

**PENGARUH PENAMBAHAN ION Mg^{2+} TERHADAP
AKTIVITAS XILANASE DARI *BACILLUS* sp. DENGAN
INDUSER TEPUNG KLOBOT JAGUNG**

SKRIPSI

Oleh :

RISKI FIRMANSYAH

0510920052 - 92



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009**

**PENGARUH PENAMBAHAN ION Mg^{2+} TERHADAP
AKTIVITAS XILANASE DARI *BACILLUS* sp. DENGAN
INDUSER TEPUNG KLOBOT JAGUNG**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Oleh :

RISKI FIRMANSYAH

0510920052 - 92



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2009

LEMBAR PENGESAHAN

**PENGARUH PENAMBAHAN ION Mg^{2+} TERHADAP
AKTIVITAS XILANASE DARI *BACILLUS* sp. DENGAN
INDUSER TEPUNG KLOBOT JAGUNG**

Oleh :

RISKI FIRMANSYAH

0510920052 - 92

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

**Menyetujui,
Pembimbing I**

Pembimbing II

Drs. Sutrisno, M.Si
NIP. 196203181990021001

Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 195204121980021001

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 196304041987011001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Riski Firmansyah

NIM : 0510920052-92

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

**PENGARUH PENAMBAHAN ION Mg^{2+} TERHADAP
AKTIVITAS XILANASE DARI *BACILLUS* sp. DENGAN
INDUSER TEPUNG KLOBOT JAGUNG**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 28 Agustus 2009

Yang menyatakan,

RISKI FIRMANSYAH

NIM. 0510920052-92

PENGARUH PENAMBAHAN ION Mg^{2+} TERHADAP AKTIVITAS XILANASE DARI *BACILLUS* sp. DENGAN INDUSER TEPUNG KLOBOT JAGUNG

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ion Mg^{2+} terhadap aktivitas xilanase dari *Bacillus* sp. dengan induser tepung klobot jagung serta menentukan nilai parameter kinetika meliputi V_m , K_M dan K_i . Pengaruh penambahan ion Mg^{2+} diketahui dengan membandingkan antara aktivitas xilanase tanpa penambahan ion Mg^{2+} dan aktivitas xilanase dengan penambahan ion Mg^{2+} . Metode yang digunakan dalam penentuan aktivitas xilanase adalah metode Nelson-Somogyi pada temperatur 60 °C, pH 8, waktu inkubasi 50 menit dan variasi konsentrasi substrat 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 dan 0,5% dengan konsentrasi ion Mg^{2+} 1, 2, 4, 6, 8 dan 10 mM pada fraksi xilanase 0 - 40, 40 - 80 dan 80 - 100%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa xilanase mempunyai aktivitas spesifik tertinggi pada fraksi 40 - 80% yaitu 7,4766 $U.mg^{-1}$ ($p < 0,01$). Aktivitas xilanase tanpa penambahan ion Mg^{2+} sebesar 1,8071 $\mu g.mL^{-1}.menit^{-1}$ dengan nilai V_m dan K_M yaitu 0,3712 $\mu g.mL^{-1}.menit^{-1}$ dan 0,35%. Aktivitas xilanase pada konsentrasi ion Mg^{2+} 1, 2 dan 4 mM sebesar 1,8813; 1,9137; 2,6520 $\mu g.mL^{-1}.menit^{-1}$ atau meningkat sebesar 104,11; 105,90 dan 146,76% ($p < 0,01$). Sedangkan aktivitas xilanase pada konsentrasi ion Mg^{2+} 6, 8 dan 10 mM sebesar 1,7664; 1,6984 dan 1,6679 $\mu g.mL^{-1}.menit^{-1}$ atau menurun sebesar 97,75; 93,99 dan 92,30% ($p < 0,01$) dengan nilai V_m , K_M dan K_i sebesar 0,3709 $\mu g.mL^{-1}.menit^{-1}$; 0,3927% dan 49,06 mM.

Kata kunci : Ion Mg^{2+} , Xilanase, *Bacillus* sp., Klobot Jagung

THE INFLUENCE OF ADDITION Mg^{2+} ION TO THE XYLANASE ACTIVITY FROM *BACILLUS* sp. USING CORN STORVE AS INDUCER

ABSTRACT

The purposes of this research are to determine the influence of addition Mg^{2+} ion to the xylanase activity from *Bacillus* sp. using corn storve as inducer and determine kinetic parameter value: V_m , K_M and K_i . Nelson-Somogyi method used to determine xylanase activity at temperature $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 8, incubation time 50 minutes and 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5% substrats concentration with 1, 2, 4, 6, 8 and 10 mM Mg^{2+} ion concentration, at 0 - 40, 40 - 80 and 80 - 100% xylanase fraction. The result of this research shows that the highest specific activity of xylanase is at 40 - 80% fraction whit $7.4766\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ($p < 0.01$). Xylanase activity without Mg^{2+} ion is $1.8071\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ with $0.3712\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ V_m value and 0.35% K_M value. Xylanase activity at 1, 2 and 4 mM Mg^{2+} ion concentration where 1.8813 , 1.9137 and $2.6520\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, increased by 104.11, 105.90 and 146.76% ($p < 0.01$). Xylanase activity at 6, 8 and 10 mM Mg^{2+} ion concentration are 1.7664 , 1.6984 and $1.6679\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, decreased by 97.75, 93.99 and 92.30% ($p < 0.01$) with $0.3709\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ V_m value, 0.3927% K_M value and 49.06 mM K_i value.

Keywords : Mg^{2+} Ion, Xylanase, Bacillus sp., Corn Storve

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis persembahkan kehadiran Tuhan YME karena atas segala limpahan rahmat, karunia dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul Pengaruh Penambahan Ion Mg^{2+} Terhadap Aktivitas Xilanase dari *Basillus* sp. Dengan Induser Tepung Klobot Jagung. Tujuan dari penulisan skripsi ini adalah untuk menyelesaikan masa perkuliahan penulis di Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya. Penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Drs. Sutrisno, M.Si. selaku Dosen Pembimbing I dan Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS. selaku Dosen Pembimbing II, atas ilmu, bimbingan, nasehat dan kesabaran yang diberikan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Diah Mardiana, MS. Selaku dosen Penasehat Akademik yang telah memberikan arahan kepada penulis selama menempuh studi di Jurusan Kimia Universitas Brawijaya.
3. Qonitah Fardiyah, S.Si., M.Si., Drs. Danar P, M.Si., Dr. Diah Mardiana, MS., Dr. Rurini Retnowati, M.Si. selaku Dosen penguji atas saran yang diberikan.
4. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS. selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Brawijaya.
5. Seluruh dosen dan karyawan Jurusan Kimia Universitas Brawijaya atas segala ilmu dan bantuan yang diberikan.
6. Kedua orang tua, kakak dan adik, atas semua dukungan, doa dan perhatian hingga terselesaikannya tugas akhir ini.
7. Teman-teman di Jurusan kimia angkatan 2005 dan semua pihak yang turut membantu penyelesaian tugas akhir ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran yang membangun dari pembaca dan semoga skripsi ini dapat memberikan sumbangan yang bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Malang, 2009

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR PERSAMAAN	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Klobot Jagung.....	5
2.2 Xilan.....	5
2.3 <i>Bacillus</i> sp.	6
2.4 Enzim.....	6
2.4.1 Faktor – faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim.....	7
2.4.2 Isolasi enzim.....	9
2.4.3 Xilanase.....	10
2.5 Penentuan Kadar Gula Pereduksi Secara Spektrofotometri Dengan Reagen Nelson-Somogyi.....	11
2.6 Laju Reaksi Enzimatik.....	11
2.6.1 Persamaan Michaelis-Menten.....	12
2.6.2 Persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	13
2.7 Kofaktor.....	13
2.7.1 Kofaktor logam.....	14
2.7.2 Ion Magnesium (Mg^{2+}).....	14

2.8	Inhibitor.....	15
-----	----------------	----

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1	Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.2	Bahan dan Alat Penelitian	20
3.2.1	Bahan penelitian	20
3.2.2	Bahan kimia.....	20
3.2.3	Alat penelitian	20
3.3	Metode Penelitian.....	21
3.4	Tahapan Kerja	21
3.5	Prosedur Kerja.....	22
3.5.1	Pembuatan tepung klobot jagung	22
3.5.2	Pembuatan media padat.....	22
3.5.3	Pembuatan media cair	22
3.5.4	Penanaman biakan murni <i>Bacillus</i> sp.....	22
3.5.5	Pembuatan inokulum.....	23
3.5.6	Produksi xilanase.....	23
3.5.7	Isolasi ekstrak kasar xilanase dari biakan <i>Bacillus</i> sp.....	23
3.5.8	Fraksinasi xilanase dengan amonium sulfat.....	23
3.5.9	Dialisis enzim.....	24
3.5.10	Penentuan panjang gelombang maksimum kompleks <i>molybdenum blue</i>	24
3.5.11	Pembuatan kurva standar kompleks <i>molybdenum blue</i>	24
3.5.12	Uji aktivitas xilanase	25
3.5.13	Penentuan kadar gula pereduksi secara spektrofotometri dengan reagen Nelson-Somogyi	25
3.5.14	Pengukuran aktivitas xilanase	26
3.5.15	Pembuatan kurva standar kompleks biuret-BSA.....	26
3.5.16	Penentuan kadar protein xilanase	27
3.5.17	Uji aktivitas enzim xilanase dengan penambahan ion Mg^{2+}	27
3.5.18	Penentuan V_m dan K_M	27
3.5.19	Penentuan K_i	28
3.6	Analisa Data	28

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase Dari <i>Bacillus</i> sp.....	29
4.2	Fraksinasi Xilanase.....	29

4.3	Penentuan Aktivitas Spesifik Xilanase.....	30
4.6	Pengaruh Penambahan Ion Mg ²⁺ Terhadap Aktivitas Xilanase.....	34
4.7	Penentuan Nilai Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis.....	36

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1	Kesimpulan.....	38
5.2	Saran.....	38

DAFTAR PUSTAKA	39
-----------------------------	----

LAMPIRAN	43
-----------------------	----



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Struktur bangun xilan6
Gambar 2.2	Pengaruh pH terhadap kecepatan reaksi8
Gambar 2.3	Pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim.....8
Gambar 2.4	Kurva pengaruh konsentrasi enzim terhadap laju reaksi enzim.....9
Gambar 2.5	Grafik hubungan konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzim.....12
Gambar 2.6	Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> (Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_0$)13
Gambar 2.7	Skema reaksi enzim untuk inhibisi kompetitif15
Gambar 2.8	Grafik inhibisi kompetitif16
Gambar 2.9	Skema reaksi enzimatis untuk inhibisi non-kompetitif17
Gambar 2.10	Grafik inhibisi non-kompetitif17
Gambar 2.11	Skema reaksi enzimatis untuk inhibisi un-kompetitif18
Gambar 2.12	Grafik inhibisi un-kompetitif19
Gambar 4.1	Grafik aktivitas spesifik xilanase pada berbagai fraksi31
Gambar 4.2	Mekanisme reaksi enzimatis xilanase dengan xilan33
Gambar 4.3	Kurva hubungan $1/V_0$ dengan $1/[S]$ xilanase.....36
Gambar 4.4	Kurva jenis inhibisi ion Mg^{2+} terhadap aktivitas xilanase.....37
Gambar L.6	Kurva pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp.63
Gambar L.8	Kurva panjang gelombang maksimum kompleks <i>molybdenum blue</i> 65
Gambar L.9	Kurva standar kompleks <i>molybdenum blue</i> pada $\lambda = 745 \text{ nm}$ 66
Gambar L.10	Kurva panjang gelombang maksimum kompleks biuret-BSA67
Gambar L.11	Kurva standar kompleks biuret-BSA 68
Gambar L.10	Kurva aktivitas xilanase fraksi 40 – 80% pada variasi konsentrasi Ion Mg^{2+} 71

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 2.1	Persamaan reaksi enzim - substrat	7
Persamaan 2.2	Persamaan reaksi antara gula pereduksi dengan reagen Nelson-Somogyi	11
Persamaan 2.3	Persamaan Michaelis-Menten	12
Persamaan 2.4	Persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	13
Persamaan 2.5	Persamaan Michaelis-Menten untuk inhibisi kompetitif	16
Persamaan 2.6	Persamaan <i>Lineweaver-Burk</i> untuk inhibisi kompetitif	16
Persamaan 2.7	Persamaan Michaelis-Menten untuk inhibisi non-kompetitif	17
Persamaan 2.8	Persamaan <i>Lineweaver-Burk</i> untuk inhibisi non-kompetitif	17
Persamaan 2.9	Persamaan Michaelis-Menten untuk inhibisi un-kompetitif	18
Persamaan 2.10	Persamaan <i>Lineweaver-Burk</i> untuk inhibisi un-kompetitif	18

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1	Komposisi Kimia Klobot Jagung5
Tabel 4.1	Aktivitas Spesifik Xilanase pada Berbagai Fraksi ...30
Tabel 4.2	Aktivitas Xilanase Fraksi 40 – 80% pada Variasi Konsentrasi Ion Mg ²⁺34
Tabel L.7	Tabel Amonium Sulfat.....64
Tabel L.8	Data Absorbansi Kompleks <i>Molybdenum Blue</i> pada $\lambda = 600 - 800 \text{ nm}$65
Tabel L.9	Data Absorbansi Kurva Standar Kompleks <i>Molybdenum Blue</i> pada $\lambda = 745 \text{ nm}$66
Tabel L.10	Data Absorbansi Kompleks Biuret-BSA pada $\lambda = 500 - 600 \text{ nm}$67
Tabel L.11	Data Absorbansi Kurva Standar Kompleks Biuret-BSA pada $\lambda = 550 \text{ nm}$68
Tabel L.12.1	Data Absorbansi Kadar Protein Xilanase Berbagai Fraksi pada $\lambda = 550 \text{ nm}$69
Tabel L.12.2	Kadar Protein Xilanase Berbagai Fraksi69
Tabel L.13.1	Data Absorbansi Xilanase Berbagai Fraksi pada $\lambda = 745 \text{ nm}$70
Tabel L.13.2	Data Aktivitas Xilanase Berbagai Fraksi70
Tabel L.14	Absorbansi Xilanase Fraksi 40 – 80% Dengan Variasi Konsentrasi Ion Mg ²⁺ pada $\lambda = 745 \text{ nm}$71
Tabel L.15.1	Data Absorbansi Xilanase Fraksi 40 – 80% Dengan Variasi Konsentrasi Substrat pada $\lambda = 745 \text{ nm}$72
Tabel L.15.2	Data Aktivitas Xilanase Fraksi 40 – 80% pada Variasi Konsentrasi Substrat72
Tabel L.15.3	Absorbansi Xilanase Fraksi 40 – 80% Dengan Konsentrasi Ion Mg ²⁺ 6 mM pada $\lambda = 745 \text{ nm}$73
Tabel L.15.4	Aktivitas Xilanase Fraksi 40 – 80% Dengan Konsentrasi ion Mg ²⁺ 6 mM.....73
Tabel L.19.1	Penentuan F _{hitung} Aktivitas Xilanase pada Berbagai Fraksi.....78
Tabel L.19.2	Analisa Ragam Satu Arah Pengaruh Fraksinasi Terhadap Aktivitas Xilanase.....80

Tabel L.19.3	Data uji BNT Fraksinasi Terhadap Aktivitas Xilanase	80
Tabel L.19.4	Penentuan F_{hitung} Kadar Protein pada Berbagai Fraksi	81
Tabel L.19.5	Analisa Ragam Satu Arah Pengaruh Ion Mg^{2+} Terhadap Kadar Protein.....	83
Tabel L.19.6	Data uji BNT Fraksinasi Terhadap Kadar Protein.....	83
Tabel L.19.7	Penentuan F_{hitung} Aktivitas Spesifik Xilanase	84
Tabel L.19.8	Analisa Ragam Satu Arah Pengaruh Fraksinasi Terhadap Aktivitas Spesifik	86
Tabel L.19.9	Data uji BNT Fraksinasi Terhadap Aktivitas Spesifik	86
Tabel L.19.10	Penentuan F_{hitung} pada Aktivitas Xilanase Fraksi 40 – 80% Dengan Penambahan Ion Mg^{2+}	87
Tabel L.19.11	Analisa Ragam Satu Arah Pengaruh Ion Mg^{2+} Terhadap Aktivitas Xilanase.....	89
Tabel L.19.12	Data uji BNT Pengaruh Ion Mg^{2+} Terhadap Aktivitas Xilanase.....	90



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Komposisi Media Pertumbuhan43
Lampiran 2	Preparasi Larutan.....44
Lampiran 3	Perhitungan Harga pH Buffer Fosfat 0,2 M.....47
Lampiran 4	Tahapan Kerja48
Lampiran 5	Skema Kerja49
Lampiran 6	Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp.65
Lampiran 7	Tabel Amonium Sulfat64
Lampiran 8	Penentuan Panjang Gelombang Kompleks <i>Molybdenum Blue</i>65
Lampiran 9	Pembuatan Kurva Standar Kompleks <i>Molybdenum Blue</i>66
Lampiran 10	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kompleks Biuret-BSA67
Lampiran 11	Kurva Standar Kompleks Biuret-BSA68
Lampiran 12	Kadar Protein Xilanase.....69
Lampiran 13	Aktivitas Xilanase pada Berbagai Fraksi70
Lampiran 14	Aktivitas Xilanase Fraksi 40 – 80% pada Variasi Konsentrasi Ion Mg^{2+}71
Lampiran 15	Pengukuran Nilai Konstanta Kinetika V_m , K_M dan K_i72
Lampiran 16	Pengukuran Aktivitas Xilanase74
Lampiran 17	Perhitungan Kadar Protein75
Lampiran 18	Perhitungan Harga V_m , K_M dan K_i76
Lampiran 19	Analisa Statistik.....78

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Limbah yang dihasilkan oleh pertanian maupun perkebunan sering kali dibuang begitu saja tanpa adanya pemanfaatan lebih lanjut dan tidak sedikit yang berdampak buruk terhadap lingkungan. Industri pengolahan jagung menghasilkan limbah klobot jagung dengan kandungan xilan yang dapat diolah hingga memberi nilai ekonomi yang tinggi. Klobot jagung dapat digunakan dalam produksi xilanase dari mikroorganisme misalnya spesies *Bacillus* (Achmad, 2004). Richana (2002) telah memanfaatkan kulit pisang, kulit kedelai, kulit apel, kulit melon dan klobot jagung sebagai sumber karbon dalam produksi xilanase. Menurut penelitian Mayasari (2007), xilanase menggunakan induser klobot jagung mempunyai aktivitas spesifik xilanase tertinggi 140,1948 U/mg.

Xilanase merupakan enzim yang berfungsi sebagai biokatalis untuk menghidrolisis substrat xilan (hemiselulosa) menjadi gula pereduksi yaitu xilosa (Schlegel dan Schmidt, 1994). Pemanfaatan xilanase dalam dunia industri memiliki peranan yang sangat penting, misalnya pada pembuatan kertas, pembuatan gula xilosa, produksi makanan dan minuman, produksi pakan ternak, peningkatan kualitas roti dan penjernih air. Pada industri kertas xilanase dimanfaatkan untuk menghilangkan hemiselulosa dalam proses *biobleaching*. Xilanase dapat menggantikan bahan kimia sehingga pencemaran limbah kimia dapat dikurangi dan juga lebih murah karena xilanase dapat diimobilisasi untuk digunakan secara berkelanjutan (Ruiz-Arribas, *et al.*, 1995). Daneault, *et al.*, (1994) juga melaporkan bahwa penggunaan xilanase dalam industri pulp konvensional dapat menurunkan penggunaan klorin, natrium hidroksida dan klorin dioksida.

Xilanase dapat dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme seperti: *Trichoderma viride*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Humicola* (Haltrich, *et al.*, 1996). Xilanase juga dihasilkan oleh *Bacillus circulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus sp.* RP 1 dan

Bacillus licheniform. Berdasarkan hasil penelitian Ima (2008) xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. RP 1 memiliki aktivitas tertinggi yaitu 0,674 U/mL.

Pemurnian enzim bertujuan untuk mengeliminasi senyawa lain yang mengganggu sisi aktif enzim selain itu juga dapat meningkatkan aktivitas spesifik enzim dibandingkan sebelum dimurnikan. Ada beberapa macam metode pemurnian enzim antara lain metode pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, afinitas dan gel filtrasi. Tetapi metode yang sering dilakukan adalah pengendapan protein dengan menambahkan garam amonium sulfat dengan berbagai variasi konsentrasi ke dalam larutan ekstrak kasar enzim disertai pengadukan pada temperatur rendah. Garam amonium sulfat sering digunakan dalam proses pemurnian enzim karena mempunyai kelarutan yang tinggi walaupun di bawah temperatur kamar, tidak beracun, harganya murah, dan cenderung menstabilkan enzim (Palmer, 1991). Penelitian yang telah dilakukan Nakamura (1993) menunjukkan bahwa aktivitas spesifik xilanase yang diisolasi dari *Bacillus* sp. meningkat, sebelum dimurnikan 86,1 U/mg setelah dimurnikan 132 U/mg. Oleh karena itu penting untuk mendapatkan xilanase murni dari *Bacillus* sp. dengan metode fraksinasi menggunakan amonium sulfat yang dilanjutkan dengan proses dialisis agar memperoleh aktivitas spesifik xilanase yang lebih baik.

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh temperatur, pH dan waktu inkubasi. Berdasarkan penelitian Putri (2009) xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. dengan inducer tepung klobot jagung mempunyai kondisi optimal pada temperatur 60 °C, pH 8 dan waktu inkubasi 50 menit. Aktivitas enzim berhubungan dengan perubahan struktur tersier dari molekul protein enzim. Struktur tersier distabilkan oleh empat jenis ikatan, yaitu ikatan hidrogen, gaya tarik ionik, interaksi hidrofobik, dan ikatan disulfida. Berbagai cara dapat dilakukan untuk meningkatkan stabilitas dan aktivitas enzim, salah satunya adalah penambahan ion-ion logam (Satiawihardja, *et al.*, 1997).

Adanya ion-ion logam akan mempengaruhi kerja katalitik enzim, 1 mM ion Mg^{2+} yang ditambahkan pada uji aktivitas xilanase yang diproduksi dari *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 meningkatkan aktivitas xilanase hingga 154%, (Khandeparkar, *et al.*, 2002), sedangkan penambahan 1 mM ion Mg^{2+} pada xilanase yang diproduksi dari

Enterobacter sp. MTCC 5112 meningkatkan aktivitas xilanase hingga 156% (Khandeparkar, *et al.*, 2004) sedangkan menurut Richana, *et al.*, (2008) adanya ion Mg^{2+} dengan konsentrasi 2, 4 dan 10 mM akan menurunkan aktivitas xilanase yang diproduksi oleh *Bacillus pumilus* RXA-III5 berturut-turut 87,09; 82,26 dan 69,35%. Tetapi dari penelitian yang sudah dilakukan belum diketahui sampai konsentrasi berapa ion Mg^{2+} meningkatkan aktivitas xilanase dan pada konsentrasi minimal berapa ion Mg^{2+} menurunkan aktivitas xilanase. Dengan demikian xilanase dari *Bacillus* sp. perlu diuji aktivitasnya dengan penambahan variasi konsentrasi ion Mg^{2+} menggunakan induser tepung klobot jagung.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh penambahan ion Mg^{2+} terhadap aktivitas xilanase yang diproduksi dari *Bacillus* sp.?
2. Berapa nilai parameter kinetika reaksi enzimatik xilanase yang diproduksi dari *Bacillus* sp., meliputi V_m , K_M dan K_i ?

1.3 Batasan Masalah

1. Fraksinasi menggunakan amonium sulfat dengan fraksi 0 – 40, 40 – 80 dan 80 - 100%.
2. Sumber ion Mg^{2+} yang digunakan yaitu $MgSO_4$.
3. Variasi konsentrasi ion Mg^{2+} yang digunakan pada uji aktivitas xilanase yaitu 1, 2, 4, 6, 8 dan 10 mM.
4. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan yaitu 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 dan 0,5%.

1.4 Tujuan

1. Mengetahui pengaruh penambahan ion Mg^{2+} terhadap aktivitas xilanase.
2. Menentukan nilai konstanta kinetika V_m dan K_M serta K_i xilanase dari *Bacillus* sp.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memanfaatkan klobot jagung sebagai bahan baku produksi enzim xilanase serta memberikan informasi mengenai pengaruh konsentrasi ion Mg^{2+} terhadap aktivitas xilanase dari *Bacillus* sp.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klobot Jagung

Tanaman jagung merupakan salah satu jenis tanaman pangan biji-bijian dari keluarga rumput-rumputan. Tanaman jagung berasal dari Amerika yang tersebar ke Asia dan Afrika. Sistematis tanaman jagung sebagai berikut (Chuzaeami, *et al.*, 1983) :

Kingdom : Plantae
Divisio : Spermatophyta
Sub Divisio : Angiospermae
Classis : Monocotyledone
Ordo : Graminae
Familia : Graminaceae
Genus : Zea
Species : Zea mays L

Komponen utama serat kasar adalah hemiselulosa (41,16%). Besarnya kandungan hemiselulosa pada klobot jagung berpotensi sebagai sumber xilan dalam produksi xilanase. Kandungan klobot jagung dapat dilihat pada Tabel 2.1.

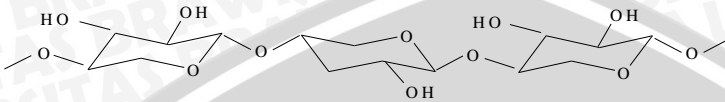
Tabel 2.1 Komposisi Kimia Klobot Jagung

Komponen	Kandungan (%)
Bahan organik	95,53%
Bahan Kasar	41,21%
Protein kasar	6,41%
Serat kasar	38,76%
Lemak kasar	0,66%
Abu	4,47%

2.2 Xilan

Xilan tergolong karbohidrat disebut juga sebagai hemiselulosa. Rantai xilan terdiri dari β -D-xilosa yang dihubungkan secara 1,4-glikosidik (Gambar 2.1). Rantai xilan bercabang, tetapi karena derajat polimerisasinya rendah (30-100), maka tidak berbentuk kristal, sehingga xilan larut dalam pelarut polar. Xilan cukup stabil

hingga temperatur 180 °C. Struktur bangun xilan dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Schlegel dan Schmidt, 1994).



Gambar 2.1 Struktur bangun xilan

Xilan merupakan salah satu karbohidrat yang paling banyak di alam. Merang dan kulit pohon mengandung xilan sampai 30 %, ampas tebu sampai 30 %, kayu konifera sampai 7-12 % dan kayu pohon berdaun sampai 20-25 % (Schlegel dan Schmidt, 1994).

2.3 *Bacillus* sp.

Bacillus sp tumbuh di medium berisi xylan sebagai sumber karbon, *Bacillus* sp memproduksi multi enzim kompleks (xylanosome), yang terdiri dari sedikitnya 16 jenis xilanase dan sedikitnya 9 jenis *carboxymethylcellulases* (CMCASES) selain itu *Bacillus* sp. juga menghasilkan enzim ekstra seluler yaitu protease yang mampu menghidrolisis protein (Nakamura, *et al.*, 1993).

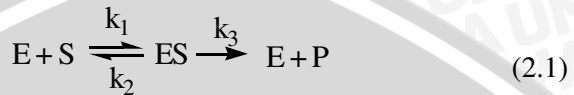
Klasifikasi dari *Bacillus* sp, yaitu (Alexopoulos dan Mins, 1979) :

Kingdom Bakteria
Divisio Firmicutes
Classis Bacilli
Ordo Bacillales
Familia Bacillaceae
Genus *Bacillus*
Spesies *Bacillus* sp.

2.4 Enzim

Enzim bekerja secara khas terhadap substrat tertentu. Agar enzim dapat bekerja pada suatu substrat, maka harus terjadi interaksi antara enzim dengan substrat pada bagian atau tempat tertentu saja (sisi aktif). Interaksi antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim-substrat. Kompleks ini merupakan

kompleks yang bersifat sementara dan akan terurai lagi, apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi. Persamaan reaksi enzim-substrat ditunjukkan pada Persamaan 2.1.



Pembentukan senyawa kompleks ES dari E dan S berlangsung dengan konstanta kecepatan k_1 . Kompleks ES mengalami dua kemungkinan penguraian, yaitu kembali terurai menjadi E dan S dengan konstanta kecepatan k_2 atau melanjutkan reaksi kembali dengan menghasilkan produk P dan E dengan konstanta kecepatan k_3 , dengan asumsi tidak ada P yang dapat diubah lagi menjadi S. (Poedjiadi, 1994)

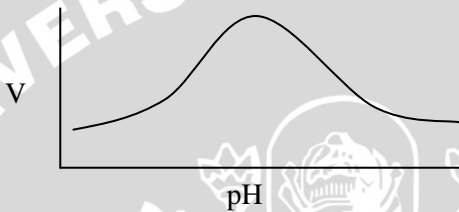
2.4.1 Faktor – faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH, temperatur, waktu inkubasi, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, aktivator, dan inhibitor.

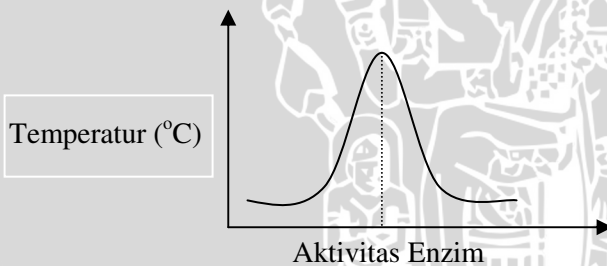
pH sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim, karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Hal ini menyebabkan konformasi dan fungsi katalitik enzim menjadi berubah. Enzim memiliki pH optimum yang khas yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimal (Voet and Voet, 1990). Didalam sel dan lingkungan sel sekelilingnya, pH harus tetap terjaga, karena adanya perubahan pH akan menyebabkan pergeseran aktivitas enzim. Hal ini akan mempengaruhi dan mengacaukan sistem katabolitik dan anabolitik dalam sel dan jaringan. Hubungan antara pH terhadap laju reaksi enzim dapat dilihat pada Gambar 2.2 (Girinda, 1993) :

Reaksi kimia sangat dipengaruhi oleh temperatur, maka reaksi yang dikatalis oleh enzim juga peka terhadap temperatur pada kisaran temperatur tertentu sesuai jenis enzim, maka kecepatan reaksi akan meningkat jika temperatur dinaikkan. Faktor kenaikan kecepatan pada setiap kenaikan $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ disebut Q_{10} , atau disebut juga koefisien temperatur. Kecepatan dari reaksi biologis akan diduakalikan dengan kenaikan temperatur $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, dan sebaliknya menjadi setengahnya jika diturunkan $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Wirakartakusumah,

1987). Apabila temperatur dinaikkan maka enzim akan mengalami denaturasi karena enzim merupakan protein, akibatnya daya kerja enzim akan menurun (Girinda, 1993). Denaturasi merupakan peristiwa penyimpangan dari sifat alamiah protein. Enzim memiliki temperatur optimum yaitu temperatur yang menyebabkan kecepatan reaksi menjadi maksimum jika konsentrasi enzim dan substrat konstan. Hubungan antara temperatur terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 2.3 (Wirakartakusumah,1987) :



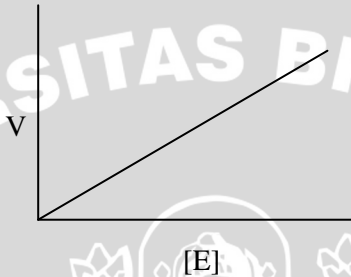
Gambar 2.2 Pengaruh pH terhadap kecepatan reaksi



Gambar 2.3 Pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Waktu yang diperlukan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat hingga menghasilkan produk disebut waktu inkubasi enzim. Waktu inkubasi enzim sebanding dengan produk yang dihasilkan. Waktu inkubasi lama maka semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat sehingga semakin banyak produk yang terbentuk. Tetapi bila enzim sudah jenuh dengan substrat maka lamanya waktu inkubasi sudah tidak berpengaruh lagi terhadap laju reaksi (Martin, *et al.*, 1984).

Kecepatan reaksi bergantung pada konsentrasi enzim yang berperan sebagai pengaktif dalam reaksi. Pada reaksi enzimatik, kecepatan reaksi berbanding lurus dengan konsentrasi enzim. Semakin tinggi konsentrasi enzim, maka semakin cepat reaksi berlangsung. Hubungan antara konsentrasi enzim dan laju reaksi dapat dilihat pada Gambar 2.4 (Martin, *et al.*, 1984) :



Gambar 2.4 Kurva pengaruh konsentrasi enzim terhadap laju reaksi enzim

Berdasarkan persamaan kinetika enzim, jika konsentrasi enzim dijaga konstan maka laju reaksinya akan bergantung pada konsentrasi substrat. Semakin besar konsentrasi substrat, laju reaksi juga semakin meningkat. Akhirnya akan tercapai suatu titik batas, dan setelah titik tersebut terlampaui laju reaksi meningkat sangat kecil dengan meningkatnya konsentrasi substrat (Martin, *et al.*, 1984).

Enzim memerlukan aktivator untuk meningkatkan aktivitasnya, aktivator dapat berupa bahan-bahan anorganik berupa ion-ion logam dan juga dapat berupa bahan-bahan organik yang lebih dikenal dengan nama koenzim. Sedangkan inhibitor adalah senyawa atau gugusan senyawa yang dapat menurunkan aktivitas suatu enzim (Palmer, 1991).

2.4.2 Isolasi enzim

Berdasarkan lokasi enzim di dalam sel, maka dikenal istilah enzim ekstraselular (di luar sel) dan enzim intraselular (di dalam sel). Isolasi enzim ekstraselular lebih mudah dibanding enzim intraselular, karena tanpa pemecahan sel (Muhtadi, *et al.*, 1992).

Enzim dapat diisolasi dari hewan, tanaman maupun

mikroorganisme dengan menggunakan beberapa metode antara lain: metode ekstraksi, presipitasi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi dan kromatografi (Rahman, 1989).

Proses isolasi enzim mengandung pengertian pelepasan enzim dari sel yang dapat dilakukan secara mekanik, fisik, kimiawi dan enzimatik melalui penghancuran membran atau dinding sel. Setelah penghancuran sel, untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim, dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan enzim dari sisa sel (*debris cell*) yang telah hancur (Cooper, 1977). Pemisahan partikel dari larutan pada metode sentrifugasi merupakan operasi utama dalam isolasi enzim. Ini termasuk pemisahan sel-sel dari medium biakan, pemisahan atau penghancuran sel dan pengumpulan presipitat (Judoamidjojo, *et al.*, 1992). Isolasi enzim dilakukan pada temperatur rendah dan campuran ditambah larutan penyangga (*buffer*) untuk mempertahankan kestabilan enzim. Enzim akan berada pada lapisan air (*supernatan*) (Cooper, 1977).

2.4.3 Xilanase

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi gula pereduksi. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu β -xilosidase, eksoxilanasase dan endoxilanase.

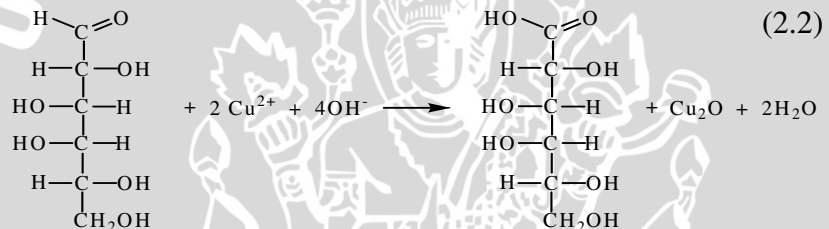
β -xilosidase, yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Sebagian besar enzim β -xilosidase yang berhasil dimurnikan masih menunjukkan adanya aktivitas transferase yang menyebabkan enzim ini kurang dapat digunakan pada industri penghasil xilosa. Eksoxilanasase mampu memutus rantai polimer xilosa pada ujung ikatan glikosida, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Enzim ini mengandung sedikit aktivitas transferase sehingga potensial dalam industri penghasil xilosa. Endoxilanase mampu memutus ikatan β -1,4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut (Richana, *et al.*, 2002).

2.5 Penentuan Kadar Gula Pereduksi Secara Spektrofotometri Dengan Reagen Nelson-Somogyi

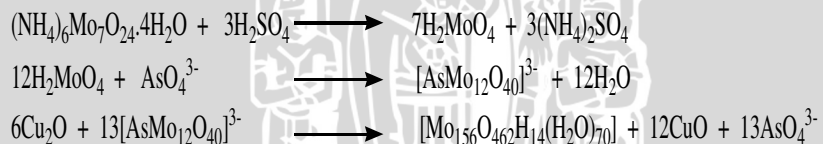
Gula pereduksi adalah gula yang mampu mereduksi senyawa pengoksidasi. Konsentrasi gula dapat ditentukan dengan cara mengukur konsentrasi senyawa pengoksidasi yang tereduksi oleh suatu larutan gula tertentu (Lehning, 1997).

Penentuan kadar gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi melibatkan dua tahap reaksi, yaitu reaksi gula pereduksi dengan reagen Nelson menghasilkan produk Cu_2O berupa endapan merah bata, kemudian reaksi kedua adalah antara Cu_2O dengan reagen arsenmolibdat. Tahapan reaksinya pada Persamaan 2.2 (Vogel, 1994) :

Tahap I:



Tahap II:



Kadar gula pereduksi ditentukan dengan menggunakan persamaan Lambert-Beer $A = e \cdot b \cdot c$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), di mana A adalah absorbansi, e adalah absorptivitas molar ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), b adalah ketebalan larutan sampel (cm), c adalah konsentrasi ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) (Underwood, 1998).

2.6 Laju Reaksi Enzimatik

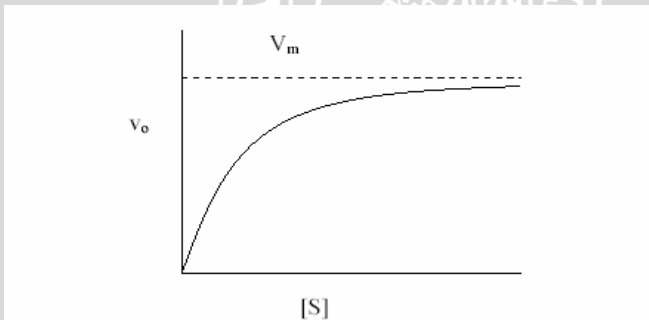
Analisis kinetika reaksi enzimatis meliputi dua parameter, yaitu kecepatan maksimum (V_m) dan tetapan Michaelis-Menten (K_M). V_m adalah batas teoritis dari laju reaksi yang akan tercapai bila kadar

substrat demikian tinggi, sehingga tempat aktif selalu ditempati oleh substrat. Jadi, merupakan kecepatan reaksi bila enzim jenuh dengan substrat. K_M dapat didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah V_m (Lehninger, 1997).

2.6.1 Persamaan Michaelis-Menten

Persamaan Michaelis-Menten (a), merupakan suatu pernyataan mengenai hubungan kuantitatif di antara kecepatan reaksi awal (V_o), kecepatan maksimum (V_m) dan konsentrasi substrat awal (S). K_M bersifat khas bagi enzim tertentu, dengan substrat spesifik pada kondisi pH dan temperatur tertentu. Nilai dugaan K_M dapat diperoleh dengan menggunakan prosedur grafik sederhana, seperti diperlihatkan Gambar 2.5. Akan tetapi, sulit untuk menentukan V_m dengan tepat dari jenis grafik tersebut, karena V_m hanya diduga dan tidak pernah dapat diketahui nilai sebenarnya. Nilai K_M yang lebih tepat dapat diperoleh dengan memetakan data yang sama dengan cara yang berbeda. Cara ini disebut pemetaan kebalikan-ganda atau persamaan *Lineweaver-Burk* dengan menggunakan transformasi aljabar dari persamaan Michaelis-Menten (Persamaan 2.3) (Lehninger, 1997).

$$V_o = \frac{V_m \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2.3)$$



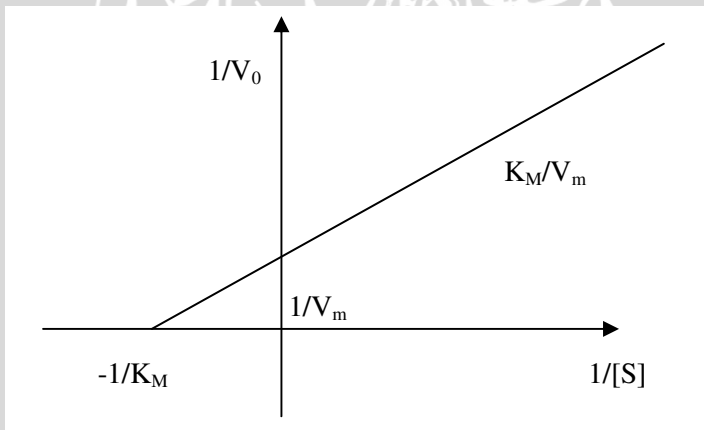
Gambar 2.5 Grafik hubungan konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzim

2.6.2 Persamaan *Lineweaver-Burk*

Persamaan Michaelis-Menten (Persamaan 2.3), dapat ditransformasi secara aljabar menjadi bentuk lain yang lebih bermanfaat dalam pengolahan data percobaan. Suatu transformasi yang umum dilakukan diturunkan secara sederhana dengan membuat kebalikan dari kedua sisi persamaan Michaelis-Menten, yang diperlihatkan pada Persamaan 2.4 (Lehninger, 1997):

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_m [S]} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (2.4)$$

Persamaan 2.4 adalah transformasi persamaan Michaelis-Menten yang disebut pemetaan kebalikan-ganda atau persamaan *Lineweaver-Burk*. Pemetaan $1/V_0$ terhadap $1/[S]$ menghasilkan garis lurus (Gambar 2.6). Garis ini akan memiliki sudut K_M/V_m , perpotongan garis terhadap sumbu y sebesar $1/V_m$ (pada sumbu $1/V_0$) dan perpotongan $-1/K_M$ pada sumbu $1/[S]$. Pemetaan kebalikan-ganda atau *Lineweaver-Burk* memiliki banyak manfaat, karena menghasilkan penentuan V_m secara lebih tepat (Lehninger, 1997).



Gambar 2.6 Grafik *Lineweaver-Burk* (Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_0$)

2.7 Kofaktor

Beberapa enzim tidak memerlukan komponen tambahan untuk mencapai aktivitas penuhnya. Namun beberapa pula memerlukan

molekul non-protein yang disebut kofaktor untuk berikatan dengan enzim dan menjadi aktif sehingga dapat melaksanakan fungsi katalitiknya. Kofaktor tersebut harus terikat terlebih dulu dengan enzim sebelum melaksanakan fungsi katalitiknya. Kofaktor dapat berupa senyawa anorganik yaitu logam disebut kofaktor logam dan berupa senyawa organik yang disebut dengan koenzim contohnya NAD dan FAD. Molekul-molekul kofaktor lebih kecil dan tahan panas sehingga kofaktor dapat berperan sebagai stabilisator (Lehninger, 1997).

2.7.1 Kofaktor logam

Logam berperan dalam proses katalisis oleh enzim dan juga penyusunan struktural yang penting. Sebagian enzim yang dikenal mengandung atau memerlukan logam yang berikatan secara kovalen atau nonkovalen untuk aktivitasnya. Jika terikat secara kovalen, pada pemurnian enzim logam tidak dapat dilepaskan. Enzim yang seperti itu disebut metaloenzim, sedangkan yang terikat secara nonkovalen, biasanya berupa ion logam yang diperlukan untuk mengaktifkan enzim. Perbedaan antara metaloenzim dan enzim yang diaktifkan logam, juga dapat dilihat pada afinitas enzim terhadap logamnya. Pada beberapa metaloenzim, logam yang terikat secara kovalen, sering mempunyai aktivitas katalitik sendiri (Hairrudin, 2009). Kofaktor yang berupa ion-ion logam berperan sebagai stabilisator agar enzim tetap aktif dan dapat meningkatkan aktivitas enzim, ion-ion logam, tersebut yaitu : Co^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} and Ca^{+2} (Lehninger, 1997).

2.7.2 Ion magnesium (Mg^{2+})

Ion Mg^{2+} merupakan salah satu ion logam yang penting dalam proses metabolik yang berkaitan erat dengan kerja katalitik enzim. Ion Mg^{2+} berperan dalam menstabilkan sub satuan protein oligomerik. Ion Mg^{2+} Juga membentuk senyawa kompleks dengan ATP (Lehninger, 1997). Selain itu Ion Mg^{2+} juga dapat meningkatkan aktivitas hialuronidase yang merupakan enzim ekstra seluler yang menghidrolisis asam hialuronat, yang merupakan semen jaringan sel (Putranto, 2006).

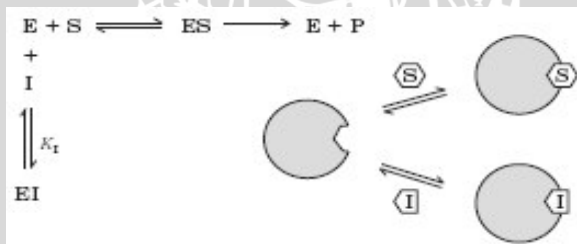
2.8 Inhibitor

Banyak bahan-bahan yang mengubah aktivitas suatu enzim dengan menggabungkannya dalam suatu jalur yang mempengaruhi ikatan substrat dan enzim. Bahan-bahan yang mereduksi aktivitas suatu enzim dengan cara ini dikenal sebagai inhibitor. Banyak inhibitor berupa bahan-bahan yang secara struktural menyerupai substrat enzimnya tetapi salah satunya tidak bereaksi atau bereaksi dengan sangat lambat dibandingkan dengan substrat. Inhibitor-inhibitor seperti ini pada umumnya digunakan untuk menyelidiki sifat kimia dan sifat konformasi alami dari suatu daerah (site) ikatan substrat sebagai bagian dari suatu usaha untuk mengeludasi mekanisme katalisis enzim tersebut (Simanjuntak, *et al.*, 2003).

Kerja enzim dapat dihambat secara *reversible* atau *irreversible*. Penghambatan secara *irreversible* merupakan pembentukan atau pemecahan ikatan kovalen dalam enzim sedangkan secara *reversible* suatu senyawa dapat terikat dan kemudian dapat lepas kembali. Reversible inhibitor dapat dibagi menjadi (Lehninger, 1997) :

1. Inhibitor kompetitif

Inhibitor kompetitif merupakan suatu bahan yang biasanya menyerupai substrat yang berkompetisi secara langsung dengan suatu substrat normal untuk secara spesifik mengikat daerah aktif (site) pada ikatan enzim. Model umum untuk inhibisi kompetitif diperlihatkan pada Gambar 2.7.



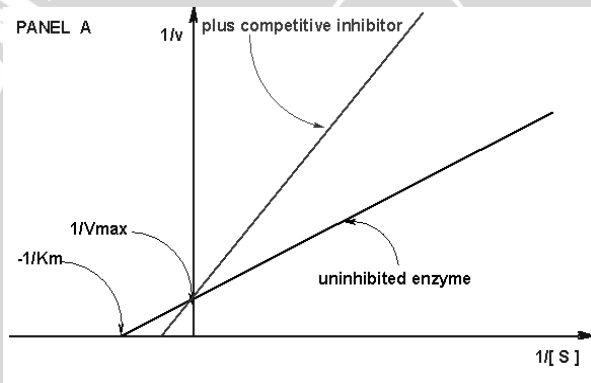
Gambar 2.7 Skema reaksi enzimatik untuk inhibisi kompetitif

Sehingga didapat persamaan reaksi enzimatik untuk inhibisi kompetitif dapat dilihat pada Persamaan 2.5.

$$V_0 = \frac{V_m [S]}{[S] \left(K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \right)} \quad (2.5)$$

Apabila persamaan ini dibuat grafik *Lineweaver-Burk* maka perlu dibuat kebalikan dari persamaan ini sehingga diperoleh Persamaan 2.6.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (2.6)$$

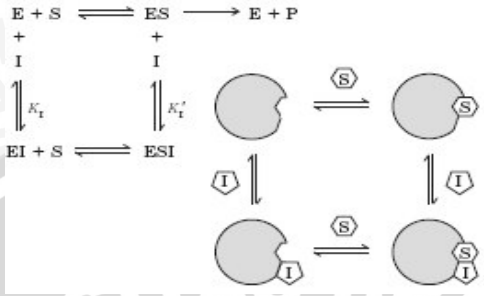


Gambar 2.8 Grafik inihisis kompetitif

Berdasarkan Gambar 2.8 pada reaksi enzim dengan inhibisi kompetitif ini nilai V_m tidak berubah, tetapi nilai K_M/V_m berubah.

2. Inhibitor non-kompetitif

Inhibitor terikat pada sisi lain dari enzim (bukan sisi aktif) jadi tidak memblokir pembentukan enzim-substrat, kompleks Enzim menjadi tidak aktif ketika inhibitor terikat walau enzim mengikat substrat. Inhibitor mengurangi konsentrasi enzim yang aktif, sehingga mempengaruhi V_m . Model umum untuk inhibisi non-kompetitif diberikan pada Gambar 2.9.

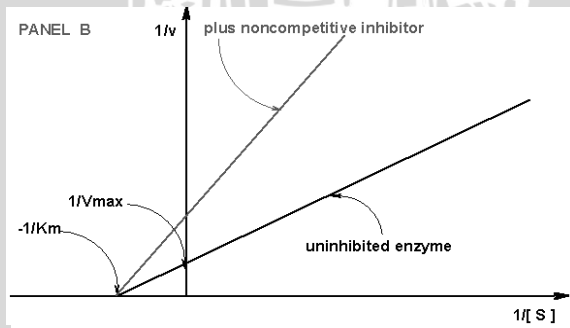


Gambar 2.9 Skema reaksi enzimatik untuk inhibisi non-kompetitif
 Sehingga didapat persamaan reaksi enzimatik untuk inhibisi kompetitif yang ditunjukkan pada Persamaan 2.7.

$$V_0 = \frac{V_m [S]}{([S] + K_M) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (2.7)$$

Apabila persamaan ini dibuat grafik *Lineweaver-Burk* maka perlu dibuat kebalikan dari persamaan ini sehingga diperoleh Persamaan 2.8.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{V_m} \quad (2.8)$$

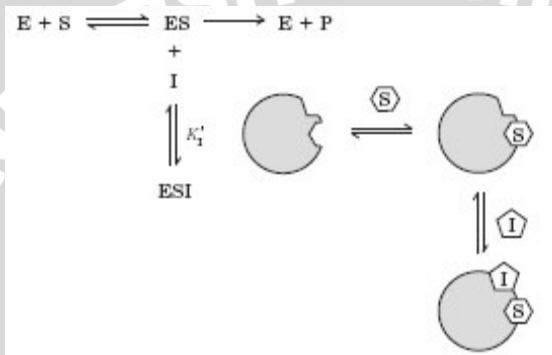


Gambar 2.10 Grafik inihisis non-kompetitif

Berdasarkan Gambar 2.10 pada reaksi enzim dengan inhibisi non-kompetitif ini nilai V_m berubah, tetapi nilai K_M tetap.

3. Inhibitor un-kompetitif

Inhibitor terikat pada sisi selain sisi aktif enzim, berbeda dengan inhibitor non-competitive, inhibitor ini hanya terikat pada kompleks ES sehingga tidak terikat pada enzim bebas. Model umum untuk inhibisi un-kompetitif diberikan pada Gambar 2.11.



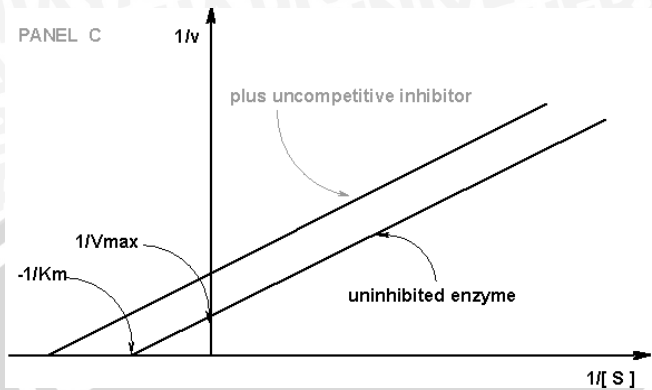
Gambar 2.11 Skema reaksi enzimatis untuk inhibisi un-kompetitif

Sehingga didapat persamaan reaksi enzimatis untuk inhibisi kompetitif yang ditunjukkan pada Persamaan 2.9.

$$V_0 = \frac{V_m [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + K_M} \quad (2.9)$$

Apabila persamaan ini dibuat grafik *Lineweaver-Burk* maka perlu dibuat kebalikan dari persamaan ini sehingga diperoleh Persamaan 2.10.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{V_m} \quad (2.10)$$



Gambar 2.12 Grafik inihisis un-kompetitif

Berdasarkan Gambar 2.12 pada reaksi enzim dengan inhibisi un-kompetitif, nilai V_m dan K_M berubah, tetapi nilai K_M/V_m tetap.

2.8 Hipotesis

Pada konsentrasi ion Mg^{2+} yang rendah akan meningkatkan aktivitas xilanase, sedangkan pada konsentrasi ion Mg^{2+} yang lebih tinggi akan menurunkan aktivitas xilanase.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Waktu penelitian dari bulan Januari - April 2009.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Kultur *Bacillus* sp., diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Negeri Malang, xilan dan klobot jagung.

3.2.2 Bahan kimia

Bahan-bahan yang digunakan memiliki derajat kemurnian *pro analysis* (pa), teknis dan *for microbiology*. Bahan-bahan pa antara lain: NaOH, NaCl, glukosa, KNa-tartrat, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, CuSO₄.5H₂O, KMnO₄, CH₃COOH, CH₃COONa, Na₂HPO₄.7H₂O, NaH₂PO₄, H₂SO₄, HCl, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, Na₂HAsO₄.7H₂O, MgSO₄. Bahan-bahan *for microbiology* antara lain: pepton, tepung agar, *meat extract* dan BSA (Bovine Serum Albumin), sedangkan bahan lainnya adalah akuades.

3.2.3 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan antara lain: membran selofan, seperangkat alat gelas, mortar, jarum ose, pengaduk magnet, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), neraca analitik (Bosch PE 620), inkubator (Heraeus Type B 5042), pH meter (Inolab WTW), penangas air (Mettler W 200), autoklaf, *shaker* (Edmund Buhler SM 25 24B), sentrifuse dingin (Juan MR 1889), pemanas listrik (Janke-Kunkel) dan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu Model 160A double beam).

3.3 Metode Penelitian

Ekstrak kasar enzim xilanase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. dimurnikan dengan pengendapan fraksional dengan fraksi 0 – 40%, 40 – 80% dan 80 – 100% dan dilanjutkan dengan proses dialisis. Enzim yang telah dimurnikan ditentukan aktivitasnya pada kondisi optimum yaitu pada temperatur 60 °C, pH 8 dan waktu inkubasi 50 menit dengan menggunakan substrat xilan serta ditentukan kadar proteinnya dengan masing-masing tiga kali pengulangan. Setelah diperoleh xilanase dengan aktivitas spesifik tertinggi, diuji aktivitas xilanase dengan penambahan variasi konsentrasi ion Mg^{2+} . Data yang diperoleh dianalisa menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL).

3.4 Tahapan Kerja

1. Pembuatan tepung klobot jagung
2. Pembuatan media padat
3. Pembuatan media cair
4. Penanaman biakan murni *Bacillus* Sp.
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi enzim
7. Isolasi enzim xilanase dari biakan *Bacillus* Sp.
8. Fraksinasi xilanase dengan amonium sulfat
9. Dialisis enzim
10. Penentuan panjang gelombang maksimum kompleks *molybdenum blue* [$Mo_{156}O_{462}H_{14}(H_2O)_{70}$]
11. Pembuatan kurva standar kompleks *molybdenum blue*
12. Uji aktivitas enzim xilanase (Isil, 2005)
13. Uji kadar gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi
14. Pengukuran aktivitas xilanase
15. Pembuatan kurva standar kompleks Biuret-BSA
16. Penentuan kadar protein xilanase
17. Uji aktivitas xilanase dengan penambahan ion Mg^{2+}
18. Penentuan V_m dan K_M
19. Penentuan K_i

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Pembuatan tepung klobot jagung

Sebanyak 50 g klobot jagung disortasi kemudian dicuci dan dikeringkan di bawah terik matahari. Setelah kering, klobot jagung tersebut dipotong kecil-kecil lebih kurang 0,5 cm, dan diblender. Kemudian, klobot jagung yang telah halus disaring dengan saringan 150 mesh. Klobot jagung yang lolos dari saringan tersebut digunakan sebagai induser.

3.5.2 Pembuatan media padat

Media padat yang digunakan adalah *Nutrient Agar (NA)* Adapun pembuatan Nutrient Agar adalah sebagai berikut: ditimbang tepung agar sebanyak 4 g kemudian ditambahkan 1 g pepton dan 0,6 g *meat extract*. Selanjutnya ditambahkan 200 mL aquades lalu diaduk sampai larut. Setelah itu, larutan agar tersebut dipipet sebanyak 4 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas. Kemudian diautoklaf pada temperatur 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. NA yang telah steril dikeluarkan dari autoklaf dan diletakkan dalam posisi miring di atas meja, bila agar sudah memadat maka disimpan di dalam kulkas.

3.5.3 Pembuatan media cair

Ditimbang 6 g NaCl, 6 g glukosa, 6 g pepton, 6 g *yeast extract*, dan 6 g tepung klobot jagung, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker dan ditambahkan akuades hingga 1000 mL menggunakan botol semprot. Setelah itu larutan diatur pada pH 7 dengan penambahan NaOH 5N. Campuran diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Kemudian campuran dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, lalu mulut erlenmeyer ditutup dengan kapas dan disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.5.4 Penanaman biakan murni *Bacillus* sp.

Disiapkan jarum ose, kemudian dilakukan pemindahan secara aseptis *Bacillus* Sp. ke dalam media padat dan diinkubasi selama 7 - 14 hari pada temperatur 37 °C.

3.5.5 Pembuatan inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan dengan mengambil sel dari biakan murni *Bacillus* sp. yang telah berumur 7 - 14 hari dari 1 agar miring, kemudian disuspensikan dalam 10 mL akuades steril menggunakan pipet ukur. Suspensi dimasukkan dalam erlenmeyer 250 mL yang berisi 100 mL media cair steril. Selanjutnya diinkubasi dalam *shaker* hingga pertengahan fase logaritma (jam ke-14).

3.5.6 Produksi xilanase

Disiapkan 2 buah erlenmeyer 500 mL yang masing-masing berisi 250 mL media cair steril. kemudian ditambahkan secara aseptis 110 mL inokulum (prosedur 3.5.5). Selanjutnya media tersebut diinkubasi menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada temperatur kamar hingga awal fase stasioner (jam ke-24).

3.5.7 Isolasi ekstrak kasar xilanase dari biakan *Bacillus* sp.

Pada akhir masa inkubasi dari percobaan (3.5.6), xilanase diisolasi dengan sentrifugasi. Media cair sebanyak 150 mL ditambahkan 15 mL buffer fosfat pH 8 menggunakan pipet ukur dan disentrifuse pada temperatur 4 °C pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar xilanase.

3.5.8 Fraksinasi xilanase dengan amonium sulfat

Ekstrak kasar xilanase difraksinasi menggunakan amonium sulfat, dengan fraksi 0-40%, 40-80% dan 80-100%. Fraksi 0-40% dibuat dengan menambahkan 22,6 g amonium sulfat ke dalam 100 mL ekstrak kasar xilanase sedikit demi sedikit sambil diaduk perlahan menggunakan pengaduk magnet hingga seluruh padatan amonium sulfat larut. Larutan didiamkan dalam lemari pendingin selama 30 menit. Setelah itu dilakukan sentrifuse dingin pada temperatur 4 °C pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Filtrat yang diperoleh dipisahkan dari endapannya. Endapan dilarutkan dengan 10 mL buffer fosfat 0,2 M pH 8. Filtrat sebanyak 100 mL dari pengendapan pertama ditambah dengan 26,3 g amonium sulfat dan diperlakukan seperti fraksi sebelumnya untuk memperoleh endapan fraksi 40-80%.

Kemudian 100 mL filtrat dari fraksi 40 -80% ditambah dengan 13,9 g amonium sulfat sehingga diperoleh fraksi 80-100%.

3.5.9 Dialisis enzim

Endapan dari fraksi 0 - 40, 40 - 80 dan 80 - 100% ditambahkan 10 mL buffer fosfat 0,2 M pH 8. Masing-masing endapan dimasukkan dalam membran selofan berbeda yang diikat kedua ujungnya agar tidak ada komponen enzim yang lolos. Selanjutnya, kantong selofan berisi enzim direndam dalam 500 mL buffer fosfat 0,2 M pH 8 dan diaduk perlahan dengan pengaduk magnet. Dialisis dilakukan sampai semua amonium sulfat terpisah dari xilanase murni, dengan penggantian larutan buffer fosfat perendam setiap 6 jam. Pengujian kandungan amonium sulfat dalam buffer asetat dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes BaCl_2 ke dalam 5 mL buffer fosfat yang digunakan untuk dialisis. Jika tidak terbentuk endapan, maka dialisis dihentikan. Dari hasil dialisis diperoleh fraksi-fraksi xilanase murni.

3.5.10 Penentuan panjang gelombang maksimum kompleks *molybdenum blue*

Dipipet larutan glukosa standar $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sebanyak 1 mL dengan pipet volume ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 1 mL air bebas reduktor dan 1 mL reagen Nelson, lalu dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit. Setelah itu didinginkan hingga mencapai temperatur kamar. Kemudian ditambah reagen Nelson sebanyak 1 mL, dikocok sampai semua endapan Cu_2O larut. Kemudian dipindah ke labu ukur 10 mL, diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas dan diukur absorbansinya pada interval panjang gelombang 500-800 nm dengan blanko yang berisi air bebas reduktor dan reagen.

3.5.11 Pembuatan kurva standar kompleks *molybdenum blue*

Disiapkan 8 buah tabung reaksi, masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa standar dengan konsentrasi 20, 30, 40, 50, 60, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Kemudian masing-masing tabung ditambah 1 mL air bebas reduktor dan 1 mL reagen Nelson dengan pipet ukur. Mulut tabung

ditutup dengan aluminium foil, dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen Somogyi dengan pipet ukur, dikocok dan didiamkan selama 2 menit. Larutan dipindah ke dalam labu ukur 10 mL, diencerkan dengan air bebas reduktor dan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Blanko yang digunakan diberi perlakuan sama dengan sampel, tetapi penambahan 1 mL larutan glukosa standar diganti dengan 1 mL air bebas reduktor.

3.5.12 Uji aktivitas xilanase (Isil, 2005)

Disiapkan 4 buah tabung reaksi, masing-masing diisi substrat xilan 0,3% (b/v) sebanyak 1 mL. Kemudian diinkubasi dalam penangas air pada temperatur 60 °C selama 15 menit. Kemudian berurutan pada tabung 1 – 4 ditambah xilanase kasar, xilanase fraksi 0 – 40, 40 – 80 dan 80 – 100% sebanyak 1 mL, buffer fosfat pH 8,0 sebanyak 1 mL. Ditambahkan 1 mL air bebas reduktor dengan pipet ukur pada masing-masing tabung dan diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 50 menit. Setelah itu, masing-masing tabung diinkubasi pada penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dalam air es hingga mencapai temperatur kamar. Kemudian dianalisis kadar gula pereduksi dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi.

3.5.13 Penentuan kadar gula pereduksi secara spektrofotometri dengan reagen dengan Nelson-Somogyi

Larutan uji dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 1 mL air bebas reduktor dan 1 mL reagen Nelson. Mulut tabung ditutup dengan aluminium foil, dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 50 menit dan didinginkan. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen Somogyi dengan pipet ukur, dikocok dan didiamkan selama 2 menit. Larutan dipindah ke dalam labu ukur 10 mL, diencerkan dengan air bebas reduktor dan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Blanko diperlakukan sama dengan sampel, tetapi enzim dimatikan aktivitasnya dengan cara memanaskan pada

penangas air mendidih selama 15 menit sebelum dicampur dengan substrat.

3.5.14 Pengukuran aktivitas xilanase

Aktivitas enzim xilanase dinyatakan dalam Unit/mL enzim. Satu Unit aktivitas enzim adalah banyaknya μg gula pereduksi yang dihasilkan oleh 1 mL enzim dalam setiap menit. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh ke dalam persamaan linier kurva standar gula pereduksi, kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut (Lehninger, 1997)

$$AE = \frac{x \cdot V \cdot fp}{p \cdot q}$$

di mana:

AE = aktivitas enzim ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$)

x = konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

V = volume total sampel tiap tabung (mL)

p = jumlah enzim (mL)

q = waktu reaksi (menit)

fp = faktor pengenceran

3.5.15 Pembuatan kurva standar kompleks biuret-BSA

Ditimbang sebanyak 0,5 g BSA, dilarutkan dengan akuades dan diencerkan hingga volumenya 50 mL menggunakan labu ukur sehingga diperoleh larutan stok BSA $10000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Larutan ini dipipet 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 mL, lalu masing-masing diencerkan menjadi 10 mL sehingga diperoleh larutan standar BSA dengan konsentrasi 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Masing-masing larutan standar dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 1 mL dan ditambah 4 mL pereaksi Biuret yang telah disiapkan dan dikocok hingga homogen lalu didiamkan selama 30 menit. Setelah itu masing-masing larutan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan larutan standar BSA $5000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pada panjang gelombang antara 500-600 nm, dimana panjang gelombang dengan nilai absorbansi terbesar lah yang digunakan sebagai panjang gelombang maksimum pengukuran.

Hasil pengukuran dari serangkaian larutan standar BSA tersebut dibuat persamaan regresi linear sehingga dihasilkan kurva standar BSA

3.5.16 Penentuan kadar protein xilanase

Penentuan kadar protein xilanase dilakukan dengan metode Biuret. Dipipet sebanyak 1 mL enzim xilanase dan 4 mL pereaksi Biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur 50 °C. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum BSA. Sebagai blanko digunakan campuran 1 mL buffer fosfat dan 4 mL pereaksi Biuret. Kadar protein xilanase ditentukan dengan memplotkan nilai absorbansi enzim terhadap kurva standar.

3.5.17 Uji aktivitas enzim xilanase dengan penambahan ion Mg^{2+}

Disiapkan 7 buah tabung reaksi, masing-masing diisi substrat xilan 0,3% (b/v) sebanyak 1 mL. Kemudian diinkubasi dalam penangas air pada temperatur 60 °C selama 15 menit. Kemudian ditambah xilanase yang mempunyai aktivitas spesifik tertinggi sebanyak 1 mL, buffer fosfat pH 8 sebanyak 1 mL. Pada tabung 1 ditambahkan 1 mL air bebas reduktor, untuk tabung 2 – 7 ditambahkan 1 mL $MgSO_4$ 4, 8, 16, 24, 32 dan 40 mM dengan pipet ukur dan diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 50 menit. Setelah itu, masing-masing tabung diinkubasi pada penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dalam air es hingga mencapai temperatur kamar. Kemudian dianalisis kadar gula pereduksi dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi.

3.5.18 Penentuan V_m dan K_M

Harga V_m dan K_M ditentukan melalui uji aktivitas enzim xilanase dengan substrat xilan pada pH 8, temperatur 60 °C dan waktu inkubasi 50 menit. Variasi konsentrasi substrat xilan sebesar 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5% (b/v).

3.5.19 Penentuan K_i

Harga K_i ditentukan melalui uji aktivitas enzim xilanase dengan variasi konsentrasi substrat xilan sebesar 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5% (b/v) pada pH 8, temperatur 60 °C dan waktu inkubasi 50 menit dengan penambahan 1 mL ion Mg^{2+} dengan konsentrasi 24 mM.

3.6 Analisa Data

Data mengenai aktivitas xilanase, kadar protein, aktivitas spesifik xilanase serta pengaruh konsentrasi ion Mg^{2+} terhadap aktivitas xilanase dianalisa menggunakan analisa ragam pola Rancangan Acak Lengkap (RAL) dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil 1 dan 5% (BNT)



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini mengkaji mengenai isolasi ekstrak kasar xilanase dari *Bacillus* sp. dengan induser tepung klobot jagung, fraksinasi xilanase, penentuan aktivitas spesifik xilanase, pengaruh penambahan ion Mg^{2+} terhadap aktivitas xilanase dan penentuan nilai parameter kinetika reaksi enzimatik yaitu V_m , K_M dan K_i .

4.1 Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase Dari *Bacillus* sp.

Diperoleh 140 mL ekstrak kasar xilanase dalam bentuk supernatan dari 150 mL media cair yang disentrifuse dengan penambahan buffer fosfat pH 8. Sentrifugasi pada 4 °C bertujuan untuk memisahkan komponen dalam median cair berdasarkan kelarutannya dalam air (polar). Penambahan buffer fosfat pH 8 bertujuan untuk meningkatkan kelarutan protein sehingga mempermudah dalam pemisahannya dari molekul-molekul lainnya yang tidak larut seperti sisa-sisa jaringan *Bacillus* sp. berupa lemak dan tepung klobot jagung yang digunakan sebagai induser. Selanjutnya ekstrak kasar xilanase difraksinasi menggunakan amonium sulfat.

4.2 Fraksinasi Xilanase

Ekstrak kasar xilanase difraksinasi menggunakan amonium sulfat dengan fraksi pengendapan 0 – 40, 40 – 80 dan 80 – 100% kejenuhan amonium sulfat. Metode pengendapan ini berdasarkan peristiwa kelarutan protein dalam larutan garam yang disebut dengan *salting out*. Ion-ion garam amonium sulfat akan berkompetisi dengan protein untuk menarik molekul air. Kelarutan ion-ion garam lebih besar dari pada protein sehingga ion garam akan menarik molekul air yang mensolvasi protein enzim sehingga kelarutan protein enzim akan semakin kecil dan mengendap. Dalam proses fraksinasi, bukan hanya protein xilanase yang terfraksinasi tetapi juga protein selain xilanase, seperti protease.

Masing-masing endapan xilanase ditambahkan buffer fosfat pH 8 dan selanjutnya didialisis dalam membran selofan yang bersifat

semipermeabel yang direndam dalam larutan buffer fosfat pH 8 yang sama. Prinsip dialisis adalah difusi garam amonium sulfat yang mempunyai ukuran yang relatif kecil dibanding dengan ukuran xilanase dari dalam membran selofan menuju larutan buffer fosfat pH 8 diluar membran selofan. Dialisis dihentikan bila semua garam amonium sulfat telah keluar dari membran selofan dengan mengujinya menggunakan larutan BaCl₂. Apabila dalam membran selofan masih terdapat amonium sulfat maka akan terbentuk endapan putih yaitu BaSO₄, sesuai reaksi :



Penggantian larutan buffer di luar membran selama beberapa kali agar konsentrasi garam amonium sulfat di dalam membran selofan berkurang hingga jumlah yang sangat kecil, ditandai dengan tidak terbentuknya endapan putih BaSO₄.

4.3 Penentuan Aktivitas Spesifik Xilanase

Xilanase fraksi 40 – 80% mempunyai aktivitas spesifik tertinggi, yaitu 7,4766 U.mg⁻¹ atau naik sebesar 1132% atau 11,3 kali dari aktivitas spesifik xilanase tanpa fraksinasi dan sekitar 2 kali aktivitas spesifik dari fraksi 0 – 40% dan 80 – 100%. Data lengkap ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Aktivitas Spesifik Xilanase pada Berbagai Fraksi

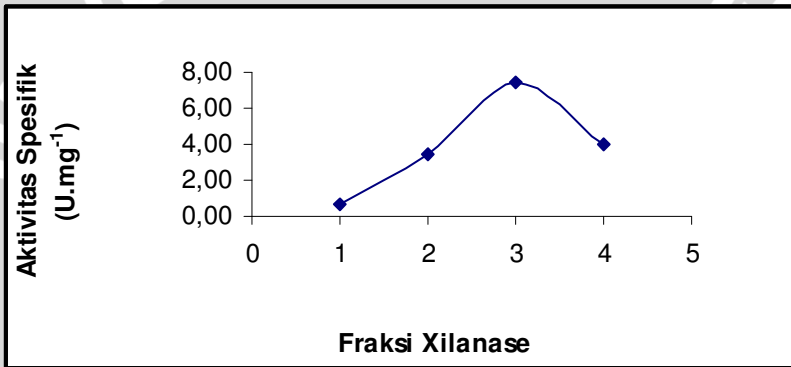
Fraksi	Aktivitas Enzim (µg.mL ⁻¹ .menit ⁻¹)	Kadar Protein (mg.mL ⁻¹)	Aktivitas Spesifik (U.mg ⁻¹)
Kasar	2,4121	3,6550	0,6599
0 - 40%	0,6932	0,2022	3,4283
40 - 80%	1,8071	0,2417	7,4766
80 - 100%	0,7076	0,1789	3,9553

Gambar 4.1 menunjukkan hubungan pengaruh fraksinasi terhadap aktivitas spesifik xilanase. Fraksi 40 – 80% merupakan fraksi xilanase yang mempunyai aktivitas spesifik tertinggi, hal ini menunjukkan pada fraksi 40 – 80% terdapat xilanase yang lebih

banyak dibandingkan dengan fraksi lainnya. Hal ini juga didukung dengan data analisa statistik menggunakan RAL.

Berdasarkan analisa statistik dengan rancangan acak lengkap (RAL), menunjukkan bahwa proses fraksinasi berpengaruh terhadap aktivitas spesifik xilanase yang ditunjukkan dengan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (data lengkap Tabel L.19.8)

Uji BNT pada lampiran 19 (Tabel L.19.9) menunjukkan bahwa fraksinasi mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap aktivitas spesifik xilanase pada fraksi 0 – 40, 40 – 80 dan 80 – 100% ($BNT_{hitung} > BNT_{1\%}$)



Gambar 4.1 Grafik aktivitas spesifik xilanase pada berbagai fraksi

Keterangan :

- Fraksi 1 = Xilanase kasar
- Fraksi 2 = Xilanase fraksi 0 – 40%
- Fraksi 3 = Xilanase fraksi 40 – 80%
- Fraksi 4 = Xilanase fraksi 80 – 100%

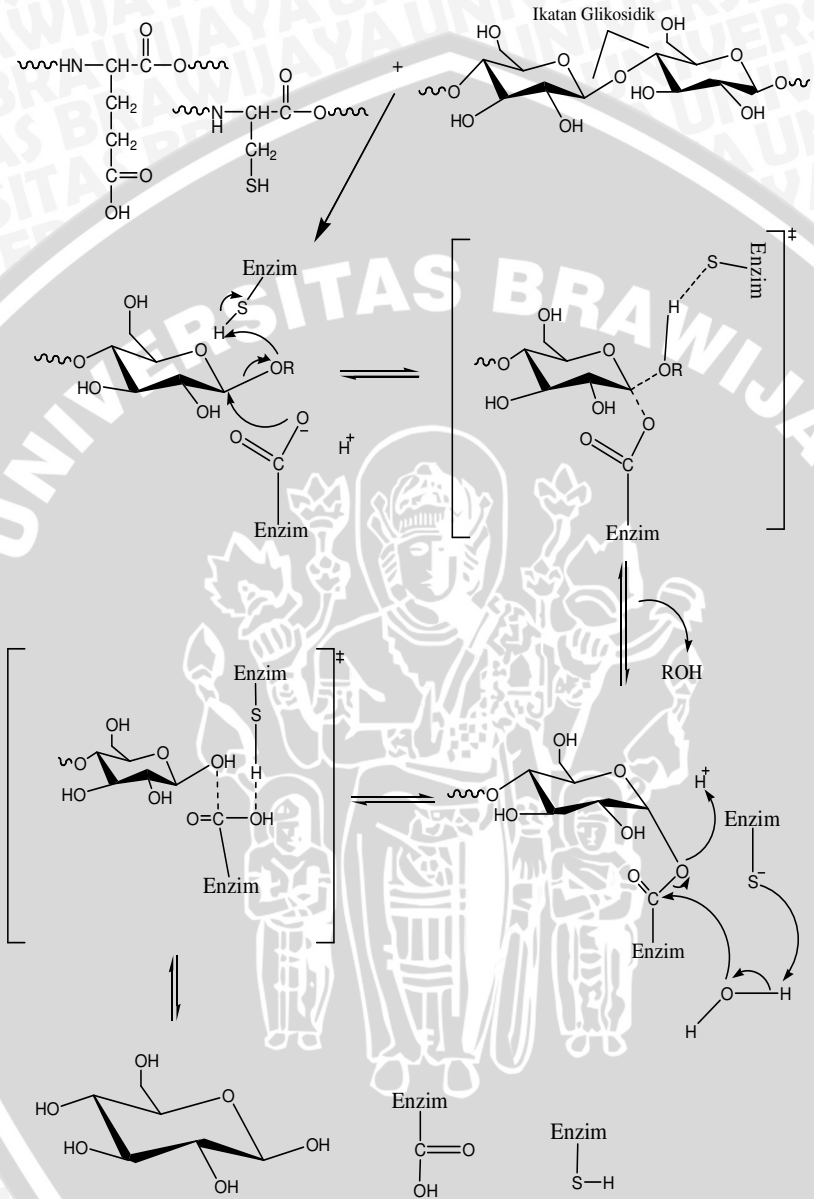
Aktivitas spesifik diperoleh dengan membandingkan nilai aktivitas xilanase pada berbagai fraksi dengan kadar proteinnya didalam larutan. Aktivitas spesifik dapat digunakan sebagai indikator untuk mengetahui tingkat kemurnian relatif suatu enzim dalam larutan. Semakin tinggi aktivitas spesifik suatu enzim, maka kemurnian enzim tersebut didalam larutan relatif besar (Lehninger, 1997)

Ekstrak kasar xilanase memiliki jumlah protein xilanase yang

paling besar, sehingga mampu menghasilkan gula pereduksi dalam jumlah yang lebih banyak. Sedangkan xilanase hasil fraksinasi mengalami penurunan kadar protein pada saat fraksinasi sehingga gula pereduksi yang dihasilkan juga berkurang. Kadar protein xilanase hasil fraksinasi relatif rendah dibandingkan xilanase kasar, hal ini disebabkan pada proses fraksinasi enzim, protein-protein akan terendapkan berdasarkan berat molekulnya. Semakin banyak protein xilanase maka semakin besar aktivitas xilanase. Adanya protease yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. akan memecah protein enzim sehingga menurunkan kadar protein xilanase selama proses fraksinasi.

Xilanase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa yang merupakan gula pereduksi. Aktivitas xilanase dapat diketahui dari banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan oleh xilanase, yang ditentukan melalui metode Nelson-Somogyi. Pada metode Nelson-Somogyi, gula pereduksi diubah menjadi kompleks *molybdenum blue* yang mempunyai panjang gelombang maksimum 745 nm (data lengkap pada Lampiran 8).

Gula pereduksi terbentuk melalui tahapan reaksi enzimatik (Gambar 4.2), yang melibatkan reaksi antara sisi aktif enzim dengan substrat xilan. Xilanase mempunyai gugus aktif yang dapat menghidrolisis xilan, yaitu gugus karboksil yang merupakan rantai samping dari asam amino jenis asam glutamat (Yong eok lee, *et al.*, 1993) serta mengandung gugus sulfhidril (-SH) yang merupakan rantai samping dari asam amino jenis sistein (Marsiati, 1995). Mekanisme reaksi yang terjadi melalui pembentukan intermediet kompleks enzim-substrat. Gugus fungsi pada rantai samping dalam bentuk ion karboksilat dari rantai samping asam amino jenis asam glutamat menyerang polimer xilan pada atom C1 yang mengikat atom O pada ikatan glikosidik. Penyerangan ini akan semakin mudah dengan adanya ion H^+ dari gugus sulfhidril (-SH) yang mampu menarik pasangan elektron bebas dari atom O yang digunakan untuk membentuk ikatan glikosidik. Kemudian terjadi proses hidrolisis oleh adanya H_2O , yang menyebabkan terjadi pemutusan ikatan enzim-substrat dan terbentuk monomer gula pereduksi.



Gambar 4.2 Mekanisme reaksi enzimatik xilanase dengan xilan

4.4 Pengaruh Penambahan Ion Mg^{2+} Terhadap Aktivitas Xilanase

Setelah didapatkan xilanase dengan aktivitas spesifik tertinggi yaitu pada fraksi 40 – 80%, maka dilakukan pengujian aktivitas xilanase dengan penambahan ion Mg^{2+} 0, 4, 8, 16, 24, 32 dan 40 mM, sehingga didalam larutan konsentrasi ion Mg^{2+} menjadi 0, 1, 2, 4, 6, 8 dan 10 mM.

Tabel 4.2 Aktivitas Xilanase Murni Fraksi 40 – 80% pada Variasi Konsentrasi Ion Mg^{2+}

Konsentrasi Ion Mg^{2+} (mM)	Konsentrasi Gula Pereduksi ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	Aktivitas xilanase ($\mu g \cdot mL^{-1} \cdot menit^{-1}$)	Persen Aktivitas (%)
0	2,2589	1,8071	100
1	2,3517	1,8813	104,11
2	2,3921	1,9137	105,90
4	3,3150	2,6520	146,76
6	2,2080	1,7664	97,75
8	2,1230	1,6984	93,99
10	2,0849	1,6679	92,30

Pada Tabel 4.2 menunjukkan bahwa ion Mg^{2+} berpengaruh terhadap aktivitas xilanase. Penambahan ion Mg^{2+} pada konsentrasi 1, 2, 4 mM, akan meningkatkan aktivitas xilanase sebesar 104,11%; 105,90% dan 146,76% dibandingkan dengan aktivitas xilanase tanpa penambahan ion Mg^{2+} . Sedangkan penambahan ion Mg^{2+} pada konsentrasi 6, 8 dan 10 mM akan menurunkan aktivitas xilanase sebesar 97,75%; 93,99% dan 92,30%.

Pada konsentrasi 1, 2 dan 4 mM, ion Mg^{2+} berfungsi meningkatkan aktivitas xilanase (aktivator) yang berperan dalam pembentukan intermediet (kompleks enzim-substrat). Ion Mg^{2+} merupakan asam Lewis yang mempunyai peran seperti ion H^+ pada sulfhidril yang membantu ion karboksilat dari residu asam amino jenis asam aspartat dalam menyerang polimer xilan pada atom C1 yang mengikat atom O pada ikatan glikosida, dimana ion Mg^{2+} akan

menarik pasangan elektron bebas dari atom O yang digunakan untuk membentuk ikatan glikosida. Kemudian terjadi proses hidrolisis oleh adanya H_2O , yang menyebabkan terjadi pemutusan ikatan enzim-substrat dan terbentuk monomer gula pereduksi. Pada konsentrasi ion Mg^{2+} 4mM, jumlah ion Mg^{2+} sebanding dengan jumlah elektron bebas yang mampu diikat pada reaksi enzimatik xilanase dengan xilan, sehingga aktivitas yang dihasilkan merupakan aktivitas tertinggi. Selain itu ion Mg^{2+} membantu dalam menstabilkan keadaan transisi pada reaksi antara enzim dengan substrat sebagai stabilisator panas (Lehninger, 1997). Pada konsentrasi 1 dan 2 mM, ion Mg^{2+} hanya menstabilkan keadaan transisi pada reaksi antara xilanase dengan substrat, stabilisator panas atau hanya berperan sebagai asam Lewis yang menarik pasangan elektron bebas dalam reaksi, sehingga peningkatan aktivitas xilanase tidak terlalu besar. Pada konsentrasi 4 mM, Ion Mg^{2+} dapat menstabilkan keadaan transisi pada reaksi antara xilanase dengan substrat, stabilisator panas sekaligus berperan sebagai asam Lewis yang menarik pasangan elektron bebas dalam reaksi.

Sedangkan pada konsentrasi 6, 8 dan 10 mM, ion Mg^{2+} menurunkan aktivitas xilanase (inhibitor kompetitif), dimana ion Mg^{2+} tidak lagi menarik pasangan elektron bebas pada reaksi enzimatik xilanase dengan xilan tetapi mengikat sisi aktif xilanase sehingga menghalangi xilan berikatan dengan xilanase dan tidak dihasilkan gula pereduksi. Aktivitas xilanase semakin menurun dengan kenaikan konsentrasi ion Mg^{2+} hal ini disebabkan semakin banyak ion Mg^{2+} yang menempati sisi aktif xilanase sehingga semakin sedikit xilan yang dapat terikat pada sisi aktif xilanase.

Berdasarkan analisa statistik dengan rancangan acak lengkap (RAL), menunjukkan bahwa ion Mg^{2+} berpengaruh terhadap aktivitas xilanase yang ditunjukkan dengan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (data lengkap Tabel L.19.11)

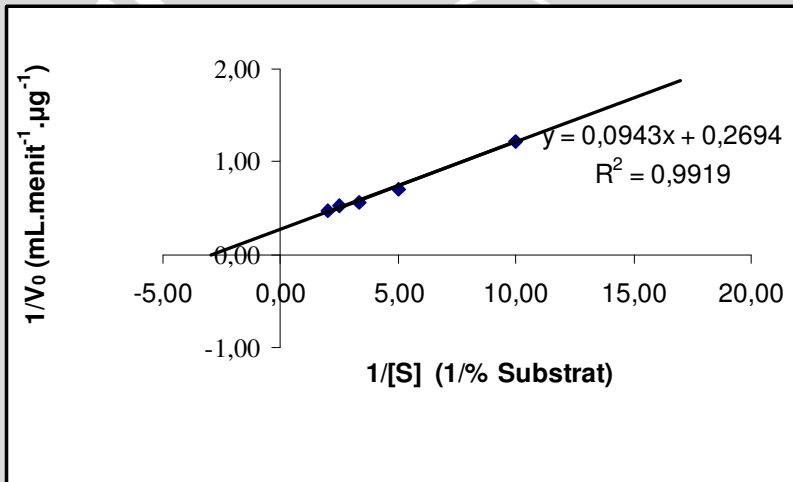
Uji BNT 1% pada lampiran 19 (Tabel L.19.12) menunjukkan bahwa pada konsentrasi ion Mg^{2+} 1 hingga 10 mM mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap aktivitas xilanase ($BNT_{hitung} > BNT_{1\%}$).

4.5 Penentuan Nilai Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis

Konsentrasi substrat merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase dilakukan dengan bervariasi konsentrasi substrat sebesar 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5% (b/v) yang direaksikan pada kondisi optimum.

Harga V_m dan K_M dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan *Lineweaver-Burk* sebagai berikut (Lehninger, 1997):

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_m [S]} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$



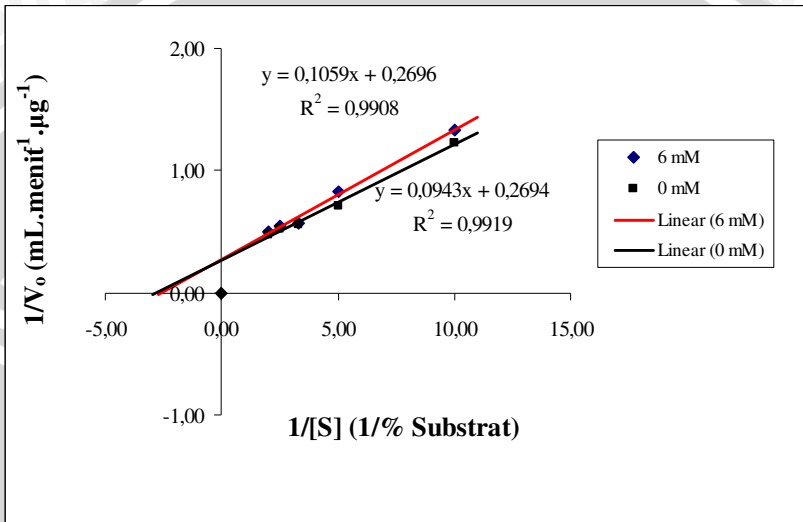
Gambar 4.3 Kurva hubungan $1/V_0$ dengan $1/[S]$ xilanase

Berdasarkan kurva hubungan antara $1/V_0$ dengan $1/[S]$ (Gambar 4.3), diperoleh intersep sebesar 0,2694 dan slope sebesar 0,0943, sehingga diperoleh nilai V_m sebesar 3,712 $\mu\text{g.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ dan K_M sebesar 0,35%.

K_M menggambarkan kesetimbangan disosiasi kompleks ES menjadi enzim dan substrat. Nilai K_M kecil berarti enzim mempunyai afinitas tinggi terhadap substrat maka kompleks ES sangat stabil, sehingga kesetimbangan reaksi ke arah kompleks ES. Apabila nilai

K_M besar berarti enzim mempunyai afinitas rendah terhadap substrat, sehingga kesetimbangan reaksi kearah E + S.

Konsentrasi ion Mg^{2+} yang menurunkan aktivitas xilanase perlu diketahui jenis inhibisinya dengan melihat kurva hubungan $1/V_0$ dengan $1/[S]$ pada konsentrasi ion Mg^{2+} 6 mM.



Gambar 4.4 Kurva jenis inhibisi ion Mg^{2+} terhadap aktivitas xilanase

Berdasarkan Gambar 4.4 pada xilanase pada konsentrasi ion Mg^{2+} 6 mM, diperoleh intersep sebesar 0,2696 dan slope 0,1059, sehingga nilai V_m sebesar $3,709 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ dan K_M sebesar 3,927% serta K_i sebesar 49,06 mM. Apabila dibandingkan dengan nilai V_m dan K_M xilanase tanpa penambahan ion Mg^{2+} , keduanya memiliki nilai V_m yang hampir sama tetapi nilai K_M xilanase pada konsentrasi ion Mg^{2+} 6 mM lebih besar dari pada xilanase tanpa penambahan ion Mg^{2+} yang menunjukkan bahwa enzim dengan 6 mM ion Mg^{2+} memiliki afinitas yang rendah terhadap xilan. Berdasarkan kurva tersebut jenis inhibisi yang disebabkan oleh penambahan ion Mg^{2+} adalah inhibisi kompetitif, dimana ion Mg^{2+} dan xilan bersaing untuk dapat berikatan dengan sisi aktif xilanase.

BAB V KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pada konsentrasi 1, 2, 4 mM, ion Mg^{2+} meningkatkan aktivitas xilanase (aktivator), aktivitas xilanase tertinggi dihasilkan pada konsentrasi ion Mg^{2+} sebesar 4 mM yaitu sebesar $2,6520 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ atau meningkat sebesar 146,76%. Pada konsentrasi 6, 8 dan 10 mM, ion Mg^{2+} menurunkan aktivitas xilanase (inhibitor).
2. Nilai V_m dan K_M yang diperoleh dari persamaan Lineweaver-Burk untuk enzim tanpa penambahan ion Mg^{2+} sebesar $3,712 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ dan 0,35%. Sedangkan untuk enzim dengan konsentrasi ion Mg^{2+} 6 mM, sebesar $3,709 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ dan 0,3927%, serta nilai K_i sebesar 49,06 mM dengan jenis hambatan, inhibisi kompetitif.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ion logam lainnya terhadap aktivitas xilanase dari *Bacillus* sp dengan induser tepung klobot jagung.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, R., 2004, Kimia Lingkungan, Penerbit ANDI, Yogyakarta
- Alexopoulos and Mins, 1979, Microbiology, Mc. Graw Hill, Inc., New York
- Cooper, T.G., 1997, The Tool of Biochemistry, John Wiley and Sons, Canada
- Chuzaemi S., Hartutik dan S. Susanto, 1983, Petunjuk Analisis Bahan Makanan Ternak, Bagian Ilmu Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, UB, Malang
- Daneault, C., C. Leduc and J.L. Valade, 1994, The Use of Xylanase In Kraft Pulp Bleaching, Crit. Rev. In Biotechnol 17(1):39-67, diakses tanggal 6 januari 2009
- Girindra, A., 1993, Biokimia 1, Gramedia, Jakarta
- Hairrudin, 2009, Kofaktor, <http://klinikdokterhairrudin.com>, diakses 30 Juni 2009
- Haltrich, D., B. Nidetzky, K.D. Kulbe, W. Steiner and S. Zupaneie, 1996, Production of Fungal Xylanase, <http://www.psu.ac.th/Presidentoffice>, diakses tanggal 6 Januari 2009
- Ima, N.P., 2008, Penapisan Tujuh Spesies *Bacillus* Penghasil Selulase dan Xilanase Disertai Analisis Pola Ekspresi Selulase dan Xilanase Ekstra Seluler dari Isolat *Bacillus* yang Terpilih, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, *Skripsi*, ITB, Bandung
- Isil, S. and N. Aksoz, 2005, Investigation of Factors Affecting Xilanase Activity from *Trichoderma Harzianum* 1073 D3, Brazilian Journal of Biology and Technology 48(2):1516-8913, diakses tanggal 6 januari 2009

- Judoamidjojo, R.M., E.E. Said dan Hartoto, 1992, Biokonversi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB, Bogor
- Khandeparkar, R. and N.B. Bhosle, 2002, Isolation, Purification and Characterization of The Xylanase Produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 When Grown in Solid-State Fermentation, National Institute of Oceanography, Dona Paula-403004, Goa
- Khandeparkar, R. and N.B. Bhosle, 2004, Purification and Characterization of Thermoalkalophilic Xilanase Isolated From The *Enterobacter* sp. MTCC 5112, National Institute of Oceanography, Dona Paula-403004, Goa
- Lehninger, L.A., 1997, Dasar-dasar Biokimia, Jil. 1, Alih Bahasa: Maggy Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta
- Marsiati, H., 1995, Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase dari Jamur *Volvariella Volvacea*, Jurnal Matematika dan Sains Suplemen G, F-MIPA ITB, Bandung
- Martin, D.W., P.A. Mayes and V.W. Rodwell, 1984, Harper Biokimia (Review of Biochemistry), Ed. 19, Alih Bahasa: Adji Darma dan Andreas Sanusi Kurniawan, EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta
- Mayasari, D., 2007, Pengaruh Sumber Xilan Terhadap Produksi Xilanase dari *Trichoderma Viride*, Skripsi, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, UB, Malang
- Muhtadi, D., N.S. Palupi dan M. Astawan, 1992, Enzim Dalam Industri Pangan, IPB, Bogor

- Nakamura, S., K. Wakabayashi, R. Nakai, R. Anono and K. Horikoshi., 1993, Purification and Same Properties of An Alkaline Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M1, Application and Environment, Microbiology 59(7): 2311-2316
- Palmer, T., 1991, Understanding Enzymes, Ed. 3, Horwood Limited Press, New York
- Poedjiadi, A., 1994, Dasar-dasar Biokimia, Universitas Indonesia Press, Jakarta
- Putranto, W.S., 2006, Pengaruh Kofaktor Logam Ca dan Mg Terhadap Aktivitas Hyalurodidase *Streptococcus Agalactie*, Universitas Padjadjaran press, Bandung
- Putri, M., 2009, Karakterisasi Xilanase dari *Bacillus* sp. Menggunakan Induser Klobot Jagung, *Skripsi*, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, UB, Malang
- Rahman, A., 1989, Pengantar Teknologi Fermentasi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas, Bioteknologi IPB, Bogor
- Richana, N., 2002, Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia, Jurnal AgroBio 5(1):29-36, diakses tanggal 6 Januari 2009
- Richana, N., T.T. Irawadi dan K. Syamsu, 2008, Isolasi Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase Serta Karakterisasi Enzimnya, Jurnal AgroBiogen 4(1):24-34, diakses tanggal 6 Januari 2009
- Ruiz-Arribas, A., J.M. Fernandez-Abalos, P. Sanches, A.L. Gardu and R.I. Santamaria, 1995, Over Production, Purification and Biochemical Characterization of Xylanase I (Xys 1) from *Streptomyces Halstedii* JM8, Application and Environment,

Microbiology, 61(6):2414-2419, diakses tanggal 6 Januari 2009

Satiawihardja, B.M.T., Suhartono dan A. Kusnidar, 1997, Mempelajari Pengaruh Lingkungan Kimiawi Terhadap Aktivitas dan Daya Tahan Panas Protease dari *Bacillus Pumilus* Y1, Buletin Teknologi Industri Pangan VIII(2):47-56

Simanjuntak, M.T. dan J. Silalahi, 2003, Enzim, USU press, Medan

Schlegel, H.G. dan K. Schmidt, 1994, Mikrobiologi Umum, Ed. 6, Alih Bahasa: R.M. Tedjo Baskoro, UGM Press, Yogyakarta

Underwood, A.L. dan R.A. Day, 1998, Analisa Kimia Kuantitatif, Edisi keempat, Alih Bahasa: R. Soendoro, Widaningsih W., Sri Rahadjeng S., Penerbit Erlangga, Jakarta

Voet, D. and J. Voet, 1990, Biochemistry, John Wiley and Sons, London

Vogel, A.I., 1994, A Text-Book of Macro and Semimicro Qualitative Inorganic Analysis, 5th Ed, Longmans, Green and Co Ltd, New York

Wirakartakusumah, M. A., 1987, Isolasi dan Karakterisasi Enzim dari *Aspergillus Niger* Serta Pemanfaatan dalam Pengembangan Industri Gula Cair, Laporan Penelitian, IPB, Bogor

Yong-Eok, L., S.E. Lowe, B. Henrissat and J. G. Zeikus, 1993, Charactrization of The Active Site and Thermostability Regions of Endoxylanase from *Thermoanaerobacterium Saccharolyticum* B6A-RI, Journal of Bacteriology 175(18):5890-5898, diakses tanggal 12 April 2007

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media Pertumbuhan

1.1 Media padat

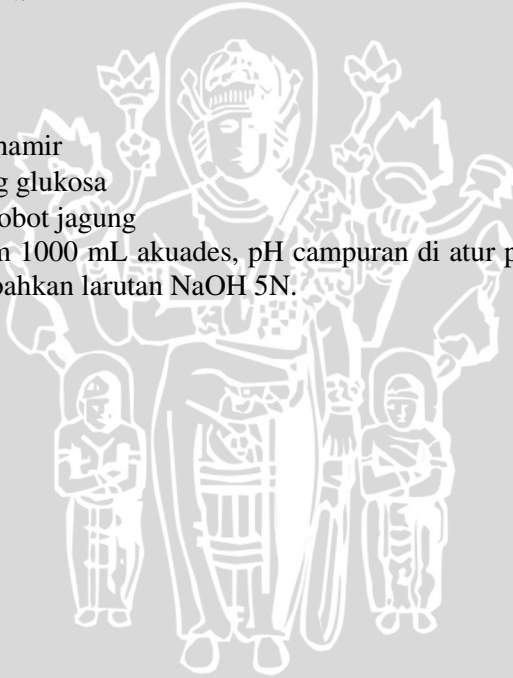
- 0,6 g *meat extract*
- 1 g pepton
- 4 g agar

dilarutkan dalam 200 mL akuades dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. pH campuran di atur pada pH 7 dengan menambahkan larutan NaOH 5N.

1.2 Media cair

- 6 g pepton
- 6 g ekstrak khamir
- 6 g NaCl; 3 g glukosa
- 5 g tepung klobot jagung

dilarutkan dalam 1000 mL akuades, pH campuran di atur pada pH 7 dengan menambahkan larutan NaOH 5N.



Lampiran 2. Preparasi Larutan

2.1 Pembuatan reagen

2.1.1 Pembuatan reagen Nelson

Reagen Nelson terdiri dari campuran Nelson A dan Nelson B dengan perbandingan 25:1.

Nelson A : dilarutkan 1,2 g KNa-tartrat, 2,4 g Na_2CO_3 , 1,60 g NaHCO_3 , 14,4 g Na_2SO_4 ke dalam 80 mL akuades dengan pemanasan.

Nelson B : dilarutkan 2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 18 g Na_2SO_4 ke dalam 100 mL akuades.

2.1.2 Pembuatan reagen Somogyi

Dilarutkan 25 g amonium molibdat dalam 450 mL akuades, setelah itu ditambahkan 25 mL H_2SO_4 pekat sambil diaduk-aduk. Dilarutkan pada gelas beaker lain, 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 25 mL akuades, kemudian larutan ini dituang ke dalam larutan pertama dan disimpan dalam botol berwarna gelap dan diinkubasi pada temperatur 37°C selama 48 jam.

2.1.3 Pembuatan reagen biuret

Ditimbang 0,15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 0,6 g KNa-tartrat ($\text{KNaC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dan dilarutkan dengan akuades dalam beaker gelas, kemudian ditambahkan larutan NaOH 10%, dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

2.2 Pembuatan air bebas reduktor

Akuades ditambah dengan KMnO_4 hingga berwarna merah (4 tetes), kemudian didestilasi, sehingga diperoleh air bebas reduktor.

2.3 Pembuatan larutan stok glukosa $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Ditimbang 0,1 g glukosa anhidrat dan dilarutkan dengan akuades dalam gelas beaker, kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

2.4 Pembuatan larutan standar gula pereduksi

Dipipet 10 mL larutan stok glukosa $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Kemudian larutan standar glukosa $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ tersebut dipipet berturut-turut 2, 3, 4, 5, 6 dan 7 mL, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan gula pereduksi dengan konsentrasi 20, 30, 40, 50, 60 dan $70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.5 Pembuatan larutan stok BSA $10.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Ditimbang 1 g BSA, dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 100 mL sampai semua larut, kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas.

2.6 Pembuatan larutan standar BSA

Disiapkan 9 buah labu ukur 10 mL, masing-masing diisi dengan larutan stok BSA $10.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sebanyak 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 mL, kemudian diencerkan hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan BSA standar 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 dan $9000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.7 Pembuatan larutan NaH_2PO_4 0,2 M

Berat molekul $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 120 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \times 0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \times 1 \text{ L} = 24 \text{ g}$. Larutan NaH_2PO_4 0,2 M dibuat dengan melarutkan 24 g NaH_2PO_4 dalam akuades hingga 1 L.

2.8 Pembuatan larutan Na_2HPO_4 0,2 M

Berat molekul $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 142 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \times 0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \times 1 \text{ L} = 28,4 \text{ g}$. Larutan Na_2HPO_4 0,2 M dibuat dengan melarutkan 28,4 g Na_2HPO_4 dalam akuades hingga 1 L.

2.9 Pembuatan larutan BaCl_2 0,2 M

Berat molekul $\text{BaCl}_2 = 208,34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \times 0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \times 0,025 \text{ L} = 1,04 \text{ g}$. Larutan BaCl_2 0,2 M dibuat dengan melarutkan 1,04 g BaCl_2 dengan sedikit akuades, dipindahkan ke labu ukur 25 mL, kemudian ditambah akuades hingga tanda batas.

2.10 Pembuatan substrat xilan 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 % (b/v)

Untuk pembuatan xilan 0,5% ditimbang 0,5 g xilan dan ditambahkan buffer fosfat pH 8 hingga 100 mL dalam labu ukur. Setelah itu dipipet sebanyak 20, 15, 10, 5 mL dan dipindahkan dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan larutan buffer fosfat pH 8,0 sampai tanda batas.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 3. Perhitungan harga pH buffer fosfat 0,2 M

Larutan buffer fosfat pH 8 dibuat dengan cara mencampur larutan NaH_2PO_4 dan larutan Na_2HPO_4 (Lampiran 2.7 dan 2.8), menggunakan persamaan berikut :

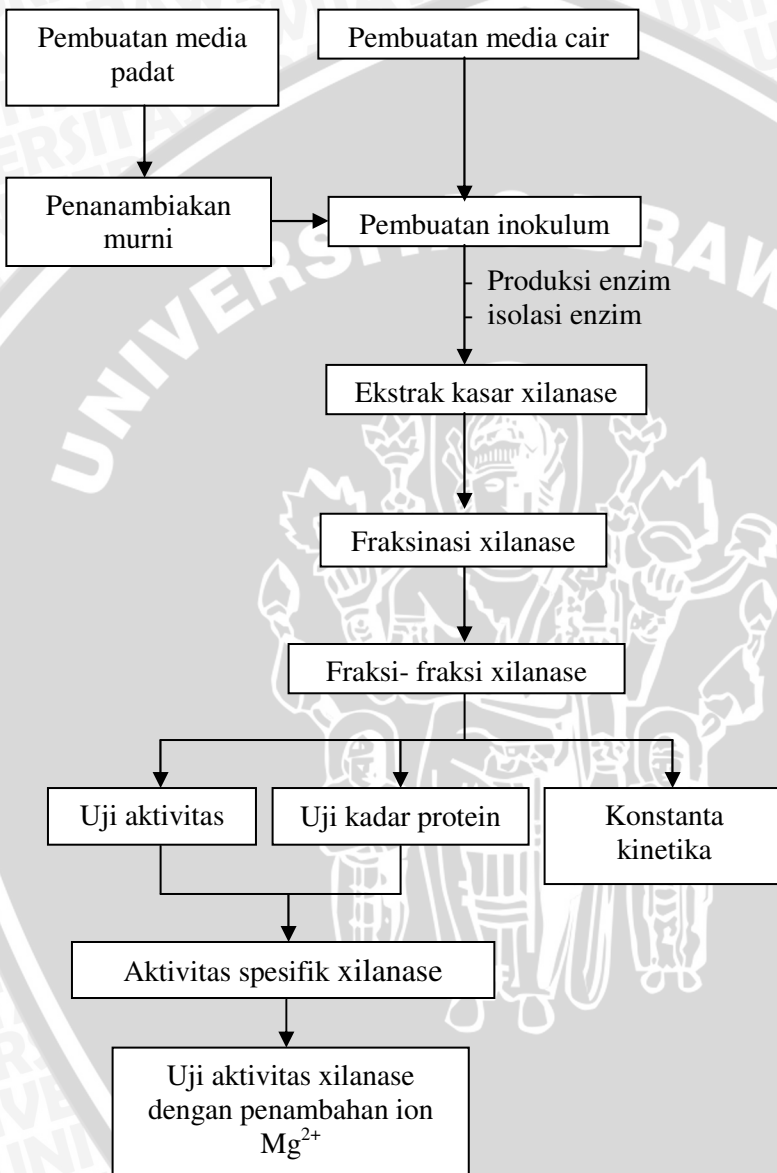
$$\text{pH} = \text{pKa} - \log \frac{\text{NaH}_2\text{PO}_4}{\text{Na}_2\text{HPO}_4}$$

Sebagai contoh, untuk membuat larutan buffer fosfat pH 8,0, maka 50 mL larutan NaH_2PO_4 ditambah dengan 315.48 mL larutan Na_2HPO_4 dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\begin{aligned}\text{pH} &= \text{pKa} - \log \frac{\text{NaH}_2\text{PO}_4}{\text{Na}_2\text{HPO}_4} \\ 8 &= 7,2 - \log \frac{50 \text{ mL} \times 0,2 \text{ M}}{V \text{ mL} \times 0,2 \text{ M}} \\ 8 &= 7,2 - \log \frac{50}{V} \\ V &= 315,48 \text{ mL}\end{aligned}$$

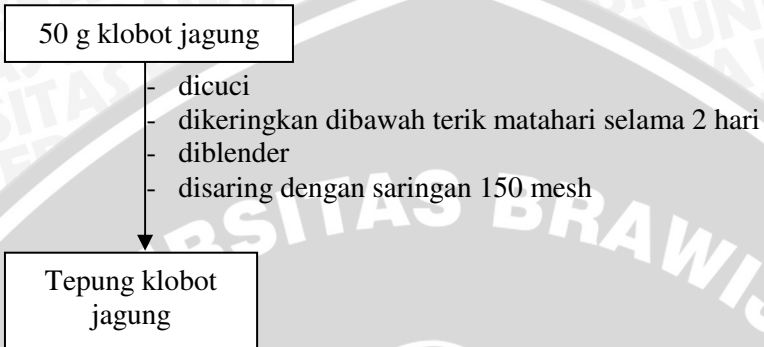
Kemudian larutan buffer fosfat tersebut diukur pH-nya dengan menggunakan pH meter.

Lampiran 4. Tahapan Kerja



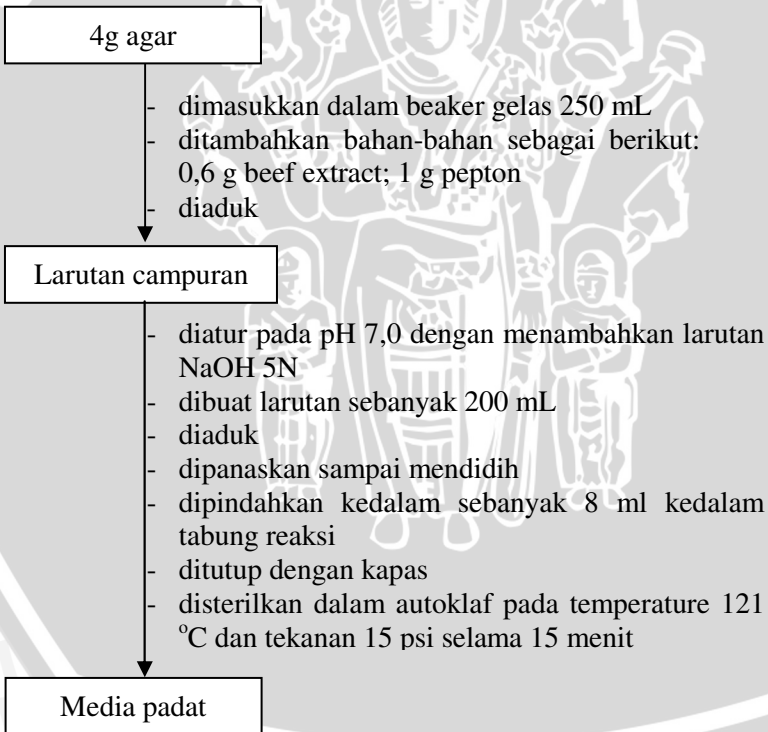
Lampiran 5. Skema Kerja

5.1 Pembuatan Tepung Klobot Jagung



5.2 Pembuatan Media

5.2.1 Media padat



5.2.2 Media cair

6 g Tepung klobot jagung

- dimasukkan dalam beaker glass 1000 mL
- ditambahkan bahan-bahan sebagai berikut: 6 g, pepton, 6 g ekstrak khamir; 6 g NaCl dan 6 g glukosa
- diaduk

Larutan campuran

- diatur pada pH 7,0 dengan menambahkan larutan NaOH 5N
- dibuat larutan sebanyak 1000 mL
- diaduk
- dipanaskan sampai mendidih
- dipindahkan kedalam sebanyak 100 ml kedalam erlenmeyer 250 mL dan sebanyak 250 mL kedalam erlenmeyer 500 mL
- ditutup dengan kapas
- disterilkan dalam autoklaf pada temperature

Media cair

5.3 Penanambian Murni *Bacillus Sp.*

Kultur murni *Bacillus Sp.*

- dipindahkan dengan jarum ose secara aseptis ke dalam media padat
- ditutup dengan kapas
- diinkubasi selama 7 - 14 hari pada temperatur 37 °C

Hasil biakan *Baillus sp.*

5.4 Pembuatan Inokulum

Hasil biakan *Bacillus* Sp.

- disuspensikan dalam 10 mL akuades steril
- dimasukan ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 mL media cair
- diinkubasi pada temperatur kamar sampai pertengahan fase logaritma

Larutan inokulum

5.5 Produksi Enzim

Larutan inokulum

- dipindah secara aseptis ke dalam erlenmeyer yang berisi 250 mL media cair steril
- diinkubasi dalam shaker pada temperatur kamar sampai mencapai awal fase stasioner

Hasil produksi enzim

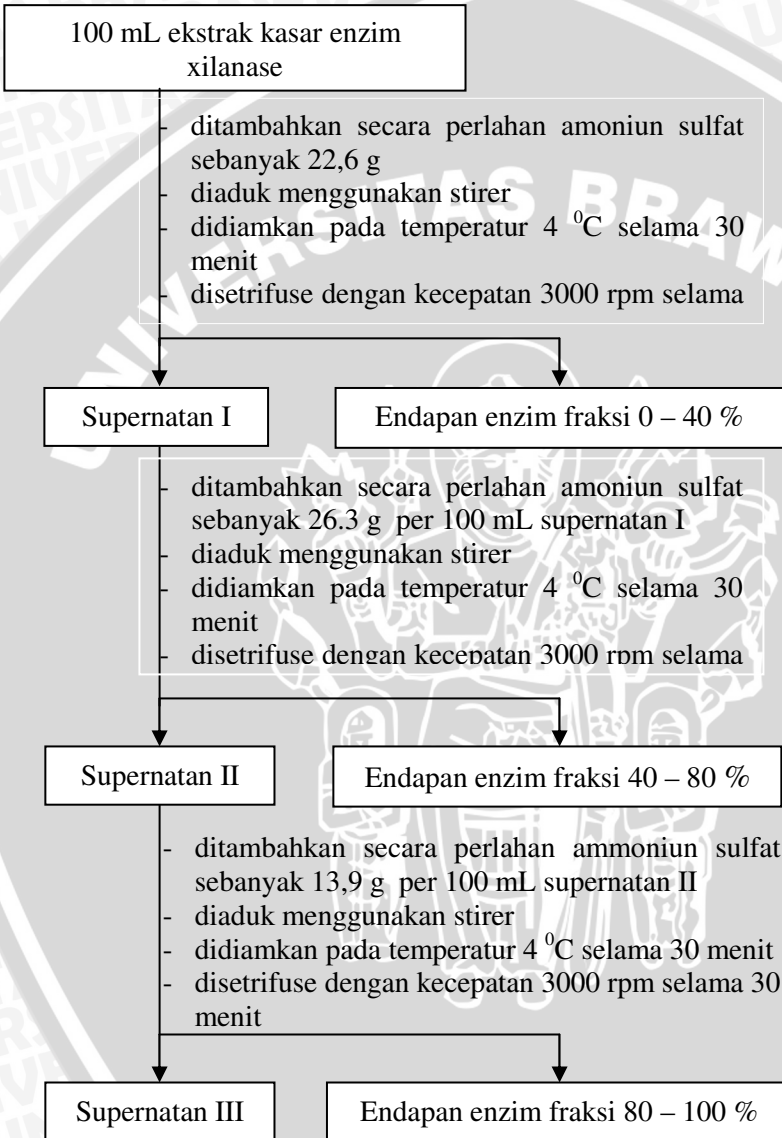
5.6 Isolasi Enzim

Hasil produksi enzim

- diambil sebanyak 150 mL hasil produksi enzim
- ditambahkan 15,0 mL buffer fosfat pH 8,0 pada erlenmeyer
- disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm pada temperatur 4 °C selama 30 menit

Ekstrak kasar enzim xilanase

5.7 Fraksinasi Xilanase Menggunakan Amonium Sulfat



5.8 Dialisis Enzim

Endapan enzim fraksi 0 – 40%, 40 – 80%, 80 – 100%

- dilarutkan masing-masing fraksi dalam 10 mL buffer fosfat 0,2 M pH 8
- dimasukkan masing-masing fraksi kedalam kantong selofan berbeda dan di ikat ujungnya

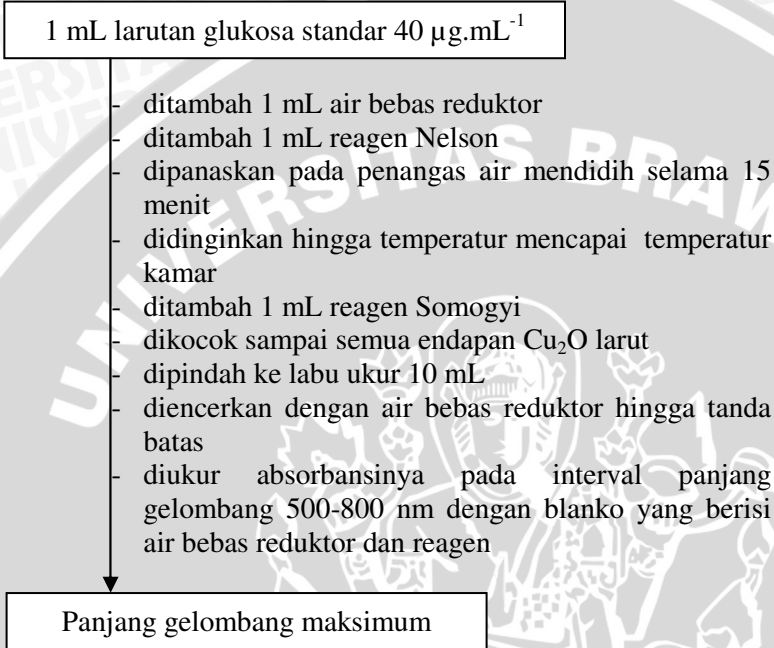
Enzim dalam kantong selofan

- direndam dalam 500 mL buffer fosfat 0,2 M pH 8,0 pada beaker yang didinginkan dalam wadah yang berisi es
- diaduk dengan pengaduk magnet
- dilakukan pergantian buffer perendaman setiap 6 jam hingga tidak terdapat endapan bila di uji dengan BaCl_2

Fraksi enzim murni

5.9 Tahap Analisis Gula Pereduksi

5.9.1 Penentuan panjang gelombang maksimum *Molybdenum Blue*



5.9.2 Pembuatan kurva standar *Molybdenum Blue*

1 mL Larutan standar glukosa
0, 20, 30, 40, 50, 60, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

- ditambah 1 mL air bebas reduktor
- ditambah 1 mL reagen Nelson
- dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan hingga temperatur mencapai temperatur kamar
- ditambah 1 mL reagen Somogyi
- dikocok sampai semua endapan Cu_2O larut
- dipindah ke labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas
- diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan blanko yang berisi air bebas reduktor dan reagen

Kurva standar

5.9.3 Uji aktivitas xilanase

0,3% Substrat xilan (b/v)

- dipipet masing-masing sebanyak 1 mL ke dalam 4 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit
- ditambahkan 1,0 mL xilanase kasar pada tabung ke-1, xilanase fraksi 0 – 40% pada tabung ke-2, xilanase fraksi 40 – 80% pada tabung ke-3 dan xilanase fraksi 80 – 100 pada tabung ke-4
- ditambah buffer fosfat pH 8,0 sebanyak 1,0 mL
- ditambahkan 1 mL air bebas reduktor
- diinkubasi pada temperatur $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 50 menit
- dimasukkan masing-masing tabung dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar

Larutan uji

5.8.4 Analisis kadar gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi

Larutan uji

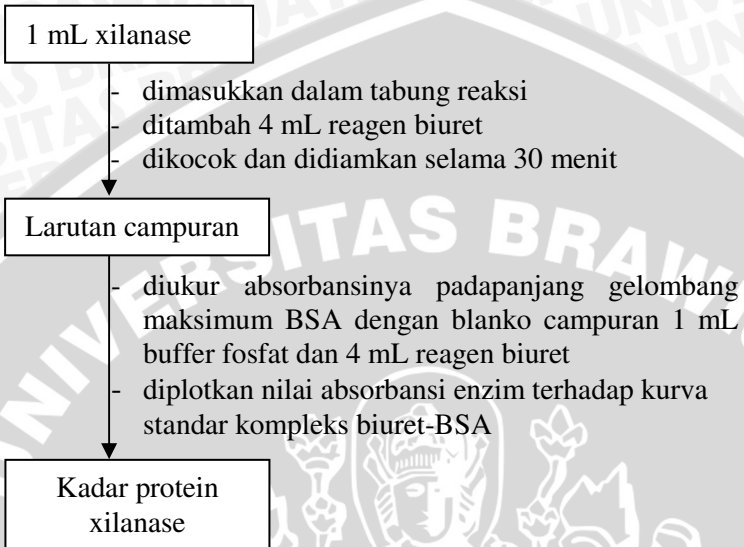
- dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi
- ditambah 1 mL air bebas reduktor
- ditambah 1 mL reagen Nelson
- dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan hingga temperatur mencapai temperatur kamar
- ditambah 1,0 mL reagen Somogyi
- dikocok sampai semua endapan Cu_2O larut
- dipindah ke labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas
- diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan blanko diberi perlakuan yang sama dengan sampel tetapi ekstrak kasar xilanase dimatikan aktivitasnya dengan pemanasan pada 100°C

Data

5.10 Pembuatan Kurva Standar Kompleks Biuret-BSA



5.11 Penentuan Kadar Protein Xilanase



5.12 Uji Aktivitas Enzim Xilanase Dengan Penambahan Ion Mg^{2+}

0,3 % Substrat xilan (b/v)

- dipipet masing-masing sebanyak 1 mL ke dalam 7 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit
- ditambahkan 1 mL xilanase yang mempunyai aktivitas spesifik tertinggi
- ditambah buffer fosfat pH 8,0 sebanyak 1,0 mL
- ditambahkan 1 mL air bebas reduktor pada tabung 1, pada tabung 2 – 7 ditambahkan 1 mL $MgSO_4$ 4, 8, 16, 24, 32, 40 mM
- diinkubasi pada temperatur $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 50 menit
- dimasukkan masing-masing tabung dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar

Larutan uji

5.13 Penentuan Konstanta Kinetika

5.13.1 Penentuan nilai V_m dan K_M

Substrat xilan
0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5% (b/v)

- dipipet masing-masing sebanyak 1 mL ke dalam 5 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada 60 °C selama 15 menit
- ditambahkan 1 mL enzim xilanase
- ditambah 1 mL buffer fosfat pH 8
- diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 50 menit
- dimasukkan masing-masing tabung dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es hingga temperatur kamar
- dianalisis kadar gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi

Data

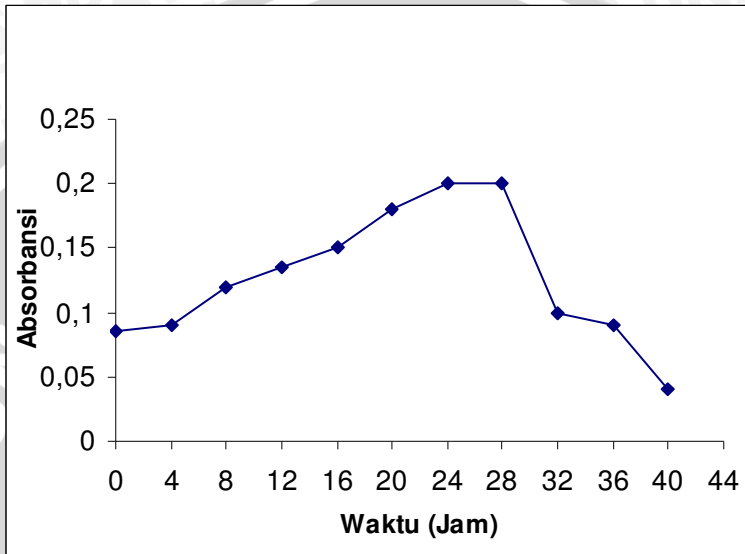
5.13.2 Penentuan nilai K_i

Substrat xilan
(0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5)% (b/v)

- dipipet masing-masing sebanyak 1 mL ke dalam 5 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada 60 °C selama 15 menit
- ditambahkan 1 mL enzim xilanase
- ditambah 1 mL buffer fosfat pH 8
- ditambahkan 1 mL $MgSO_4$ 6 mM
- diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 50 menit
- dimasukkan masing-masing tabung dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar
- dianalisis kadar gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi

Larutan uji

Lampiran 6. Kurva Pertumbuhan *Bacillus* sp.



Gambar L.6 Kurva pertumbuhan *Bacillus* sp.

Lampiran 7. Fraksinasi Menggunakan Amonium Sulfat

Banyaknya amonium sulfat yang ditambahkan dalam 100 mL ekstrak kasar xilanase dapat dilihat pada Tabel L.7.

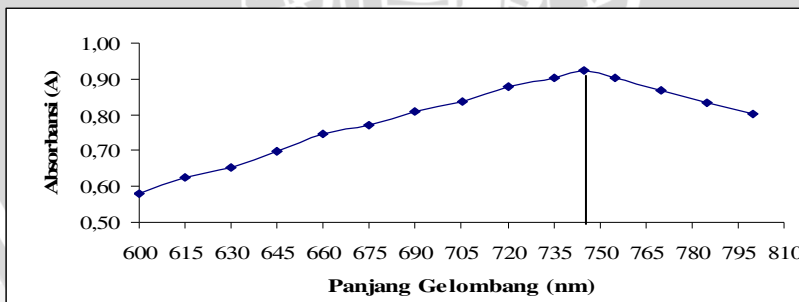
Tabel L.7 Tabel Amonium Sulfat

Inat %	Final Concentration (% saturation at 0 C) of ammonium sulfate solution																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.2	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25	0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2	
30	0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8		
35	0	2.9	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.8	29.6	32.9	36.9	41.0	45.3			
40	0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	26.3	29.6	33.5	37.6	41.8				
45	0	3.0	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3					
50	0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.5	26.8	30.8	34.8						
55	0	3.1	6.1	9.3	12.7	16.1	20.1	23.5	27.3	31.2							
60	0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.8	20.1	23.9	27.9								
65	0	3.2	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4									
70	0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9										
75	0	3.3	6.6	10.1	13.7	17.4											
80	0	3.4	6.7	10.3	13.9												
85	0	3.4	6.8	10.5													
90	0	3.4	7.0														
95	0	3.5															
100	0																

Lampiran 8. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kompleks *Molybdenum Blue*

Tabel L.8 Data Absorbansi Kompleks *Molybdenum Blue* pada $\lambda = 600 - 800 \text{ nm}$

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	Rata-rata
600	0,5752	0,5831	0,5768	0,5784
615	0,6288	0,6244	0,6261	0,6264
630	0,6491	0,6550	0,6502	0,6514
645	0,7011	0,6973	0,6998	0,6994
660	0,7458	0,7429	0,7487	0,7458
675	0,7710	0,7689	0,7692	0,7697
690	0,8041	0,8160	0,8111	0,8104
705	0,8396	0,8338	0,8360	0,8365
720	0,8763	0,8819	0,8790	0,8791
735	0,9011	0,9048	0,9032	0,9030
745	0,9252	0,9216	0,9240	0,9236
755	0,8880	0,9136	0,9018	0,9011
770	0,8731	0,8658	0,8679	0,8689
785	0,8298	0,8336	0,8322	0,8319
800	0,8046	0,7988	0,8015	0,8016

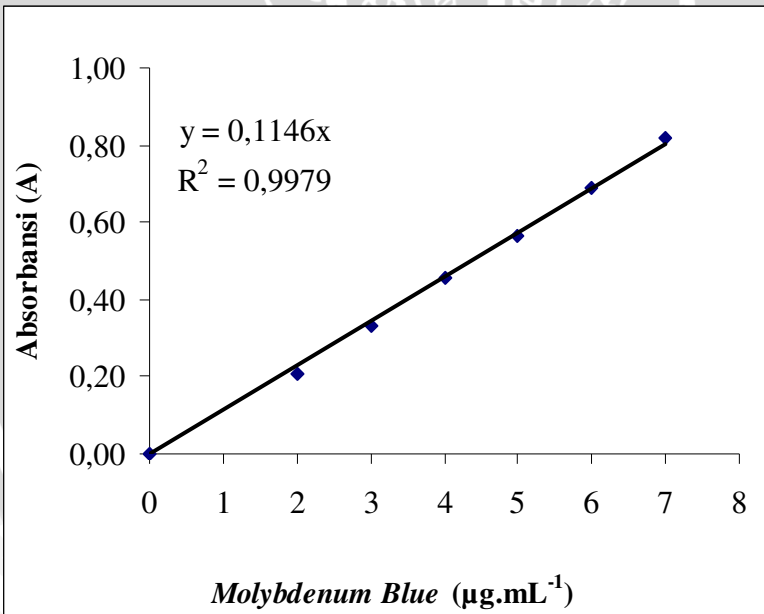


Gambar L.8 Kurva panjang gelombang maksimum kompleks *molybdenum blue*

Lampiran 9. Pembuatan Kurva Standar Kompleks *Molybdenum Blue*

Tabel L.9 Data Absorbansi Kurva Standar Kompleks *Molybdenum Blue* pada $\lambda = 745 \text{ nm}$

Glukosa ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	Rata-rata
0	0	0	0	0
2	0,1971	0,1936	0,2344	0,2084
3	0,3129	0,3171	0,3620	0,3307
4	0,4927	0,4020	0,4711	0,4553
5	0,6212	0,5273	0,5484	0,5656
6	0,7365	0,6750	0,6541	0,6885
7	0,9336	0,7490	0,7775	0,8200

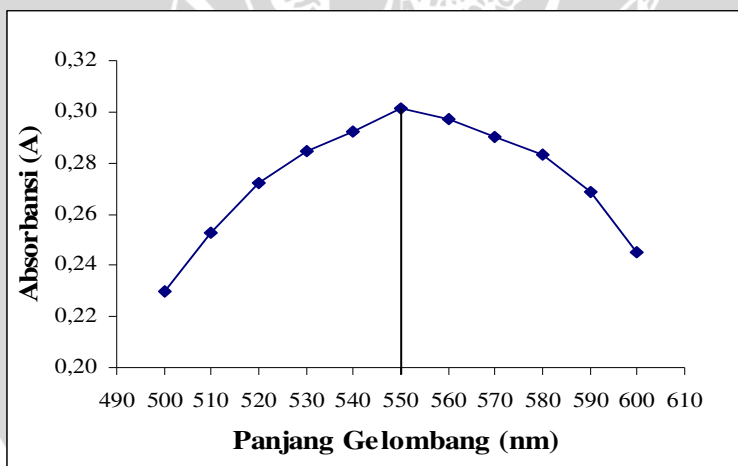


Gambar L.9 Kurva standar kompleks *Molybdenum Blue* pada $\lambda = 745 \text{ nm}$

Lampiran 10. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kompleks Biuret-BSA

Tabel L.10 Data Absorbansi Kompleks Biuret-BSA pada $\lambda = 500 - 600 \text{ nm}$

Panjang Gelombang	Absorbansi		Rata-rata
	A1	A2	
500	0,2311	0,2292	0,2302
510	0,2523	0,2526	0,2525
520	0,2722	0,2720	0,2721
530	0,2845	0,2848	0,2847
540	0,2921	0,2928	0,2925
550	0,3018	0,3014	0,3016
560	0,2974	0,2971	0,2973
570	0,2923	0,2887	0,2905
580	0,2848	0,2810	0,2829
590	0,2689	0,2681	0,2685
600	0,2446	0,2449	0,2448

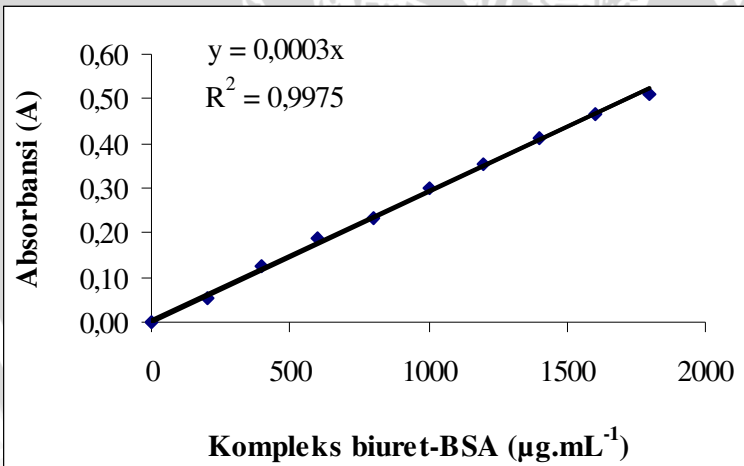


Gambar L.10 Kurva panjang gelombang maksimum kompleks biuret-BSA

Lampiran 11. Kurva Standar Kompleks Biuret-BSA

Tabel L.11 Data Absorbansi Kurva Standar Kompleks Biuret-BSA pada $\lambda = 550 \text{ nm}$

BSA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	Rata-rata
0	0	0	0	0
200	0,0554	0,0519	0,0528	0,0534
400	0,1257	0,1251	0,1252	0,1253
600	0,1872	0,1868	0,1857	0,1866
800	0,2378	0,2297	0,2338	0,2338
1000	0,3011	0,3017	0,3030	0,3019
1200	0,3566	0,3564	0,3541	0,3557
1400	0,4152	0,4093	0,4133	0,4126
1600	0,4695	0,4566	0,4644	0,4635
1800	0,5094	0,5060	0,5104	0,5086



Gambar L.11 Kurva standar kompleks biuret-BSA

Lampiran 12. Kadar Protein Xilanase

Tabel L.12.1 Data Absorbansi Kadar Protein Xilanase Berbagai Fraksi pada $\lambda = 550$ nm

Fraksi	Absorbansi			
	A1	A2	A3	Rata- rata
Kasar	0,2194	0,2189	0,2196	0,2193
0 - 40%	0,0118	0,0124	0,0122	0,0121
40 – 80%	0,0141	0,0145	0,0149	0,0145
80 – 100%	0,0104	0,0112	0,0106	0,0107

Tabel L.12.2 Kadar Protein Xilanase Berbagai Fraksi

Fraksi	Kadar Protein (mg.mL^{-1})
Kasar	3,6550
0 - 40%	0,2022
40 – 80%	0,2417
80 – 100%	0,1789

Lampiran 13. Aktivitas Xilanase pada Berbagai Fraksi

Tabel L.13.1 Data Absorbansi Xilanase Berbagai Fraksi pada $\lambda = 745 \text{ nm}$

Fraksi	Absorbansi			
	A1	A2	A3	Rata-rata
Kasar	0,3405	0,3462	0,3499	0,3455
0 – 40 %	0,1171	0,1177	0,1166	0,1171
40 – 80%	0,2572	0,2586	0,2608	0,2589
80 – 100%	0,102	0,1016	0,1005	0,1014

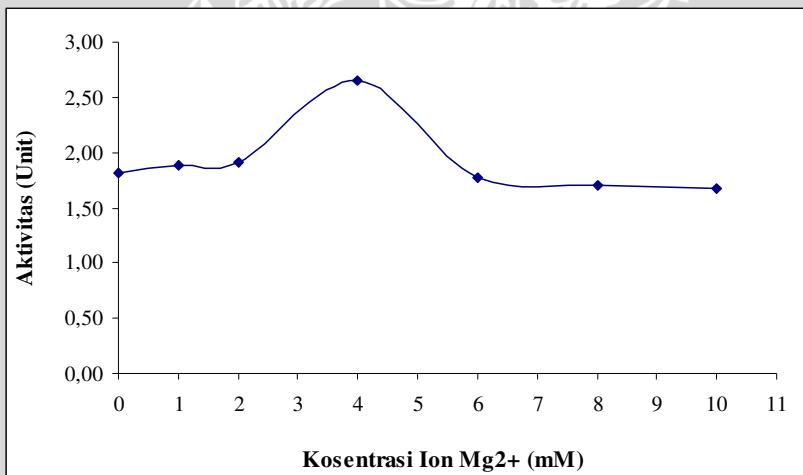
Tabel L.13.2 Data Aktivitas Xilanase Berbagai Fraksi

Fraksi	Konsentrasi Gula Pereduksi ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Aktivitas Enzim ($\mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$)
Kasar	3,0151	2,4121 \pm 0,0328
0 – 40 %	1,0221	0,6932 \pm 0,0004
40 – 80%	2,2589	1,8071 \pm 0,0013
80 – 100%	0,8845	0,7076 \pm 0,0005

Lampiran 14. Aktivitas Xilanase Fraksi 40 – 80% pada Variasi Konsentrasi Ion Mg^{2+}

Tabel L. 14 Absorbansi Xilanase Fraksi 40 – 80% Dengan Variasi Konsentrasi Ion Mg^{2+} pada $\lambda = 745 \text{ nm}$

Konsentrasi Ion Mg^{2+}	Absorbansi			
	A1	A2	A3	Rata-rata
0	0,2572	0,2586	0,2608	0,2589
1	0,2688	0,2692	0,2705	0,2695
2	0,2737	0,2746	0,2741	0,2741
4	0,3775	0,3783	0,3839	0,3799
6	0,2544	0,2510	0,2537	0,2530
8	0,2434	0,2428	0,2437	0,2433
10	0,2388	0,2394	0,2386	0,2389



Gambar.L.14 Kurva aktivitas xilanase fraksi 40 – 80% pada variasi konsentrasi Ion Mg^{2+}

Lampiran 15. Pengukuran Konstanta Kinetika v_m , K_M dan K_i

Tabel L.15.1 Data Absorbansi Xilanase Fraksi 40 – 80% Dengan Variasi Konsentrasi Substrat pada $\lambda = 745 \text{ nm}$

[S] (%)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	Rata-rata
0	0	0	0	0
0,1	0,1173	0,1167	0,1163	0,1168
0,2	0,2006	0,2013	0,2026	0,2015
0,3	0,2572	0,2586	0,2608	0,2589
0,4	0,2702	0,2705	0,2732	0,2713
0,5	0,2975	0,2986	0,2989	0,2983

Tabel L.15.2 Data Aktivitas Xilanase Fraksi 40 – 80% pada Variasi Konsentrasi Substrat

[S] (%)	Konsentrasi Gula Pereduksi ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Aktivitas Enzim (v_o) ($\mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$)	$1/[S]$	$1/v_o$
0	0,0000	0,0000	0,00	0,00
0,1	1,0189	0,8151	10,00	1,23
0,2	1,7583	1,4076	5,00	0,71
0,3	2,2589	1,8071	3,33	0,55
0,4	2,3674	1,8949	2,50	0,53
0,5	2,6033	2,0836	2,00	0,48

Tabel L.15.3 Absorbansi Xilanase Fraksi 40 – 80% Dengan Konsentrasi Ion Mg^{2+} 6 mM pada $\lambda = 745$ nm

[S] (%)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	Rata-rata
0	0	0	0	0
0,1	0,1077	0,1072	0,1089	0,1079
0,2	0,1730	0,1742	0,1737	0,1736
0,3	0,2544	0,2510	0,2537	0,2530
0,4	0,2612	0,2617	0,2632	0,2620
0,5	0,2854	0,2866	0,2867	0,2862

Tabel L.15.4 Aktivitas Xilanase Fraksi 40 – 80% Dengan Konsentrasi ion Mg^{2+} 6 mM

[S] (%)	Konsentrasi Gula Pereduksi ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	Aktivitas Enzim (v_o) ($\mu g \cdot mL^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$)	1/[S]	1/ v_o
0	0,0000	0,0000	0,00	0,00
0,1	0,9418	0,7535	10,00	1,33
0,2	1,5151	1,2121	5,00	0,83
0,3	2,2080	1,7664	3,33	0,57
0,4	2,2865	1,8292	2,50	0,55
0,5	2,4977	1,9981	2,00	0,50

Lampiran 16. Pengukuran Aktivitas Xilanase

Aktivitas enzim xilanase adalah banyaknya gula pereduksi (μg) yang dihasilkan oleh 1 mL enzim dalam waktu 1 menit. Pengukuran aktivitas xilanase dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$AE = \frac{x.V.f\bar{p}}{p.q}$$

Dimana :

- AE = aktivitas enzim ($\mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$)
- x = konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
- V = volume total sampel tiap tabung (mL)
- p = jumlah enzim (mL)
- q = waktu reaksi (menit)
- f \bar{p} = faktor pengenceran

Contoh Perhitungan :

Data absorbansi rata-rata xilanase murni fraksi 40 – 80% pada $\lambda = 745 \text{ nm} = 0,2589$. Persamaan garis pada kurva standar kompleks *molybdenum blue* $y = 0,1146x$

Sehingga konsentrasi gula pereduksi :

$$0,2589 = 0,1146x$$

$$x = \frac{0,2589}{0,1146}$$

$$x = 2,2589 \mu\text{g.mL}^{-1}$$

Dan aktivitas xilanase

$$AE = \frac{2,2589 \mu\text{g/mL} \times 4 \text{ mL} \times 10}{1 \text{ mL} \times 50 \text{ menit}}$$

$$AE = 1,8071 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$$

$$AE = 1,8071 \text{ Unit/mL}$$

Lampiran 17. Pengukuran Kadar Protein Xilanase

Kadar protein xilanase ditentukan dengan metode Biuret secara spektrofotometri. BSA digunakan sebagai protein standar. Data hasil pengukuran absorbansi protein diplotkan ke dalam kurva standar kompleks biuret-BSA.

Persamaan kurva standar BSA adalah: $Y = 0,0003 X$

Volume larutan yang dianalisis : 1 mL

Volume pereaksi Biuret : 4 mL

Volume total sampel : 5 mL

Contoh Perhitungan

Penentuan kadar protein xilanase fraksi 40 - 80% pada $\lambda = 550 \text{ nm}$ didapat absorbansi 0,0145

$$Y = 0,0003 X$$

$$0,0145 = 0,0003 X$$

$$\begin{aligned} X &= 48,33 \text{ ppm} \\ &= 48,33 \text{ mg.L}^{-1} \\ &= 48,33 \mu\text{g.mL}^{-1} \end{aligned}$$

$$\text{Kadar protein} = 48,33 \mu\text{g.mL}^{-1} \times \frac{5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0,2417 \text{ mg.mL}^{-1}$$

$$\text{Kadar protein xilanase fraksi 40 - 80\%} = 0,2417 \text{ mg.mL}^{-1}$$

Lampiran 18. Perhitungan harga V_m , K_M dan K_i

Nilai V_m , K_M dan K_i ditentukan dari persamaan garis pada kurva hubungan $1/V_0$ dengan $1/[S]$.

$$Y = ax + b$$

Dimana :

$$a = \frac{K_M}{V_m}$$

$$b = \frac{1}{V_m}$$

Pada persamaan garis hubungan $1/V_0$ dengan $1/[S]$ xilanase, didapat dua persamaan garis yaitu

1. Tanpa penambahan ion Mg^{2+}

$$Y = 0,0943x + 0,2694$$

Sehingga nilai V_m dan K_M

$$0,2694 = \frac{1}{V_m}$$

$$V_m = 3,712 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$$

$$0,0943 = \frac{K_M}{V_m} = \frac{K_M}{3,712}$$

$$K_M = 0,35\%$$

2. Pada konsentrasi ion Mg^{2+} 6 mM

$$Y = 0,1059 + 0,2696$$

$$0,2696 = \frac{1}{V_m}$$

$$V_m = 3,709 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$$

$$0,1059 = \frac{K_M}{V_m} = \frac{K_M}{3,709}$$

$$K_M = 0,3927 \%$$

Sedangkan nilai K_i ditentukan dengan membandingkan persamaan *Lineweaver-Burk* tanpa penambahan ion Mg^{2+} dengan persamaan *Lineweaver-Burk* dengan konsentrasi ion Mg^{2+} 6 mM

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (\text{tanpa inhibitor})$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (\text{dengan inhibitor kompetitif})$$

Sehingga

$$0,3927 \% = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_M \text{ tanpa inhibisi}$$

$$= \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) 0,35\%$$

$$\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) = \frac{0,3927 \%}{0,35\%}$$

$$= 1,1223$$

$$\frac{[I]}{K_i} = 0,1223$$

$$K_i = 49,06 \text{ mM}$$

Lampiran 19. Analisa Statistik

a. Aktivitas Xilanase pada Berbagai Fraksi

Tabel L.19.1 Penentuan F_{hitung} Aktivitas Xilanase pada Berbagai Fraksi

Fraksi	Aktivitas			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
Kasar	2,3770	2,4168	2,4426	7,2363	2,4121 ± 0,033
0 - 40%	0,6778	0,7127	0,6890	2,0796	0,6932 ± 0,017
40 - 80%	1,7955	1,8052	1,8206	5,4213	1,8071 ± 0,013
80 - 100%	0,7120	0,7092	0,7020	2,1239	0,7076 ± 0,005

1. Menghitung faktor koreksi :

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n.p} = \frac{284,2967}{12} = 23,6914$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK) :

$$\begin{aligned} \text{a. JK Total} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK = 30,1993 - 23,6914 \\ &= 6,5079 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. JK Perlakuan} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{ni} - FK = 30,1967 - 5,6536 \\ &= 6,5053 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. JK galat} &= \text{JK total} - \text{JK perlakuan} \\ &= 6,5079 - 6,5053 = 0,0025 \end{aligned}$$

3. Menghitung kuadrat tengah (KT)

$$\text{a. KT Perlakuan} = \frac{\text{JK perlakuan}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{6,5053}{3} = 2,1684$$

$$\text{b. KT Galat} = \frac{\text{JK Galat}}{\text{dB Galat}} = \frac{0,0025}{8} = 0,0003$$

4. Menghitung Nilai F

$$F_{\text{Hitung}} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}} = \frac{2,1684}{0,0003} = 6814,10$$

$$F_{\text{Tabel } 5\%} = F(0,05; 3, 8) = 4,07$$

$$F_{\text{Tabel } 1\%} = F(0,01; 3, 8) = 7,59$$

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel } 1\%}$, maka H_0 ditolak, artinya Fraksinasi xilanase berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas xilanase. Untuk mengetahui fraksi mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas xilanase, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$ dan $\alpha = 0,01$.

$$\begin{aligned} \text{BNT } 1\% &= t(\alpha/2; \text{dBGalat}) \times (2\text{KTG} / n)^{0,5} \\ &= t(0,005; 8) \times (2 \times 0,0003 / 3)^{0,5} \\ &= 3,355 \times 0,0141 = 0,0473 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t(\alpha/2; \text{dBGalat}) \times (2\text{KTG} / n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 8) \times (2 \times 0,0003 / 3)^{0,5} \\ &= 2,306 \times 0,0141 = 0,0325 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari keempat fraksi yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	23,6914
JKT	6,5079
JKP	6,5053
JKG	0,0025
KTP	2,1684
KTG	0,0003
Fhitung	6814,10
Ftabel 1 %	7,59
Ftabel 5 %	4,07
BNT 1 %	0,0473
BNT 5 %	0,0325

Tabel L.19.2 Analisa Ragam Satu Arah Pengaruh Fraksinasi Terhadap Aktivitas Xilanas

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{Tabel1%}	F _{Tabel5%}
Perlakuan	3	6,5053	2,1684	6814,10	7,59	4,07
Galat percobaan	8	0,0025	0,0003			
Total	11	6,5079				

Tabel L.19.3 Data Uji BNT Fraksinasi Terhadap Aktivitas Xilanas

Fraksi	Fraksi	0 – 40 %	80 – 100 %	40 – 80 %	Kasar
	Rataan	0,6932	0,7076	1,8071	2,4121
0 – 40 %	0,6932	0	0,0144	1,1139 **	1,7189 **
80 – 100 %	0,7076		0	1,0995 **	1,7045 **
40 – 80 %	1,8071			0	0,6050 **
Kasar	2,4121				0

Notasi :

* = berbeda nyata

** = sangat berbeda nyata

b. Kadar Protein pada Berbagai Fraksi

Tabel L.19.4 Penentuan F_{hitung} Kadar Protein pada Berbagai Fraksi

Fraksi	Kadar Protein (mg/mL)			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
Kasar	3,6567	3,6483	3,6600	10,9650	3,6550 $\pm 0,0058$
0 - 40%	0,1967	0,2067	0,2033	0,6067	0,2022 $\pm 0,0050$
40 - 80%	0,2350	0,2417	0,2483	0,7250	0,2417 $\pm 0,0067$
80 - 100%	0,1733	0,1867	0,1767	0,5367	0,1789 $\pm 0,0067$

1. Menghitung faktor koreksi :

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{164,6962}{12} = 13,7247$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK) :

$$\begin{aligned} \text{a. JK Total} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK = 40,4713 - 13,7247 \\ &= 26,7466 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. JK Perlakuan} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{ni} - FK \\ &= 40,4510 - 13,7247 \\ &= 26,7263 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{c. JK galat} &= \text{JK total} - \text{JK perlakuan} \\
 &= 26,7466 - 25,7263 \\
 &= 0,0203
 \end{aligned}$$

3. Menghitung kuadrat tengah (KT)

$$\text{a. KT Perlakuan} = \frac{\text{JK perlakuan}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{26,7263}{3} = 8,9087$$

$$\text{b. KT Galat} = \frac{\text{JK Galat}}{\text{dB Galat}} = \frac{0,0203}{8} = 0,0025$$

4. Menghitung Nilai F

$$\begin{aligned}
 F_{\text{Hitung}} &= \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}} = \frac{8,9087}{0,0025} \\
 &= 3563,48
 \end{aligned}$$

$$F_{\text{Tabel } 5\%} = F(0,05; 3,8) = 4,07$$

$$F_{\text{Tabel } 1\%} = F(0,01; 3,8) = 7,59$$

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel } 1\%}$, maka H_0 ditolak, artinya Fraksinasi xilanase berpengaruh sangat nyata terhadap kadar protein xilanase. Untuk mengetahui fraksi mana saja yang berpengaruh terhadap kadar protein xilanase, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$ dan $\alpha = 0,01$

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 1\% &= t(\alpha/2; \text{dBGalat}) \times (2\text{KTG}/n)^{0,5} \\
 &= t(0,025; 8) \times (2 \times 0,0025 / 3)^{0,5} \\
 &= 3,355 \times 0,0408 = 0,1370
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 5\% &= t(\alpha/2; \text{dBGalat}) \times (2\text{KTG}/n)^{0,5} \\
 &= t(0,025; 8) \times (2 \times 0,0025 / 3)^{0,5} \\
 &= 2,306 \times 0,0408 = 0,0941
 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari keempat fraksi yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	13,7247
JKT	26,7466
JKP	26,7263
JKG	0,0203
KTP	8,9087
KTG	0,0025
Fhitung	3563,48
Ftabel 1%	7,59
Ftabel 5 %	4,07
BNT 1%	0,1370
BNT 5 %	0,0941

Tabel L.19.5 Analisa Ragam Satu Arah Pengaruh Ion Mg^{2+} Terhadap Kadar Protein

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{Tabel1%}	F _{Tabel5%}
Perlakuan	3	26,7263	8,9087	3563,48	7,59	4,07
Galat percobaan	8	0,0203	0,0025			
Total	11	26,7466				

Tabel L.19.6 Data uji BNT Fraksinasi Terhadap Kadar Protein

Fraksi	Fraksi	80 – 100 %	0 – 40 %	40 – 80 %	Kasar
	Rataan	0,1789	0,2022	0,2417	3,6550
80 – 100 %	0,1789	0	0,0233	0,0628	3,4761 **
0 – 40 %	0,2022		0	0,0395	3,4528 **
40 – 80 %	0,2417			0	3,4133 **
Kasar	3,6550				0

Notasi :

* = berbeda nyata

** = sangat berbeda nyata

c. Aktivitas Spesifik Xilanase pada Berbagai Fraksi

Tabel L.19.7 Penentuan F_{hitung} Aktivitas Spesifik Xilanase

Fraksi	Aktivitas Spesifik			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
Kasar	0,6503	0,6612	0,6683	1,9798	$0,6599 \pm 0,0087$
0 - 40%	3,3523	3,5249	3,4075	10,2848	$3,4283 \pm 0,086$
40 - 80%	7,4285	7,4689	7,5325	22,4298	$7,4766 \pm 0,052$
80 - 100%	3,9801	3,9645	3,9216	11,8662	$3,9554 \pm 0,030$

1. Menghitung faktor koreksi :

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{2167,8895}{12} = 180,6575$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK) :

$$\begin{aligned} \text{a. JK Total} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK = 251,2236 - 180,6575 \\ &= 70,5662 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. JK Perlakuan} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{ni} - FK = 251,1998 - 180,6575 \\ &= 70,5423 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. JK galat} &= \text{JK total} - \text{JK perlakuan} = 70,5662 - 70,5423 \\ &= 0,0239 \end{aligned}$$

3. Menghitung kuadrat tengah (KT)

$$\text{a. KT Perlakuan} = \frac{\text{JK perlakuan}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{70,5423}{3} = 23,5141$$

$$b. \text{KT Galat} = \frac{\text{JK Galat}}{\text{dB Galat}} = \frac{0,0239}{8} = 0,003$$

4. Menghitung Nilai F

$$F_{\text{Hitung}} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}} = \frac{23,5141}{0,003} = 7838,03$$

$$F_{\text{Tabel } 5\%} = F(0,05; 3, 8) = 4,07$$

$$F_{\text{Tabel } 1\%} = F(0,01; 3, 8) = 7,59$$

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel } 1\%}$, maka H_0 ditolak, artinya Fraksinasi xilanase berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas spesifik xilanase. Untuk mengetahui fraksi mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas spesifik xilanase, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$ dan $\alpha = 0,01$.

$$\begin{aligned} \text{BNT } 1\% &= t(\alpha/2; \text{dBGalat}) \times (2\text{KTG} / n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 8) \times (2 \times 0,003 / 3)^{0,5} \\ &= 3,355 \times 0,0447 = 0,15 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t(\alpha/2; \text{dBGalat}) \times (2\text{KTG} / n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 8) \times (2 \times 0,003 / 3)^{0,5} \\ &= 2,306 \times 0,0447 = 0,1031 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari keempat fraksi yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	180,6575
JKT	70,5662
JKP	70,5423
JKG	0,0239
KTP	23,5141
KTG	0,003
Fhitung	7838,03
Ftabel 1%	7,59
Ftabel 5%	4,07
BNT 1%	0,2191
BNT 5%	0,1506

Tabel L.19.8 Analisa Ragam Satu Arah Pengaruh Fraksinasi Terhadap Aktivitas Spesifik

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{Tabel1%}	F _{Tabel5%}
Perlakuan	3	70,5423	23,5141	7838,03	7,59	4,07
Galat percobaan	8	0,0513	0,003			
Total	11	70,5662				

Tabel L.19.9 Data Uji BNT Fraksinasi Terhadap Aktivitas Spesifik Xilanase

Fraksi	Fraksi	Kasar	0 – 40 %	80–100 %	40 – 80 %
	Rataan	0,6599	3,4283	3,9554	7,4766
Kasar	0,6599	0			
0 – 40 %	3,4283	2,7684**	0		
80 – 100 %	3,9554	3,2955**	0,5271**	0	
40 – 80 %	7,4766	6,8167**	4,0483**	3,5212**	0

Notasi :

* = berbeda nyata

** = sangat berbeda nyata

d. Aktivitas Xilanase Dengan Penambahan Ion Mg²⁺

Data aktivitas xilanase fraksi 40 – 80 % dengan penambahan variasi konsentrasi ion Mg²⁺ dianalisis menggunakan pola rancangan acak lengkap

Tabel L.19.10 Penentuan F_{hitung} pada Aktivitas Xilanase Fraksi 40 – 80% Dengan Penambahan Ion Mg²⁺

Konsentrasi Ion Mg ²⁺	Aktivitas (U/mL)			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
0	1,7955	1,8052	1,8216	5,4213	1,8071 ± 0,013
1	1,8764	1,8792	1,8883	5,6440	1,8813 ± 0,006
2	1,9106	1,9169	1,9134	5,7410	1,9137 ± 0,003
4	2,6353	2,6418	2,6809	7,9560	2,6520 ± 0,022
6	1,7769	1,7522	1,7710	5,2991	1,7664 ± 0,012
8	1,6991	1,6959	1,7012	5,0953	1,6984 ± 0,003
10	1,6670	1,6712	1,6656	5,0048	1,6679 ± 0,003

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh penambahan ion Mg²⁺ terhadap aktivitas xilanase, maka dilakukan uji F dengan cara sebagai berikut :

1. Menghitung faktor koreksi :

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{1612,8705}{21} = 76,8034$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK) :

$$\begin{aligned} \text{a. JK Total} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK \\ &= 78,8631 - 76,8034 \\ &= 2,0598 \end{aligned}$$

$$b. JK \text{ Perlakuan} = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{ni} - FK = 78,8612 - 76,8034$$

$$= 2,0578$$

$$c. JK \text{ galat} = JK \text{ total} - JK \text{ perlakuan}$$

$$= 2,0598 - 2,0578$$

$$= 0,0020$$

3. Menghitung kuadrat tengah (KT)

$$a. KT \text{ Perlakuan} = \frac{JK \text{ perlakuan}}{dB \text{ perlakuan}}$$

$$= \frac{2,0578}{6} = 0,3430$$

$$b. KT \text{ Galat} = \frac{JK \text{ Galat}}{dB \text{ Galat}}$$

$$= \frac{0,0020}{14} = 0,0001$$

4. Menghitung Nilai F

$$F_{\text{Hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{0,3430}{0,0001} = 2456,72$$

$$F_{\text{Tabel } 5\%} = F(0,05; 6, 14) = 2,85$$

$$F_{\text{Tabel } 1\%} = F(0,01; 6, 14) = 4,46$$

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel } 1\%}$, maka H_0 ditolak, artinya Ion Mg^{2+} berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas xilanase. Untuk mengetahui variasi konsentrasi mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas xilanase, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$ dan $\alpha = 0,01$.

$$\begin{aligned} \text{BNT } 1 \% &= t(\alpha/2; \text{dBGalat}) \times (2\text{KTG}/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 14) \times (2 \times 0,0001 / 3)^{0,5} \\ &= 2,977 \times 0,0082 = 0,0244 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5 \% &= t(\alpha/2; \text{dBGalat}) \times (2\text{KTG}/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 14) \times (2 \times 0,0001 / 3)^{0,5} \\ &= 2,145 \times 0,0082 = 0,0176 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari ketujuh variasi ion Mg^{2+} yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	76,8034
JKT	2,0598
JKP	2,0578
JKG	0,0020
KTP	0,3430
KTG	0,0001
Fhitung	2456,72
Ftabel 1%	4,46
Ftabel 5 %	2,85
BNT 1%	0,0244
BNT 5 %	0,0176

Tabel L.19.11 Analisa Ragam Satu Arah Pengaruh Ion Mg^{2+} Terhadap Aktivitas Xilanase

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{Tabel1%}	F _{Tabel5%}
Perlakuan	6	2,0578	0,3430	2456,72	4,46	2,85
Galat percobaan	14	0,0020	0,0001			
Total	20	2,0598				

Tabel L.19.12 Data Uji BNT Pengaruh Ion Terhadap Mg^{2+} Aktivitas Xilanase

Ion Mg^{2+}	Ion Mg^{2+}	10	8	6	0	1	2	4
	Rataan	1,6679	1,6984	1,7664	1,8071	1,8813	1,9137	2,6520
10	1,6679	0						
8	1,6984	0,0305 **	0					
6	1,7664	0,0985 **	0,0680 **	0				
0	1,8071	0,1392 **	0,1087 **	0,0407 **	0			
1	1,8813	0,2134 **	0,1829 **	0,1149 **	0,0742 **	0		
2	1,9137	0,2458 **	0,2153 **	0,1473 **	0,1066 **	0,0324 **	0	
4	2,6520	0,9841 **	0,9536 **	0,8856 **	0,8449 **	0,7707 **	0,7383 **	0

Notasi :

* = berbeda nyata

** = sangat berbeda nyata