



Central Composite Statistical Design of Tapioca Starch Hydrolysis using Immobilized Glucoamylase on Mesostructured Cellular Foam Silica (MCF-9.2T-3D)

Joni Agustian*, Lilis Hermida, Ade Febriana Syahfitri

Jurusan Teknik Kimia, Universitas Lampung
Jalan Prof. S. Brodjonegoro No. 1, Gedong Meneng, Rajabasa, Bandar Lampung 35145, Lampung-Indonesia

*E-mail: joni.agustian@eng.unila.ac.id

Abstract

Bioethanol is a renewable fuel that can be produced from tapioca starch via fermentation pathway. This substrate must be reduced either by enzymatic or acidic hydrolysis. As the hydrolysis of tapioca starch employing immobilized glucoamylase enzyme increase reusability of the enzyme, the process catalysed by the glucoamylase immobilised on/in mesostructured cellular foam silica (MCF-9.2T-3D) was optimised. Effects of temperature, pH of acetate buffer, and agitation speed were studied using response surface methodology based-on central composite design. The saccharification results were analyzed using Design-Expert®6.0.6 software. The model is validated by the F-test for analysis of variance (ANOVA) where p is 0.001. The ANOVA indicated that the acetate buffer pH and agitation speed were not significant, while temperature of hydrolysis showed significant effect. The optimum condition was found at 70°C, 4.6, and 140 rpm. The glucose yield at this optimum condition was 2.06 mg/ml, which was equivalent to 68.05% dextrose value.

Keywords: Central Composite Design, Enzymatic Hydrolysis, Immobilized Glucoamylase, MCF Silica, Tapioca Starch.

Pendahuluan

Bioetanol merupakan bahan bakar *renewable* yang dapat dihasilkan dengan menggunakan *plants materials* sebagai bahan baku. Pada industri etanol berbasis singkong, kandungan pati harus dikonversi terlebih dahulu menjadi gula reduksi dengan metode hidrolisis asam atau enzimatis sebelum proses fermentasi mikrobial dilaksanakan. Proses hidrolisis pati secara enzimatis biasanya dilakukan menggunakan enzim α -amilase dan glukoamilase bebas yang harus disuplai dari luar karena mikroorganisme untuk proses fermentasi gula reduksi menjadi etanol tidak dapat menghasilkan enzim-enzim tersebut. Penggunaan enzim bebas dalam proses hidrolisis masih memiliki beberapa kekurangan seperti hanya sekali pakai dan tidak tahan terhadap perubahan kondisi (Nisha dkk, 2012). Untuk mengatasi kekurangan tersebut dikembangkanlah teknologi imobilisasi enzim. Enzim akan melekat pada sebuah lingkungan mikro yang dikenal dengan material penyangga, sehingga aktivitasnya dapat terkontrol dengan baik (Parshad dkk, 2008).

Terdahulu, penelitian mengenai imobilisasi enzim glukoamilase pada silika *mesostructured cellular foam* (MCF) untuk proses hidrolisis pati tapioka secara *batch* membentuk gula reduksi telah dilakukan dimana faktor-faktor operasi hidrolisis diamati pengaruhnya dengan menggunakan metode *one-factor-at-a-time* (OFAT). Dengan metode tersebut, kondisi operasi optimum dapat ditentukan, namun pengaruh interaksi antar faktor-faktor operasi tidak dipertimbangkan (Ibrahim dan Elkhidir, 2011). Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) dengan *Central Composite Design* (CCD) untuk mengetahui kondisi optimum proses hidrolisis dengan mempertimbangkan pengaruh interaksi antar faktor-faktor operasi terhadap proses (Soyer dkk, 2010).

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan meliputi: erlenmeyer, *hot plate*, *waterbath shaker* (Medline BS-31), UV-VIS spektrofotometer (Shimadzu UV-1800), *centrifuge*, kertas saring, termometer, *waterbath*, *beaker glass*, neraca digital, lemari pendingin, tabung reaksi, mikro pipet, dan spatula. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah enzim glukoamilase (30.000 U/gr) (Xi'an Lyphar Biotech Co., Ltd (Shaanxi, China)), *pluronic* P 123 (Sigma





Aldrich), HCl 1,6 M (Merck), *trimethylbenzene* (Sigma Aldrich), *tetraethyl ortho silicates* (Merck), pati tapioka (pasar lokal), *soluble starch* (Merck), dan larutan *buffer* asetat dan *buffer* pospat.

Prosedur Preparasi Silika *Mesostructured Cellular Foam* (MCF)

Proses preparasi silika MCF-(9.2T-3.D) mengacu pada penelitian sebelumnya (Hermida dkk, 2013).

Imobilisasi Enzim Glukoamilase

Proses imobilisasi enzim glukoamilase dilakukan dengan mencampurkan 60 mg enzim glukoamilase bebas dan 0,5 gr MCF-(9.2T-3D) dalam 30 mL larutan *buffer* pospat 0,1 M (pH 5,5). Kemudian larutan di tempatkan dalam *waterbath shacker* yang diatur suhunya 30°C dengan kecepatan pengadukan 100 rpm selama 5 (lima) jam.

Uji Aktivitas Enzim Glukoamilase

Aktivitas enzim glukoamilase terimobilisasi mengacu pada metode yang digunakan oleh Milosavic (2007).

Reusability Enzim Glukoamilase Terimobilisasi

Uji *reusability* dilakukan pada proses hidrolisis pada suhu 70°C, kecepatan pengadukan 140 rpm dan pH larutan *buffer* asetat 4,6. Setelah proses hidrolisis selesai, enzim terimobilisasi disaring kemudian dibilas menggunakan 50ml larutan *buffer* asetat sebanyak 3 (tiga) kali untuk kemudian kembali digunakan pada proses hidrolisis tapioka.

Hidrolisis Tapioka menggunakan Enzim Glukoamilase Terimobilisasi

Rancangan percobaan menggunakan variabel bebas berupa suhu, pH, dan kecepatan pengadukan. Sedangkan %DE merupakan variabel terikat (respon). Pengaruh variabel-variabel tersebut diteliti dengan metode RSM dengan desain CCD menggunakan *Software Design-Expert*®6.0.6. Kode level dari variabel bebas yang digunakan diuraikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Faktor dan Kode Level pada Variabel Bebas

Variable	Simbol	Kode Level dan Range				
		-2	-1	0	+1	+2
Suhu (°C)	A	61,6	65	70	75	78,4
Ph	B	4,1	4,3	4,6	4,9	5,1
Kecepatan Pengadukan (Rpm)	C	123	130	140	150	157

Metode Analisis Gula Reduksi

Konsentrasi gula reduksi hasil hidrolisis dianalisis dengan metode Dinitrosalicylic Acid (DNSA). Pada tabung reaksi, ditambahkan 0,3 ml sampel dan 0,3 ml reagen DNSA. Tabung reaksi dipanaskan pada air mendidih selama 7 (tujuh) menit. Kemudian ditambahkan 3 ml akuades. Sampel dianalisis pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Gula reduksi yang terbentuk dinyatakan dalam bentuk nilai *dextrose equivalent* (DE) (Shariffa dkk, 2009).

$$\% DE = (\text{gram gula reduksi dalam bentuk glukosa/gram berat kering solid}) * 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

Hasil dan Pembahasan

Enzim Glukoamilase Amobil

Pada penelitian ini, imobilisasi enzim glukoamilase dilakukan dengan metode adsorpsi fisika, dimana enzim bebas dilekatkan secara *random* pada permukaan *support*. Setelah proses imobilisasi dilakukan, kandungan protein yang terdapat pada glukoamilase terimobilisasi dianalisis dengan metode *Pierce BCA* menggunakan spektrofotometer UV-VIS Shimadzu. Berdasarkan hasil analisis, diperoleh enzim yang terimobilisasi sebesar 82,06%. Hal ini menunjukkan dari 60 mg enzim bebas yang digunakan, sebanyak 49,23 mg berhasil melekat pada permukaan silika MCF-(9.2T-3D).

Sebelum digunakan untuk menghidrolisis pati tapioka, dilakukan analisis untuk mengetahui aktivitas enzim terimobilisasi. Berdasarkan hasil analisis yang dilakukan dengan menggunakan metode DNSA, diperoleh aktivitas spesifik enzim glukoamilase terimobilisasi sebesar 1.856,78 Unit/gram. Sebelum diimobilisasi kedalam silika MCF-(9.2T-3D), enzim glukoamilase memiliki aktivitas sebesar 30.000 Unit/gram. Hal ini menunjukkan adanya penurunan aktivitas glukoamilase setelah proses imobilisasi dilakukan. Penurunan aktivitas ini disebabkan oleh adanya denaturasi enzim saat proses imobilisasi, keterbatasan transfer massa karena perekatan enzim secara *random* memungkinkan sisi aktif enzim menempel pada *support*, sehingga substrat tidak dapat masuk ke sisi aktif enzim, dan perubahan struktur tiga dimensi (konformasi) enzim.

Optimisasi Hidrolisis Tapioka

Pada penelitian ini proses sakarifikasi dipelajari untuk mendapatkan jumlah gula pereduksi yang maksimum dengan respon berupa %DE. Proses sakarifikasi merupakan proses lanjutan dari proses likuifaksi, dimana pada





proses ini terjadi pemutusan ikatan α -1,4 dan α -1,6 glukosida dengan menggunakan enzim glucoamilase untuk memproduksi gula reduksi dari pati (Yunianta dkk, 2014). Sakarifikasi merupakan tahap akhir proses hidrolisis dan merupakan tahapan terpenting dalam proses produksi gula reduksi yang maksimal, oleh karena itu kondisi operasi proses ini sangat menentukan jumlah gula reduksi yang didapatkan. Hasil percobaan dengan desain CCD dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil pada Tabel 2 kemudian dianalisis menggunakan *Software Design Expert*[®] 6.0.6 untuk menentukan kondisi operasi optimum, model persamaan dan kesesuaian model terhadap proses hidrolisis yang dilakukan. Model persamaan yang sesuai untuk proses hidrolisis yang dilakukan dapat dilihat pada persamaan (2).

$$DE = 68,76 + 15,76A - 6,62B - 0,59C - 22,57A^2 - 3,86B^2 - 4,46C^2 - 3,02 AB - 2,23 AC + BC \dots\dots\dots (2)$$

Dengan menggunakan model persamaan, respon dapat dengan mudah diperkirakan. Oleh karena itu perlu dilakukan analisis mengenai kesesuaian model persamaan yang didapatkan terhadap proses hidrolisis yang dilakukan. Analisis kesesuaian model dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu analisis *sequential model sum of squares*, *lack of fit test*, *model statistic*. Berdasarkan hasil analisis yang telah dilakukan, model kuadratik merupakan model yang sesuai untuk proses hidrolisis pati tapioka dengan enzim glucoamilase terimobilisasi yang dilakukan. Model tersebut kemudian dianalisis menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) untuk mengidentifikasi pentingnya model yang didapatkan dan parameter-parameternya (Tabel 3).

Tabel 2. Hasil Percobaan menggunakan Desain CCD

Run	A (°C)	B	C (Rpm)	DE (% (w/w))	
				Aktual	Prediksi
1	61,6	4,6	140	1,74	-21,58
2	65	4,9	150	8,243	21,15
3	70	4,6	140	68,406	68,76
4	75	4,9	150	44,83	42,17
5	70	4,6	157	64,161	55,15
6	75	4,3	130	71,169	67,09
7	70	5,1	140	51,852	46,7
8	75	4,3	150	59,985	59,45
9	70	4,6	140	68,406	68,76
10	70	4,1	140	76,303	68,97
11	75	4,9	130	49,602	45,81
12	70	4,6	140	68,406	68,76
13	78,4	4,6	140	20,598	31,43
14	65	4,3	150	13,725	26,34
15	70	4,6	140	68,406	68,76
16	65	4,3	130	13,58	25,07
17	70	4,6	140	68,406	68,76
18	70	4,6	123	60,612	57,15
19	65	4,9	130	6,508	15,87
20	70	4,6	140	68,406	68,76

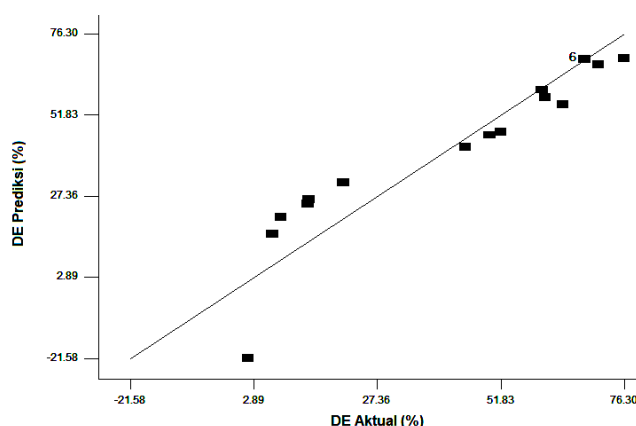
Tabel 3. Analysis of Variance (ANOVA)

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	Ket.
Model	11558,62	9	1284,29	9,05	0,001	Signifikan
A	3392,47	1	3392,47	23,9	0,0006	
B	598,36	1	598,36	4,22	0,0671	
C	4,81	1	4,81	0,34	0,8576	
A ²	7340,78	1	7340,78	51,72	<0,0001	
B ²	215,1	1	215,1	1,52	0,2465	
C ²	286,83	1	286,83	2,02	0,1856	
AB	73,01	1	73,01	0,51	0,4897	
AC	39,77	1	39,77	0,28	0,6081	
BC	8	1	8	0,056	0,8171	

Hasil ANOVA pada Tabel 3 menunjukkan model kuadratik merupakan model yang signifikan dengan nilai *F-value* 9,05 dan *p-value* 0,001. Model kuadratik memiliki nilai *R*² sebesar 0,891 ini berarti 89,1% data percobaan relevan dan hanya 10,9% dari total variasi yang tidak dapat dijelaskan oleh model. Sebagai perbandingan, Yunianta dkk (2014) memperoleh *R*² sebesar 90,58% dan Nadir dkk (2010) memperoleh *R*² sebesar 86,36% pada optimasi produksi gula reduksi dari pati yang juga menggunakan desain CCD. Secara umum, nilai *R*² yang tinggi menunjukkan



bahwa adanya kesesuaian yang baik antara data prediksi dan data percobaan (Gambar 1). Gambar 1 merupakan plot DE prediksi dan DE percobaan yang menunjukkan kesesuaian model persamaan terhadap proses dan kesesuaian data prediksi dan data percobaan, ditandai dengan titik sebaran data yang berada dekat dengan garis regresi linier (Sebayang dkk, 2017). Berdasarkan gambar tersebut, dapat diamati bahwa titik sebaran data berada dekat dengan garis regresi. Hal ini menunjukkan adanya kesesuaian antara data yang diprediksi dengan data hasil percobaan.



Gambar 1. Ketepatan nilai respon DE prediksi dan DE aktual

Pada penelitian ini, faktor operasi pada proses hidrolisis diamati pengaruhnya terhadap respon. Berdasarkan ANOVA dapat diketahui pengaruh faktor operasi dan dan interaksinya memiliki pengaruh seperti pada Tabel 4. Berdasarkan Tabel 4 dapat diketahui bahwa suhu dan faktor kuadrat suhu memberikan pengaruh yang signifikan terhadap proses hidrolisis yang dilakukan. Hal tersebut ditandai dengan nilai $prob > F$ kurang dari 0,05 (Chaudhary dan Balomajumder, 2014). Menurut Bahri dkk (2012), suhu adalah faktor yang memberikan dampak besar pada aktivitas enzim amilase. Umumnya suatu enzim tidak memiliki aktivitas optimal pada suhu yang sangat rendah. Hal tersebut dikarenakan reaksi yang melibatkan enzim memerlukan suatu pemanasan terkontrol yang akan menyediakan energi aktivasi yang cukup untuk memulai reaksi. Kenaikan suhu pada reaksi enzimatik akan meningkatkan energi kinetik molekul yang bereaksi sehingga mempercepat tumbukan antar molekul. Namun, suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan protein pada enzim terdenaturasi dan kehilangan aktivitasnya. Pada suhu optimum enzim, tumbukan antar molekul terjadi sangat efektif namun tanpa terjadinya denaturasi protein.

Tabel 4. Pengaruh Faktor dan Interaksinya terhadap Respon

Faktor	Prob > F	Pengaruh
A	0,0006	Signifikan
B	0,0671	Tidak signifikan
C	0,8576	Tidak signifikan
A ²	<0,0001	Signifikan
B ²	0,2465	Tidak signifikan
C ²	0,1856	Tidak signifikan
AB	0,4897	Tidak signifikan
AC	0,6081	Tidak signifikan
BC	0,8171	Tidak signifikan

Optimasi proses didasarkan pada analisis respon terhadap kondisi operasi. Model persamaan yang signifikan, kemudian dioptimasi untuk menentukan kondisi operasi optimum. Berdasarkan pengolahan data dengan menggunakan *software Design Expert 6.0.6*, didapatkan 10 *solution* untuk menentukan kondisi optimum proses hidrolisis yang dilakukan, dimana 5 dari 10 *solution* tersebut diuji coba. Konfirmasi percobaan tersebut merupakan tahap akhir yang sangat penting dan direkomendasikan untuk menguji kesimpulan optimasi proses yang dilakukan berdasarkan desain CCD. Pengujian tersebut dilakukan agar dapat menunjukkan bahwa kondisi operasi optimum prediksi yang diperoleh sebanding dengan hasil percobaan. Hasil uji coba *solution* dapat dilihat pada Tabel 5. Berdasarkan Tabel 5 kondisi operasi optimum dari proses hidrolisis pati tapioka dengan menggunakan enzim glukamilase terimobilisasi pada silika MCF-(9,2T-3D) adalah pada suhu 70°C, kecepatan pengadukan 140 rpm, dan pH larutan *buffer* asetat 4,6 dengan %DE sebesar 68,546%. Nilai persen dekstroza yang di prediksi *software*

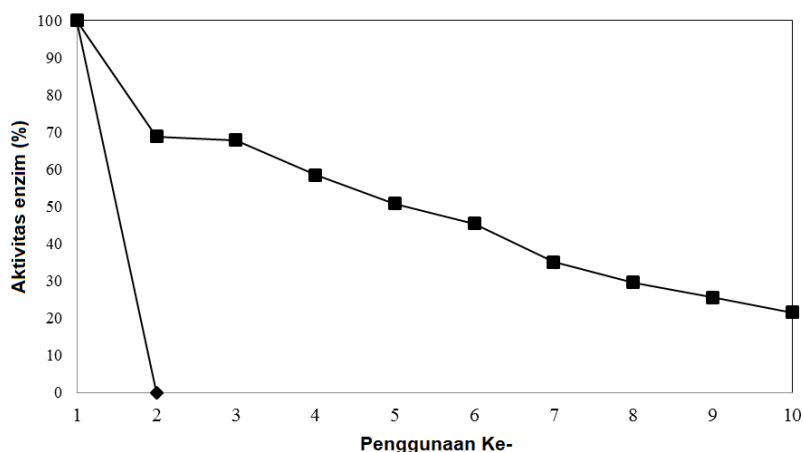
mendekati nilai persen dekstrosa yang didapatkan berdasarkan eksperimen yang dilakukan dengan nilai *error* kurang dari 7%. Menurut Montilha dkk (2017), nilai *error* pada rentang 10-15% masih dapat diterima dalam proses pengoptimalan suatu proses.

Tabel 5. Hasil aktual dan prediksi %DE pada kondisi optimum.

Sampel	Suhu (°C)	pH	Kec. Pengadukan (rpm)	%DE	
				Prediksi	Aktual
1	70	4,6	140	68,763	68,546
2	75	4,3	130	67,093	62,600
3	75	4,9	130	45,813	46,638
4	75	4,3	150	59,447	57,879
5	75	4,9	150	42,167	44,758

Reusability

Glukoamilase terimobilisasi dalam silika MCF(9,2T-3D) digunakan berulang kali pada proses hidrolisis pati tapioka untuk mengetahui penurunan aktifitas enzim setelah digunakan secara berulang. Pengaruh penggunaan berulang glukoamilase terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan Gambar 2 dapat diketahui bahwa aktivitas enzim glukoamilase terimobilisasi mengalami penurunan setelah digunakan berulang kali. Pada penggunaan kedua aktivitas glukosamilase terimobilisasi mengalami penurunan yang cukup signifikan, yaitu dari 100% menjadi 68,83% dan setelah sepuluh kali digunakan aktivitas enzim hanya tersisa sebesar 21,52%. Hal ini disebabkan oleh lepasnya enzim dari permukaan silika MCF-(9,2T-3D) saat proses hidrolisis berlangsung dan saat proses pembilasan sehingga terjadi pengurangan jumlah enzim aktif yang menempel pada silika dan denaturasi enzim. Hasil yang serupa juga didapatkan oleh Demerikan dkk (2011) dimana aktivitas enzim terimobilisasi tersisa sebesar 38% setelah penggunaan ke-6 (ke-enam) dan Ashly dkk (2011) dimana aktivitas enzim terimobilisasi tersisa sebesar 20% setelah sepuluh kali penggunaan.



Gambar 2. Pengaruh penggunaan berulang glukoamilase terimobilisasi terhadap aktivitas enzim. Note: ◆ = Free Enzyme, ■ = Immobilized Enzyme

Kesimpulan

Optimasi proses menggunakan *response surface methodology* dengan desain CCD relevan untuk proses hidrolisis pati tapioka menggunakan enzim glukoamilase terimobilisasi pada silika MCF-(9,2T-3D). Kondisi operasi optimum didapatkan pada suhu 70°C, kecepatan pengadukan 140 rpm, dan pH larutan *buffer* asetat 4,6 dengan %DE sebesar 68,546%. Berdasarkan hasil ANOVA, model kuadratik merupakan model yang signifikan terhadap respon dengan nilai R^2 sebesar 0,891.

Daftar Pustaka

- Ashly, P.C., Joseph. M.J & Mohanan. P.V. Activity of diastase α -amylase immobilized on polyanilines (PANIs). *Food Chemistry* 2011; 127: 1808-1813.
- Bahri, S., Mizan, M & Hasan, M. Karakterisasi enzim amilase dari kecambah biji jagung ketan (*zea mays ceratina* l.). *Journal Natural Science* 2012; 1 (1): 132-143.
- Butterfield. D.A., Bhattacharyya. D, Dannert. S & Bachas. L. Catalytic biofunctional membranes containing site-specifically immobilized enzyme arrays. *Journal of Membran Science* 2001; 181: 29-37.



- Chaudhary, N. & Balomajumder, C. Optimization study of adsorption parameters for removal of phenol on aluminum impregnated fly ash using response surface methodology. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2014; 45: 852-859.
- Demerikan, E., Dincbas, S, Sevinc, N & Ertan, F. Immobilization of *B.amyloliquefaciens* α -amylase and comparison of some of its enzymatic properties with the free form. *Romanian Biothecnological Letters* 2011; 16 (6): 6690-6701.
- Hermida, L., Abdullah, A.Z & Mohamed, A.R. Synthesis and Characterization of Mesostructured Cellular Foam (MCF) Silica Loaded with Nickel Nanoparticles as a Novel Catalyst. *Materials Sciences and Applications* 2013; 4: 52-62.
- Milosavic, N.B., Prodanovic, R.M, Jovanović, S.M & Vujčić, Z.M. Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly (GMA-Co-EGDMA). *Enzyme and Microbial Technology* 2007; 40: 1422-1426.
- Montilha, M.S., Sbroggio, M.F, Figueireido, V. R. G, Ida, E.I & Kurozawa, L.E. Optimization of enzymatic protein hydrolysis conditions of okara with endopeptidase Alcalase. *International Food Research Journal* 2017; 24 (3): 1067-1074.
- Nadir, Najjah., Maizirwan Mel, Muhamed Ismail Abdul Karim & Rosli Mohd Yunus. Optimisation of hydrolysis conditions for ethanol production from surgom starch. *Journal - The Institution of Engineers Malaysia* 2010; 71 (3): 26-34.
- Nisha, S., Arun-Karthick, S., Gobi, N. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. *Chemical Science Review and Letters* 2012; 1 (3): 148 - 155.
- Parshad, R., Bhushan, I., Qazi, G. N., & Gupta, V.L. Immobilization of Lipase by Entrapment in Sato. T., Tetsuya. T & Tanabe. S. 2002. *Enzymes, immobilization methods*. Osaka Japan: 1062-1064.
- Sebayang, Abdi Hanra., M.H Hassan, H.C Ong, S.D.S.A Silitonga, F. Kusumo, T.M.I Mahlia & A.H Bahar. Optimization of reducing sugar production from manihot glaziovii starch using response surface methodology. *Journal of Energies* 2017; 10 (35): 1-13.
- Shariffa, Y. N., Karim. A. A, Fazilah. A & Zaidul. I. S .M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildley hit-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. *Journal of Food Hydrocolloids* 2009; 23: 434-440.
- Soyer, A., Bayraktar, E & Mehmetoglu, U. Optimization of lipase-catalized enantioselective production of 1-phenyl 1-prophanol using response surface methodology. *Journal of Preparative Biochemistry and Biotechnology* 2010; 40 (4): 389-404.
- Yunianta, P., W.D. Rukmi & S. Rahman. Optimization of glucose syrup production process using sabrang potato starch (*coleus tuberosus benth*) by hydrolysis enzymatic. *Journal of BioSciences* 2014; 9 (2): 49-55.





Lembar Tanya Jawab

Moderator : Firman Kurniawansyah (ITS Surabaya)
Notulen : Belinda Purboningrum (UPN "Veteran" Yogyakarta)

1. Penanya : Hargono (Teknik Kimia UNDIP Semarang)

Pertanyaan :
 - Variasi rancangan percobaan berdasarkan apa?
 - Apakah semua dilaksanakan?
 - Grafik prediksi dan aktual berdasarkan apa?

Jawaban :
 - Berdasarkan RSM dengan desain CCD.
 - Semua rancangan percobaan dilaksanakan di laboratorium?
 - Berdasarkan titik data prediksi vs aktual.
2. Penanya : Felicia Winardi (Teknik Kimia UNPAR Bandung)

Pertanyaan : Penggunaan enzim 20% apakah masih efektif? Apakah relevan dengan penelitian lain?

Jawaban : efektif. Hasil yang didapatkan relevan dengan penelitian lain. (Demerikan dan Ashly mendapatkan hasil yang sama)
3. Penanya : Olivia Veronica (Teknik Kimia UNPAR bandung)

Pertanyaan : Variasi data diluar nilai low level dan high level didapatkan dari mana?

Jawaban : Variasi data diluar low level dan high level ditentukan oleh software desgn expert.
4. Penanya : Elina Nur Hidayah (UPN "Veteran" Yogyakarta)

Pertanyaan :
 - Pemisahan dilakukan dengan metode apa?
 - Sebelum digunakan ada perlakuan atau tidak?

Jawaban :
 - Metode filtrasi dilakukan untuk memisahkan enzim dengan produk.
 - Sebelum digunakan enzim difiltrasi dan dibilas dengan menggunakan buffer.

