuju omasum, abomasum, rumen lalu usus. Rumen sapi mengandung berbagai mikroorganisme seperti bakteri, fungi maupun protozoa. Mikroorganisme tersebut mengeluarkan berbagai enzim yang berguna pada proses pencernaan pakan pada ruminansia (Suseno, 2009).



Gambar 2. Saluran Pencernaan Sapi (Suseno, 2009)

Oleh karenanya cairan rumen sapi dilaporkan kaya akan berbagai enzim seperti enzim selulase, amilase, protease, xilanase dan lain-lain (Ayuningtyas, 2008; Budiansyah dkk., 2010). Enzim yang diisolasi dari rumen sapi memiliki kelebihan dibandingkan enzim komersial, diantaranya, lebih stabil pada suhu tinggi, aktivitas spesifik yang lebih tinggi, pH optimum lebih tinggi dan biaya produksi yang lebih rendah (Heim, 2011). Sementara itu Budiansyah dkk. (2010) menyatakan bahwa aktivitas enzim selulase dari cairan rumen sapi lokal lebih tinggi dibandingkan aktivitas enzim selulase dari cairan rumen sapi impor.

Cairan rumen sapi berasal dari limbah rumah potong hewan. Jika tidak ditangani dengan baik limbah ini berpotensi mencemari lingkungan.

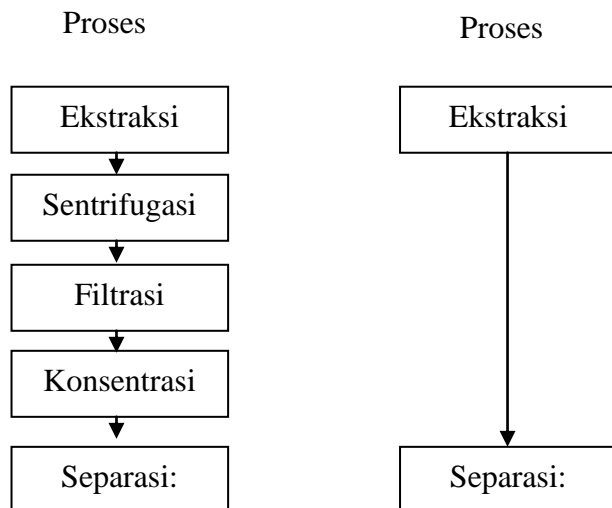
Selama ini isi rumen hanya dibuang dan hanya sebagian kecil saja yang memanfaatkannya sebagai kompos. Saat ini jumlah sapi yang dipotong setiap tahun tidak kurang dari 1,75 juta ekor, dimana sekitar 1,5 juta ekor berasal dari sapi lokal, dan sisanya adalah sapi impor. Dengan jumlah cairan rumen mencapai 31 liter/ekor, maka potensi cairan rumen sapi mencapai 54,25 juta liter/tahun (Berutu, 2007). Menimbang potensi cairan rumen sapi yang besar, serta berbagai kelebihan enzim selulase dibandingkan enzim komersial, maka produksi enzim selulase dari cairan rumen sapi sangat layak untuk dikembangkan.

Proses Pemurnian Enzim dengan Expanded Bed Adsorption

Proses pemurnian enzim merupakan tahapan krusial dalam proses produksi enzim. Teknik yang diaplikasikan dalam proses pemurnian enzim antara lain ion exchange, interaksi hidrofobik, afinitas, filtrasi gel, dan expanded bed adsorption. Expanded bed adsorption (EBA) atau adsorpsi unggun terekspansi adalah teknik kromatografi untuk pemisahan dan pemurnian produk biologi langsung dari umpan (Gambar 3), tanpa melalui proses sentrifugasi, mikrofiltrasi dan tahap penjernihan lainnya (Hu dkk., 2001; Nayak, Ponratham & Rajan, 2001; Ebrahimpour dkk., 2009; Silveira dkk., 2009).

Teknik ini mengijinkan pengumpanan umpan yang belum mengalami proses perlakuan awal kedalam kolom kromatografi dan mengingat unggun pada kolom dapat terekspansi, maka hal tersebut berakibat meningkatkan luas permukaan kontak adsorben sehingga interaksi adsorben dengan molekul target dapat lebih efektif (Silveira dkk., 2009).

Pada proses pemurnian menggunakan EBA, umpan dilewatkan melalui bagian bawah kolom dengan kecepatan superficial yang mencukupi sehingga memungkinkan adsorben pada kolom tereksansi. Sebagai akibatnya akan tercipta ruang kosong yang memungkinkan bagi partikel dengan ukuran submikron, termasuk sel dan protein untuk melewati kolom sementara protein target akan tertangkap. Kolom akan dicuci pada mode unggun tereksansi dari bagian bawah ke atas dan elusi akan dilakukan pada mode unggun tetap pada arah yang berlawanan pada kecepatan yang lebih rendah (Nayak, Ponratham & Rajan, 2001).



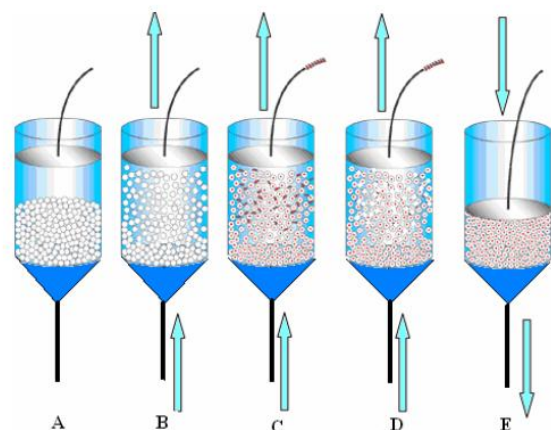
Gambar 3. Skema Tahapan Pemurnian Konvensional dan EBA

Mekanisme kerja expanded bed adsorption dijabarkan sebagai berikut (Ebrahimpour dkk., 2001):

- Pada kondisi awal, adsorben berada didasar kolom, menyisakan sedikit ruang kosong bagi agregat yang berukuran besar atau gumpalan-gumpalan untuk bermanuver (Gambar 4.A)
- Ketika bufer diinjeksikan selama setidaknya 30 menit dari bagian bawah kolom, adsorben akan terfluidisasi dan adsorben akan

membentuk gradien konsentrasi saat kecepatan sedimentasi setara dengan kecepatan alir fluida kearah atas (Gambar 4.B)

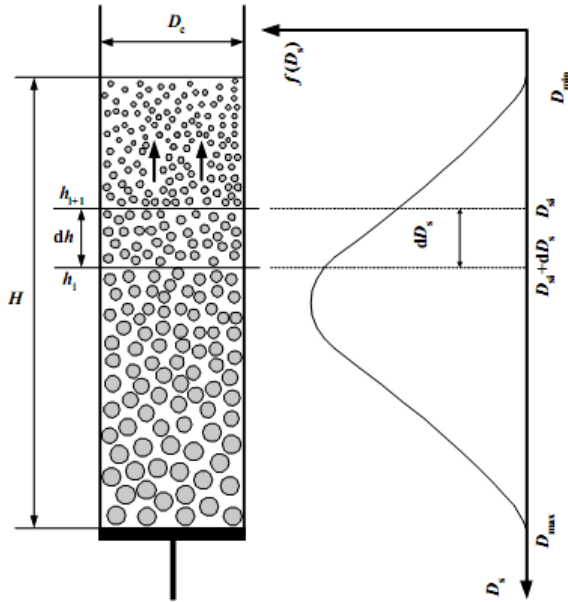
- Ketika umpan diinjeksikan, partikulat dan debris sel akan bergerak bebas disekitar butir-butir adsorben. Sebagaimana dengan langkah kromatografi yang lain, adsorben akan mengalami proses pencucian hingga mencapai batas interaksi non spesifik antara partikulat dan adsorben. Sementara itu, senyawa target akan berinteraksi dengan adsorben dan tertahan didalam kolom (Gambar 4.C)
- Kolom akan memadat, arah aliran dibalik, senyawa target dielusi dari adsorben (Gambar 4.E)
- Langkah terakhir dapat dilakukan pada mode unggun tetap atau unggun terfluidisasi (Gambar 4.D)



Gambar 4. Prosedur kerja dalam kolom expanded bed adsorption (Ebrahimpour dkk., 2001)

Pada umumnya, partikel adsorben yang digunakan dalam proses EBA memiliki ukuran dan densitas yang bervariasi. Adsorben pada EBA akan berlokasi pada posisi ketinggian yang berbeda-beda disepanjang kolom sebagai efek dari gravitas, bouyancy, gaya tarik fluida dan gaya-gaya yang lain. Partikel-

partikel yang memiliki densitas yang tinggi akan berada di kolom bagian bawah, sedangkan partikel yang lebih kecil dengan densitas yang rendah akan cenderung berada di kolom bagian atas (Yun dkk., 2004). Skema distribusi partikel dan ekspansi kolom pada EBA tersaji pada Gambar 5.



Gambar 5. Skema distribusi partikel dan ekspansi kolom pada EBA (Yun dkk., 2004)

Dalam proses pemurnian protein menggunakan expanded bed adsorption, perlu ditelaah karakteristik ekspansi dan karakteristik hidrodinamika expanded bed adsorption. Parameter-parameter ekspansi dan hidrodinamika pada proses pemurnian menggunakan expanded bed adsorption diantaranya indeks Richardson-Zaki, bilangan Bodenstein (B_0) dan koefisien dispersi aksial (D_{axl}).

Richardson dan Zaki (1954) melakukan penelitian mengenai penggunaan beberapa material dan mendapatkan persamaan (persamaan 1) yang menghubungkan kecepatan fluida (U) dan kecepatan akhir dari partikel U_T dengan kekosongan unggun (ε) (Severo dkk., 2009; Jahanshasi, 2009). Persamaan

Richardson dan Zaki tersebut valid untuk partikel yang sangat kecil terhadap diameter kolom, dengan rasio $d_p/d_c > 0,01$ (Jahanshasi dkk., 2009).

$$\frac{U}{U_T} = \varepsilon^n \tag{1}$$

Nilai kekosongan unggun dapat diperoleh dengan mensubstitusi data massa spesifik (specific mass, ρ_p) dan massa dari partikel adsorben (m_p), area potong kolom (cross sectional column, A_T) dan tinggi unggun (H) kedalam persamaan 2 (Silveira dkk., 2009). Dimana V_p adalah volume partikel dan V_B adalah volume unggun.

$$\varepsilon = 1 - \frac{V_p}{V_B} = 1 - \frac{V_p}{A_T H} = 1 - \frac{m_p}{\rho_p A_T H} \tag{2}$$

Nilai kekosongan unggun juga dapat diestimasi menggunakan persamaan (3) (Jahanshasi, 2009):

$$\varepsilon = 1 - (1 - \varepsilon_0) \frac{H_0}{H} \tag{3}$$

Dimana ε_0 adalah kekosongan unggun tetap. Biasanya nilai ε_0 diasumsikan sebesar 0,4 (Jahanshasi dkk., 2009).

Sedangkan n adalah indeks Richardson-Zaki atau indeks ekspansi yang merupakan fungsi dari bilangan Reynold akhir (Re_t). Untuk adsorben dengan diameter rata-rata $750 \mu\text{m}$, kecepatan partikel akhir/terminal U_t dihitung berdasarkan persamaan Allen's (persamaan 4) sedangkan untuk adsorben dengan diameter rata-rata $200 \mu\text{m}$, kecepatan partikel akhir/terminal U_t dihitung berdasarkan persamaan Hukum Stoke's (persamaan 5).

$$u_t = 0,27 \sqrt{\frac{d(\rho_p - \rho_l)g}{\rho_l}} Re_t^{0,4} \tag{4}$$

Dimana ρ_p dan ρ_l adalah density dari padatan dan cairan.

$$u_{t-stokes} = \frac{g(\rho_p - \rho_l)d_p^2}{18\mu} \quad (5)$$

Persamaan 5 berdasar pada diameter rata-rata partikel (d_p), densitas fase padatan (ρ_p) dan densitas fase cair (ρ_l). Bilangan Reynold partikel pada kecepatan pengendapan akhir (Re_t) dapat dihitung menggunakan persamaan 6.

$$Re_t = \frac{d_p \rho_l U_T}{\mu} \quad (6)$$

Selanjutnya bersama dengan rasio diameter partikel dan diameter kolom, digunakan untuk memilih persamaan (persamaan 7,8,9) guna menentukan indeks Richardson-Zaki (Jahanshasi dkk., 2009).

$$n = 4,65 + 19,5d_p/d_c \quad (7)$$

$$n = (4,35 + 17,5d_p/d_c)Re_t^{-0,03} \quad (8)$$

$$n = (4,45 + 18d_p/d_c)Re_t^{-0,1} \quad (9)$$

Sementara itu, bilangan Bodenstein (B_0) dan koefisien dispersi aksial (D_{axl}) yang mewakili kondisi dispersi cairan dan sifat fluidisasi dapat dihitung menggunakan persamaan 10-13 (Jahanshasi dkk., 2008).

$$\frac{\delta^2}{t^2} = \frac{2}{B_0} - 2\left(\frac{2}{B_0}\right)^2 \cdot [1 - \exp(B_0)] \quad (10)$$

$$\varepsilon = 1 - \frac{(1-\varepsilon_0)H_0}{H} \quad (11)$$

$$N = \frac{\bar{t}^2}{\delta^2} \quad (12)$$

$$B_0 = \frac{U.H}{\varepsilon.D_{axl}} \quad (13)$$

Dimana N adalah jumlah unggun teoritis.

Kesimpulan

Enzim selulase dari cairan rumen sapi sangat berpotensi untuk diproduksi mengingat ketersediaan bahan baku serta berbagai kelebihan isolat enzim selulase cairan rumen sapi dibandingkan dengan enzim komersial. Salah satu teknik pemurnian enzim yang dapat digunakan dalam proses produksi enzim selulase cairan rumen sapi adalah expanded bed adsorption (EBA). EBA adalah teknik kromatografi pemisahan dan pemurnian produk biologi langsung dari umpan, tanpa melalui proses sentrifugasi, mikrofiltrasi dan tahap penjernihan lainnya. Oleh karenanya, teknik EBA mempersingkat waktu proses, mengurangi waktu proses dan biaya produksi. Mengingat unggun pada kolom dapat terekspansi, maka luas permukaan kontak adsorben lebih besar sehingga interaksi adsorben dengan molekul target lebih efektif. Dalam proses pemurnian protein menggunakan EBA, perlu ditelaah karakteristik ekspansi dan hidrodinamika, seperti indeks Richardson-Zaki (n), bilangan Bodenstein (B_0) dan koefisien dispersi aksial (D_{axl}) yang mewakili kondisi dispersi cairan dan sifat fluidisasi.

Daftar Pustaka

Ali, U.F., Saad EL Dein, H.S., 2008, "Production and Partial Purification of Cellulase Complex by *Aspergillus niger* and *A.nidulans* Grown on Water Hyacinth Blend", *Journal of Applied Sciences Research*, 4(7):875-891

- Ayuningtyas, A., 2008," Eksplorasi Enzim Selulase dari Isolat Bakteri Asal Rumen Sapi", Skripsi pada Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga
- Beilen, J.V., Li, Z., 2002,"Enzyme Technology: an overview", *Current Opinion in Biotechnology*, 13:338-344
- Berutu, K.M., 2007,"Dampak Lama Transportasi Terhadap Penyusutan Bobot Badan,pH Daging Pasca Potong dan Analisis Biaya Transportasi Sapi Potong Peranakan Ongole dan Shorthorn", Skripsi Pada Departemen Peternakan Fakultas Pertanian USU
- Bhat, M.K., 2000, "Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology",*Biotechnology Advances*, 18:355-383
- Budiansyah, A., Resmi, K., Wiryawan, K.G., Soehartono, M.T., Widyastuti, Y., Ramli, N., 2010," Isolasi dan karakterisasi Enzim Karbohidrase Cairan Rumen Sapi Asal Rumah Potong Hewan", *Media Peternakan*, 33 (1): 36-43
- Ebrahimpour, M., Shahavi, M.H., Jahanshasi, M., Najafpour, G., 2009," Nanotechnology in Process Biotechnology: Recovery and Purification of Nanoparticulate Bioproducts Using Expanded Bed Adsorption
- Hasan, F., Shah, A.A., Javed, S., Hameed, A., 2010, "Enzymes Used in Detergents:Lipases", *African Journal of Biotechnology*, Vol 9 (31):4836-4844
- Heim, S., 2011,"Technology Offer New Cellulase From Cow Rumen", *Foundation for Promotion of Life Science*
- Hidayat, C., Lestari, S., Supriyadi, 2008," Pemurnian Lipase Menggunakan Teknik Immobilisasi Ion Logam Pada Matriks Zirkonia Agarosa", *Prosiding Seminar Nasional Teknoin 2008*
- Hu, H.B., Yao, S.J., Zhu, Z.Q., Hur, B.K., 2001, "Comparison of the Adsorption Charactertics of EBA with Conventional Chromatographic Adsorbent", *Korean Journal of Chemical Engineering*, 18 (3):357-362
- Huey, H.S., 2008," Enzymatics Enhanced Production of gaharu Oil: Effect of Enzyme Loading and Duration Time" A thesis submitted in fulfilment of the requirements for the award of the degree of Bachelor of Chemical Engineering, University malaysia Pahang.
- Jahanshasi, M., Ghoreishi, A.A., Vasheghani, E., Khavarpour, M., Abedijaber, A., 2008, " Comparative Study of Hydrodynamics Behaviour of Liquid Expanded Bed Adsorption" *Brazilian Journal of Chemical Engineering Vol26:299-306*
- Jahanshasi, M., Najafpour, G., Ebrahimpour, M., Hajizadeh, S., Shahavi, M., 2009, "Evaluation of Hydrodynamics Parameters of Fluidized Bed Adsorption on Purification of Nanobioproduct" *Physics Status Solidi*, 1-8
- Nayak, D.P., Ponratham, S., Rajan, C.R., 2001, " Macroporous Copolymer Matrix IV. Expanded Bed Adsorption Application", *Journal of Chromatography A*, 922:63-76
- Oinonen, A.M., 2004,"Trichoderma reesei Strains for Production of Cellulase for The Textile Industry" *Faculty of Biosciences Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki*
- Richana, N., 2002," Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Perkembangan Bioindustri di

- Indonesia”, *Bulletin Agrobio*, 5:29-36
- Schafer, T., 2011,” Enzyme for Technical Applications”, *Enzyme for the Detergent Industry*
- Severo, J.B., Souza, R.R., Santana, J.C.C., Tambourgi, E.B., 2009,”A Study od Ion Exchange Chromatography in an Expanded Bed for Bovine Albumin Recovery”*An International Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol 52:427-436
- Silveira, E., Souza, M.E., Santana, J.C.C., Chaves, A.C., Porto, A.L.F., Tambourgi, E.B., 2009, “Expanded Bed Adsorption of Bromelain from Ananas comosus Crude Extract”, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26 (01): 149-157
- Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R., Pandey, A., 2005,” Microbial Cellulases-Production, Application and Challenges” *Journal of Scientific and Industrial Research*, vol 64:832-844
- Suseno, D., 2009,” Aktivitas Antibakteri Propolis Trigona spp. Pada Dua Konsentrasi Berbeda Terhadap Cairan Rumen Sapi”, *Program Studi Biokimia Fakultas Matematika dan IPA IPB, Bogor.*
- Troger, C., Niranjana, K., 2010,” Sustainable Chitin Extraction and Chitosan Modification for Application in the Food Industry” *International Conference on Food Innovation.*
- Ulhaq, I., Javed, M.M., Khan, T.S., Siddiq, Z., 2005,”Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*” *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1 (3):241-245
- Wibisono, E., 2010,” Imobilisasi Crude Enzim Papain yang Diisolasi Dari Getah Buah Pepaya Dengan Menggunakan Kappa Karagenan dan Kitosan Serta Pengujian Aktivitas dan Stabilitasnya”, *Skripsi pada Departemen Kimia MIPA USU*
- Wirawan, S.K., Rismijana, J., Hidayat, T., 2008,” Aplikasi a Amilase dan Selulase pada Proses Deinking Kertas Bekas Campuran”, *Berita Selulosa Vol 43:11-18*
- Yun, J., Yao, S.J., Lin, D.Q., Lu, M.H., Zhao, W.T., 2004,” Modelling Axial Distribution of Adsorbent Particle Size and Local Voidage in Expanded Bed” *Chemical Engineering Science*, 59:449-457