

**Pengaruh Penambahan Ca^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase dari
*Trichoderma viride***

SKRIPSI

oleh:
ISDIANA AROFAH
0810923059-92



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012

**Pengaruh Penambahan Ca^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase dari
*Trichoderma viride***

SKRIPSI

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

oleh:

ISDIANA AROFAH
0810923059-92



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Penambahan Ca^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase dari
*Trichoderma viride***

oleh:

ISDIANA AROFAH
0810923059-92

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

Pembimbing I

Pembimbing II

Drs. Sutrisno, M.Si.
NIP. 196203181990021001

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 19630404 1987011001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. SasangkaPrasetyawan, MS
NIP. 19630404 1987011001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Isdiana Arofah

NIM : 0810923059-92

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

Pengaruh Penambahan Ca^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase dari
Trichoderma viride

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 di kemudian 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, 2012

Yang menyatakan,

(Isdiana Arofah)

NIM. 0810923059-92

Pengaruh Penambahan Ca^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase dari *Trichoderma viride*

ABSTRAK

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan variasi konsentrasi Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase dan menentukan nilai parameter kinetika enzim meliputi V_m , K_M , dan K_i . Aktivitas xilanase ditentukan dengan mengukur kadar gula pereduksinya menggunakan metode spektrofotometri dengan reagen DNS. Pengaruh Ca^{2+} terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan pengukuran aktivitas xilanase dengan variasi konsentrasi Ca^{2+} 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2 dan 1,4 mM pada xilanase fraksi 40-80%. Parameter kinetika enzim ditentukan dengan pengukuran aktivitas enzim pada variasi konsentrasi substrat 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 % (b/v) tanpa penambahan Ca^{2+} dan dengan penambahan Ca^{2+} . Aktivitas xilanase tanpa penambahan Ca^{2+} sebesar $10,01 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$. Aktivitas xilanase dengan Ca^{2+} 0,2; 0,4; dan 0,6 mM meningkat menjadi 10,07; 10,55; dan $11,23 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$. Sedangkan aktivitas xilanase dengan Ca^{2+} konsentrasi 0,8; 1; 1,2; dan 1,4 mM menurun menjadi 9,92; 9,80; 9,45; dan $9,05 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$. Nilai parameter kinetika enzim tanpa penambahan Ca^{2+} yaitu $V_m = 71,43 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$, $K_M = 2,93\%$ (b/v), sedangkan dengan penambahan Ca^{2+} sebesar $V_m = 45,45 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$, $K_M = 3,09\%$ (b/v), dan $K_i = 1,75 \text{ mM}$. Jenis inhibisi Ca^{2+} dan xilanase adalah inhibisi non kompetitif.

Kata kunci : xilanase, inhibitor, aktivitas enzim

The influence of Ca^{2+} Addition to The Xylanase Activity from *Trichoderma viride*

ABSTRACT

Xylanase is an extracellular enzyme that can hydrolyze xylan becomes xylose. This research are conducted to learn the influence of Ca^{2+} addition to the xylanase activity and to determine kinetic parameter value, include (V_m , K_M and K_i). The activity of xylanase is determined with measuring the reducing sugars by using spectrophotometry method with DNS reagent. The influence of Ca^{2+} to the enzyme activity is done by measuring the variation concentration of Ca^{2+} 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2 and 1,4 mM at xylanase fraction 40-80%. The enzyme kinetic parameter is determine by checking enzyme activity at variation of substrate 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; and 1 % (w/v) without addition and with addition of Ca^{2+} . Xylanase activity without Ca^{2+} is $10,01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{minute}^{-1}$. Xylanase activity at 0,2; 0,4; and 0,6 mM Ca^{2+} increased 10,07; 10,55; and $11,23 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{minute}^{-1}$. Xylanase activity at 0,8; 1; 1,2; and 1,4 mM Ca^{2+} decreased 9,92; 9,80; 9,45; dan $9,05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{minute}^{-1}$. The value of enzyme kinetic parameter without Ca^{2+} addition are $V_m = 71,43 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{minute}^{-1}$, $K_M = 2,93\%$ (w/v) and use Ca^{2+} addition are $V_m = 45,45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{minute}^{-1}$, $K_M = 3,09\%$ (w/v), and $K_i = 1,75\text{mM}$. Kind of inhibition between Ca^{2+} and xylanase is non-competitive inhibition.

Keywords: xylanase, inhibitor, enzyme activity

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, karunia serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul Pengaruh Penambahan Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase dari *Trichoderma viride* yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Drs Sutrisno, M. Si., selaku Dosen Pembimbing I sekaligus Dosen Pembimbing Akademik yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan dan arahan dalam penulisan tugas akhir ini serta selama menempuh studi di Jurusan Kimia Universitas Brawijaya.
2. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS., selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Seluruh dosen dan karyawan Jurusan Kimia Universitas Brawijaya atas segala ilmu dan bantuan yang telah diberikan.
4. Kedua orang tua dan kakak atas semua dukungan, doa, dan perhatian hingga terselesaikannya tugas akhir ini.
5. Teman-teman di Jurusan Kimia, khususnya angkatan 2008 dan semua pihak yang turut membantu penyelesaian tugas akhir ini.

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

Malang, 2012

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klobot Jagung	4
2.2 Xilan	5
2.3 <i>Trichoderma viride</i>	5
2.4 Enzim	6
2.5 Enzim Xilanase	8
2.6 Isolasi Enzim	8
2.7 Spektrofotometri UV-Vis.....	9
2.8 Penentuan Gula Pereduksi dengan Reagen DNS.....	9
2.9 Kinetika Reaksi Enzimatis	10
2.10 Inhibitor.....	11
2.11 Ion Logam Kalsium (Ca^{2+}).....	14
2.12 Hipotesis.....	14

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	

3.2.1	Bahan Penelitian.....	15
3.2.2	Alat Penelitian	15
3.3	Tahapan Penelitian	15
3.4	Prosedur Kerja	
3.4.1	Pembuatan Tepung Klobot Jagung.....	16
3.4.2	Pembuatan Media Padat	16
3.4.3	Penanaman Biakan <i>Trichoderma viride</i> ...	17
3.4.4	Pembuatan Media Cair	17
3.4.5	Pembuatan Inokulum.....	17
3.4.6	Produksi Enzim Xilanase	17
3.4.7	Isolasi Enzim	17
3.4.8	Pemurnian Xilanase	
3.4.8.1	Fraksinasi menggunakan Ammonium Sulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄) ..	18
3.4.8.2	Dialisis Enzim	18
3.4.9	Uji Aktivitas Enzim Xilanase	
3.4.9.1	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	18
3.4.9.2	Pembuatan Kurva Standar Gula Pereduksi.....	19
3.4.9.3	Penentuan Aktivitas Enzim Xilanase	19
3.4.10	Uji Aktivitas Enzim Xilanase dengan Penambahan Ca ²⁺	20
3.4.11	Penentuan V _m , K _M , dan K _i	20
3.4.12	Analisis Data	21

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Isolasi dan Pemurnian Xilanase dari <i>Trichoderma viride</i>	23
4.2	Penentuan Aktivitas Xilanase.....	24
4.3	Pengaruh Penambahan Ca ²⁺ terhadap Aktivitas Xilanase	26
4.4	Penentuan Nilai Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis.....	27

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan 30
5.2 Saran..... 30

DAFTAR PUSTAKA 31

LAMPIRAN..... 35

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	: Struktur molekul xilan.....	5
Gambar 2.2	: Reaksi DNS dan glukosa.....	9
Gambar 2.3	: Kurva hubungan antara konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzim.....	10
Gambar 2.4	: Plot Lineweaver-Burk.....	11
Gambar 2.5	: Reaksi enzimatik untuk inhibisi kompetitif.....	12
Gambar 2.6	: Grafik inhibisi kompetitif.....	12
Gambar 2.7	: Reaksi enzimatik untuk inhibisi non-Kompetitif.....	13
Gambar 2.8	: Grafik inhibisi non-kompetitif.....	13
Gambar 2.9	: Reaksi enzimatik untuk inhibisi un-kompetitif.....	13
Gambar 2.10	: Grafik inhibisi un-kompetitif.....	14
Gambar 4.1	: Mekanisme reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa.....	25
Gambar 4.2	: Kurva aktivitas xilanase fraksi 40-80% pada variasi konsentrasi Ca^{2+}	26
Gambar 4.3	: Kurva hubungan $1/[S]$ dan $1/V_0$	28
Gambar 4.4	: Inhibisi non-kompetitif.....	28
Gambar E.1	: Kurva pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	41
Gambar H.1	: Kurva panjang gelombang maksimum gula pereduksi.....	44
Gambar I.1	: Kurva standar gula pereduksi.....	45
Gambar K.1	: Kurva aktivitas xilanase fraksi 40-80% pada variasi konsentrasi Ca^{2+}	48
Gambar L.1	: Grafik hubungan $1/V_0$ dan $1/[S]$	50

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	: Komposisi kulit jagung.....	4
Tabel E.1	: Data pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	41
Tabel F.1	: Berat (gram) Ammonium sulfat pada berbagai fraksi (% kejenuhan)	42
Tabel G.1	: Aktivitas spesifik xilanase dari <i>Aspergillus niger</i> pada berbagai fraksi.....	43
Tabel G.2	: Aktivitas spesifik xilanase dari <i>Bacillus sp.</i> pada berbagai fraksi	43
Tabel H.1	: Data absorbansi gula pereduksi pada = 460-650 nm.....	44
Tabel I.1	: Data absorbansi gula pereduksi	45
Tabel J.1	: Data absorbansi xilanase pada = 490 nm.....	46
Tabel J.2	: Data aktivitas xilanase pada = 490 nm	46
Tabel K.1	: Absorbansi xilanase fraksi 40-80% pada variasi konsentrasi Ca^{2+}	47
Tabel K.2	: Aktivitas xilanase fraksi 40-80% pada variasi konsentrasi Ca^{2+}	47
Tabel L.1	: Data absorbansi xilanase fraksi 40-80% dengan variasi konsentrasi substrat pada =490 nm	49
Tabel L.2	: Data aktivitas xilanase fraksi 40-80% dengan variasi konsentrasi substrat pada =490 nm	49
Tabel L.3	: Data absorbansi xilanase fraksi 40-80% dengan konsentrasi Ca^{2+} 1 mM pada = 490 nm.....	49
Tabel L.4	: Data aktivitas xilanase fraksi 40-80% dengan konsentrasi Ca^{2+} 1 mM pada =490 nm.....	50
Tabel O.1	: Analisis ragam satu arah pengaruh Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase	54
Tabel O.2	: Data uji BNT pengaruh Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase.....	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A.	Komposisi Media Pertumbuhan	
	A.1 Media padat	35
	A.2 Media cair	35
Lampiran B.	Preparasi Larutan	
	B.1 Pembuatan air bebas reduktor.....	36
	B.2 Pembuatan larutan stok glukosa 1500 µg/mL	36
	B.3 Pembuatan larutan baku gula pereduksi	36
	B.4 Pembuatan larutan asam asetat 0,2 M	36
	B.5 Pembuatan larutan natrium asetat 0,2 M	36
	B.6 Pembuatan reagen DNS (asam dinitrosalisilat).....	36
	B.7 Pembuatan substrat xilan 1%.....	37
	B.8 Pembuatan substrat xilan 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 % (b/v).....	37
	B.9 Pembuatan larutan CaCl ₂ 5; 10; 15; 20; 25; 30; dan 35 mM	37
Lampiran C.	Perhitungan Preparasi Larutan	
	C.1 Larutan asam asetat 0,2 M	38
	C.2 Larutan natrium asetat 0,2 M.....	38
	C.3 Larutan Buffer Asetat pH 5	38
Lampiran D.	Tahapan Kerja	40
Lampiran E.	Kurva pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	41
Lampiran F.	Fraksinasi menggunakan Ammonium Sulfat	42
Lampiran G.	Aktivitas Spesifik Xilanase pada Berbagai Fraksi	43
Lampiran H.	Panjang Gelombang Maksimum	44
Lampiran I.	Kurva Standar Gula Pereduksi	45
Lampiran J.	Aktivitas Xilanase	46
Lampiran K.	Aktivitas xilanase fraksi 40-80% pada variasi konsentrasi Ca ²⁺	47
Lampiran L.	Pengukuran Konstanta Kinetika V _m , K _M dan K _i	49
Lampiran M.	Pengukuran aktivitas xilanase	51
Lampiran N.	Perhitungan Harga V _m , K _M , K _i	52

Lampiran O. Analisis statistika

O.1 Aktivitas xilanase dengan
penambahan Ca^{2+}

53

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Jagung merupakan salah satu tanaman pokok yang cukup dikenal tidak hanya di Indonesia melainkan juga di dunia. Tanaman jagung memiliki banyak manfaat bagi manusia, pada umumnya tanaman jagung dimanfaatkan dalam industri pangan dan pembuatan pakan ternak. Namun selain pemanfaatan tersebut, tanaman jagung tetap menyisakan permasalahan berupa limbah klobot jagung. Pada saat ini, pemanfaatan klobot jagung masih sedikit dilakukan oleh masyarakat, biasanya klobot jagung berakhir sebagai pakan ternak sapi atau kambing, atau sebagai bahan baku pembuatan bunga hias kering, bahkan tidak dimanfaatkan sama sekali, dibuang begitu saja seperti limbah yang lain.

Klobot jagung merupakan salah satu limbah berligniselulosa. Hemiselulosa yang terdapat dalam serat kasar klobot jagung mencapai 32% [1]. Dengan menggunakan jasa mikroorganisme, limbah berligniselulosa dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan enzim ekstraseluler yang mampu mendegradasi bahan berligniselulosa menjadi fraksi penyusunnya. Salah satu enzim tersebut adalah xilanase. Xilanase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilosa. Pengembangan proses hidrolisis secara enzimatik merupakan prospek baru untuk penanganan limbah hemiselulosa [2].

Menurut Hatrich [3], xilanase dapat dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme yaitu bakteri, ragi, dan jamur. Salah satu jamur yang dapat menghasilkan enzim xilanase adalah *Trichoderma viride*. Meskipun enzim yang dihasilkan oleh golongan bakteri memiliki ketahanan pada temperatur yang lebih tinggi dibanding jamur, namun aktifitas xilanase dari golongan jamur jauh lebih tinggi dari bakteri [2].

Pada tahun terakhir ini kebutuhan terhadap enzim xilanase mengalami peningkatan. Enzim xilanase sering digunakan dalam proses *bleaching* pada pulp [4]. Selain itu dalam bidang pangan enzim xilanase juga banyak digunakan diantaranya untuk produksi pemanis rendah kalori, pencerah warna jus, *wine* dan ekstraksi minyak tanaman [5]. Dalam bidang pakan ternak enzim xilanase

dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan daya cerna pakan ternak [4]. Jerami padi yang sering dimanfaatkan sebagai pakan ternak mengandung ion logam kalsium (Ca^{2+}) [6]. Keberadaan mineral ini dapat mempengaruhi aktivitas enzim dalam proses enzimatik. Ca^{2+} dapat bertindak sebagai aktivator (meningkatkan aktivitas) maupun inhibitor (menghambat aktivitas) enzim [7]. Pada penelitian Haryati [8], ditunjukkan bahwa penambahan Ca^{2+} 0,5 mM dapat meningkatkan aktivitas enzim xilanase dari *Bacillus pumilus* PU4-2 sebesar 24,3%, dan untuk penambahan dengan konsentrasi 1,0 dan 2,0 mM masing-masing dapat meningkatkan aktivitas sebesar 4,2% dan 5,7%. Sedangkan berdasarkan penelitian Sholihah [9], penambahan 5,0 mM, 10 mM dan 15 mM dapat meningkatkan aktivitas xilanase dari *Aspergillus niger* yakni sebesar 40,1%, 48,17%, dan 60,66% jika dibandingkan dengan aktivitas xilanase tanpa penambahan Ca^{2+} . Namun pada penambahan Ca^{2+} yang lebih tinggi yaitu 25 mM, 30 dan 35 mM, aktivitas xilanase turun sebesar 3,11%, 23,16% dan 62,16%. Pemanfaatan enzim xilanase ini akan lebih efektif karena aktivitas enzim yang maksimal dengan adanya penambahan Ca^{2+} pada konsentrasi tertentu.

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh penambahan Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase dari *Trichoderma viride* dalam menghidrolisis xilan menjadi xilosa.

1.2 PERUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan di atas maka permasalahan yang timbul adalah:

1. Bagaimana pengaruh penambahan variasi konsentrasi Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase dari *Trichoderma viride*?
2. Berapa nilai parameter kinetika (V_m , K_M , dan K_i) reaksi enzimatik xilanase yang diproduksi dari *Trichoderma viride* ?

1.3 BATASAN MASALAH

1. Produksi xilanase menggunakan inducer klobot jagung.
2. *Trichoderma viride* diperoleh dari laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.
3. Ca^{2+} berasal dari larutan CaCl_2 dengan variasi konsentrasi 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30 dan 35 mM.

1.4 TUJUAN PENELITIAN

1. Mengetahui konsentrasi Ca^{2+} dimana berperan sebagai aktivator dan inhibitor
2. Mengetahui nilai konstanta kinetika, meliputi: V_m , K_M , dan K_i Ca^{2+} pada xilanase dari *Trichoderma viride*.

1.5 MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini diharapkan dapat memanfaatkan klobot jagung sebagai bahan baku produksi enzim xilanase serta memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase dari *Trichoderma viride* sehingga xilanase dapat dimanfaatkan secara maksimal.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klobot Jagung

Jagung merupakan salah satu jenis tanaman biji-bijian dari keluarga rumput-rumputan. Di Indonesia, jagung merupakan komoditi tanaman pangan terpenting setelah padi [10].

Kedudukan taksonomi tanaman jagung adalah sebagai berikut [11]:

Phylum	: Spermatophyta
Sub Phylum	: Angiospermae
Classis	: Monocotyledoneae
Ordo	: Glumifora
Famili	: Gramineae
Sub Famili	: Panicoidea
Spesies	: Ovis Sp

Klobot jagung adalah hasil samping yang diperoleh dari pengelupasan buah jagung. Komposisi kimiawi yang terkandung dalam kulit jagung ditunjukkan pada tabel 2.1 [1].

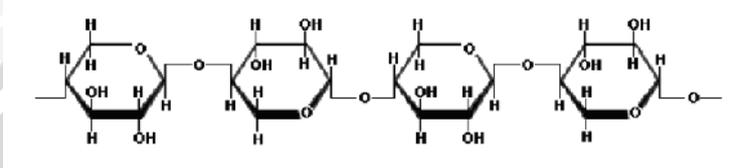
Tabel 2.1 Komposisi kulit jagung

Komponen	Kandungan (%)
Serat kasar	38
Selulosa	6,41
Hemiselulosa	32
Abu	4,47
Protein kasar	6,41
Lignin	6,3

Kandungan hemiselulosa pada klobot jagung yang cukup besar dapat berpotensi sebagai sumber xilan dalam produksi enzim xilanase. Dalam hal ini, selain digunakan sebagai sumber karbon, klobot jagung juga berperan sebagai induser di dalam media pertumbuhan mikroorganismenya. Penambahan induser dalam media pertumbuhan bertujuan untuk menginduksi enzim dari mikroorganismenya supaya mikroorganismenya tersebut dapat mengeluarkan enzim yang diinginkan [1].

2.2 Xilan

Xilan atau bisa disebut sebagai hemiselulosa merupakan heteropolimer polisakarida yang keberadaannya terbanyak kedua setelah selulosa. Kandungan hemiselulosa pada tanaman berkisar antara 20-30% berat kering kayu [12]. Sedangkan pada daun kadarnya mencapai 80-85% [13].



Gambar 2.1 Struktur molekul xilan

Hemiselulosa berfungsi sebagai bahan pendukung dalam dinding sel. Hemiselulosa relatif mudah dihidrolisis oleh asam menjadi komponen monomernya yang terdiri dari D-glukosa, D-manosa, D-galaktosa, D-sylosa, dan L-arabinosa [14]. Hemiselulosa merupakan polimer xilosa dengan jumlah monomer 150-200 unit[4].

2.3 *Trichoderma Viride*

Trichoderma viride merupakan salah satu fungi yang memproduksi spora dengan cara mitosis (aseksual), memiliki suhu pertumbuhan optimum 15-30 °C. Kapang ini dapat mencapai diameter lebih dari 5 cm dalam waktu 9 hari, semula berwarna putih halus kemudian menjadi putih kehijauan dan selanjutnya hijau redup. Kapang ini hidup pada bahan-bahan organik yang telah mati atau tumbuh langsung pada kayu [15].

Menurut Nurlaili [15], kedudukan *Trichoderma viride* dalam taksonomi adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Class	: Sordariomycetes
Subclassis	: Hyphomycetidae
Ordo	: hypocreales
Famili	: Hypocreaceae
Genus	: <i>Trichoderma</i>
Species	: <i>Trichoderma viride</i>

Menurut Hatrich et al [3], sejumlah mikroorganisme dapat menghasilkan enzim xilanase. mikroorganisme tersebut antara lain

bakteri, ragi dan jamur seperti *Trichoderma viride*, *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureo-basidium*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Humicola*. Kelebihan dari *Trichoderma viride* jika dibandingkan dengan jenis kapang lainnya adalah mampu berkembang biak meskipun pada kondisi pH asam (2,1-2,5) [16]. *Trichoderma* dalam pengendalian hayati memiliki beberapa keuntungan yaitu dapat ditemukan di berbagai tempat, dapat tumbuh cepat di berbagai substrat, kisaran parasitismenya terhadap patogen tumbuhan sangat luas, jarang bersifat patogen pada tumbuhan tingkat tinggi, berkemampuan tinggi dalam berkompetisi memperebutkan makanan dan ruang (tempat), dapat bekerja sebagai mikoparasit dan menghasilkan antibiotik enzim yang dapat menyebabkan rusaknya hifa berbagai kapang patogen tanaman [17].

2.4 Enzim

Enzim bekerja secara khas terhadap substrat tertentu. Enzim dapat bekerja pada suatu substrat bila ada hubungan antara enzim dengan substrat yang hanya terjadi pada bagian atau tempat tertentu saja (sisi aktif). Hubungan 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 seperti pada persamaan (2.1) [18].



dimana : E = enzim
 S = substrat
 ES = kompleks enzim substrat
 P = hasil reaksi

Pembentukan senyawa kompleks ES dari E dan S berlangsung dengan konstanta kecepatan k_1 . Kompleks ES akan mengalami dua kemungkinan penguraian, yaitu kembali terurai menjadi E dan S dengan konstanta kecepatan k_{-1} atau melanjutkan reaksi kembali dengan menghasilkan produk P dan E dengan konstanta kecepatan k_2 . Dengan asumsi tidak ada P yang dapat diubah lagi menjadi S.

Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim diantaranya [18]:

a. Konsentrasi enzim

Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim.

b. Konsentrasi substrat

Dengan konsentrasi enzim yang tetap maka penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar.

c. Temperatur

Reaksi yang menggunakan katalis enzim juga dapat dipengaruhi oleh temperatur. Reaksi kimia berlangsung lambat pada temperatur rendah sedangkan pada temperatur tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Selain itu, karena enzim adalah suatu protein maka kenaikan temperatur dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Kenaikan temperatur sebelum terjadinya proses denaturasi dapat menaikkan kecepatan reaksi.

d. Pengaruh pH

Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif atau ion bermuatan ganda (zwitter ion). Sehingga perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. pH rendah atau pH tinggi dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan hal ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim.

e. Pengaruh inhibitor

Hambatan atau inhibisi pada suatu reaksi yang menggunakan enzim sebagai katalis dapat terjadi apabila penggabungan substrat pada bagian aktif enzim mengalami hambatan. Inhibitor adalah molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut. Hambatan terhadap aktivitas enzim dalam suatu reaksi kimia mempunyai arti yang sangat penting karena hambatan tersebut juga merupakan mekanisme pengaturan reaksi-reaksi yang terjadi dalam tubuh.

2.5 Enzim Xilanase

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi xilosa [8]. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu -xilosidase, eksoxilanase, dan endoxilanase. -xilosidase merupakan xilanase yang mampu menghidrolisis xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Eksoxilanase mampu memutus rantai polimer xilan pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Endoxilanase mampu memutus ikatan 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 [19].

Dalam bidang industri, enzim hemiselulase atau xilanase memiliki fungsi yang beraneka ragam, bahkan kebutuhan akan enzim xilanase pada tahun terakhir ini mengalami peningkatan terutama untuk kebutuhan dalam proses *bleaching* pada pulp [4]. Enzim xilanase dapat mengurangi secara nyata kandungan lignin dan hemiselulosa pada bubur kertas. Penggunaan enzim ini diharapkan dapat mereduksi penggunaan bahan kimia klor yang digunakan pada berbagai tahapan dalam proses pemutihan sehingga menjadi lebih ramah lingkungan [20]. Enzim xilanase juga telah banyak digunakan dalam bidang pangan diantaranya untuk modifikasi produk *baking*, produksi pemanis rendah kalori, pencerah warna jus, *wine* dan ekstraksi minyak tanaman [5]. Sedangkan di bidang pakan ternak enzim xilanase dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan daya cerna pakan ternak [4].

2.6 Isolasi Enzim

Pemisahan partikel dari larutan dengan metode sentrifugasi merupakan operasi utama dalam isolasi enzim. Hal ini termasuk pemisahan sel-sel dari medium biakan, pemisahan atau penghancuran sel dan pengumpulan presipitat. Isolasi enzim dilakukan pada temperatur rendah dan campuran ditambah larutan penyangga atau buffer untuk mempertahankan kestabilan enzim. Enzim akan berada pada lapisan air (supernatan) [21].

Isolasi xilanase dilakukan pada saat kapang *Trichoderma viride* mencapai awal fase stasioner (setelah jam ke-60) sesuai

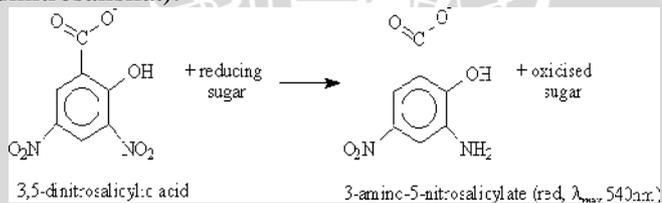
dengan penelitian Widyasari [22] tentang isolasi dan karakterisasi ekstrak kasar xilanase dari *Trichoderma viride*. Penelitian ini menunjukkan bahwa awal fase stasioner adalah waktu optimum untuk produksi xilanase dari *Trichoderma viride*. Isolasi ini dilakukan setelah enzim diproduksi pada fasa eksponensial karena pertumbuhan biomassa sesuai dengan perhitungan logaritma. Pada saat ini kapang sangat aktif mensintesis enzim untuk memenuhi kebutuhan hidupnya. Tahap awal sebelum mengisolasi ekstrak kasar enzim adalah membuat inokulum hingga pertengahan fase log dan dilanjutkan produksi enzim sampai jam ke-60.

2.7 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah salah satu metode analisis spektroskopi yang menggunakan sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dan sinar tampak. Radiasi elektromagnetik UV-Vis tersebut mempunyai panjang gelombang berkisar 190-780 nm. Sinar UV mulai dari 190-380 nm dan sinar tampak 380-780 nm [23]. Instrumen yang digunakan untuk mempelajari serapan atau emisi radiasi elektromagnetik sebagai fungsi dari panjang gelombang disebut spektrofotometer [24].

2.8 Penentuan Gula Pereduksi dengan Reagen DNS

Aktivitas enzim xilanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 µg substrat per menit pada keadaan pengukuran optimal [25]. Aktivitas xilanase dapat ditentukan secara spektrofotometri menggunakan metode DNS (Asam dinitrosalisilat).



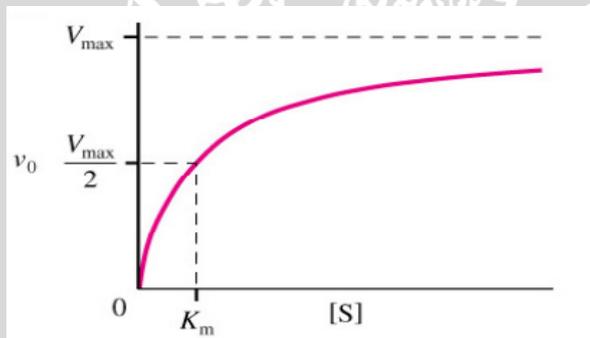
Gambar 2.2 Reaksi DNS dan glukosa

Prinsip pengukuran aktivitas enzim dengan metode DNS adalah gula pereduksi hasil hidrolisis enzim akan mereduksi asam dinitrosalisilat dan membentuk kompleks warna merah kecoklatan sebagai kompleks warna dari asam-3-amino-5-nitrosalisilat dalam suasana basa sedangkan glukosa akan teroksidasi menjadi asam

glukonat. Kompleks warna tersebut kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yaitu 540 nm. Reaksi yang terjadi pada saat penambahan reagen DNS dalam sampel enzim yang akan dianalisis dapat dilihat pada gambar 2.2 [26].

2.9 Kinetika Reaksi Enzimatis

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, V_m merupakan kecepatan reaksi ketika enzim jenuh dengan substrat [27]. K_M merupakan konstanta Michaelis-Menten yang didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimum [28]. Grafik hubungan konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzim ditunjukkan pada gambar 2.3. Pada batas laju maksimum (V_m), enzim menjadi lebih jenuh oleh substrat sehingga pada saat penambahan konsentrasi substrat kembali tidak memberikan pengaruh lagi terhadap laju reaksi.



Gambar 2.3 Kurva hubungan konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzim

Hubungan antara penambahan konsentrasi substrat dengan laju reaksi dapat dinyatakan secara sistematis oleh persamaan Michaelis-Menten (persamaan (2.2)) [29]:

$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.2)$$

dengan V_0 = kecepatan awal pada konsentrasi substrat $[S]$

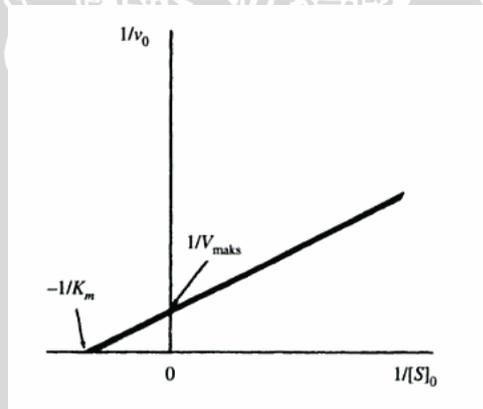
V_{maks} = kecepatan maksimum

K_M = tetapan Michaelis-Menten

Jika kecepatan reaksi awal tepat sama dengan setengah kecepatan maksimum maka $K_M = [S]$.

Pengukuran yang didasarkan pada persamaan Michaelis-Menten masih sangat sederhana. Nilai K_M dapat diperoleh dengan menggunakan prosedur grafik sederhana. Akan tetapi sulit untuk menentukan nilai V_{maks} dengan tepat dari grafik Michaelis-Menten karena hanya berupa dugaan dan tidak pernah diketahui nilai sebenarnya. Nilai K_M dan V_{maks} pada saat sebelum dan sesudah adanya inhibitor yang lebih tepat, dapat diperoleh dengan memetakan data yang sama dengan cara yang berbeda, yaitu menggunakan persamaan Lineweaver-Burk (Persamaan (2.3)) yang merupakan kebalikan dari persamaan Michaelis-Menten [29].

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (2.3)$$

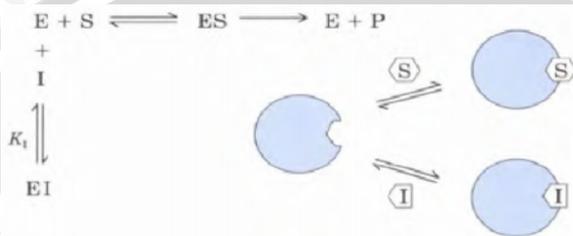


Gambar 2.4. Plot Lineweaver-Burk

2.10 Inhibitor

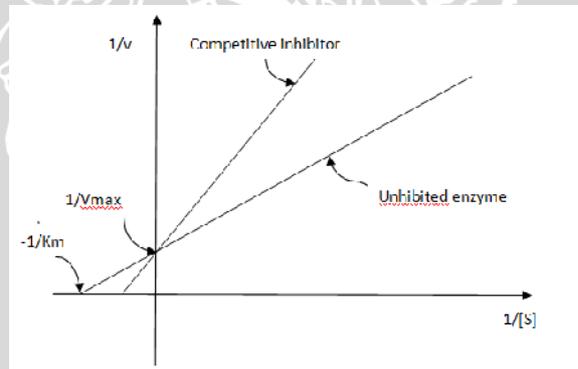
Kerja enzim dapat dihambat secara reversibel atau irreversible. Penghambatan secara irreversible merupakan pembentukan atau pemecahan ikatan kovalen dalam enzim

sedangkan secara reversible suatu senyawa dapat terikat dan kemudian dapat lepas kembali. Inhibitor reversible dapat dibagi menjadi tiga yaitu inhibitor kompetitif, non-kompetitif dan unkompetitif [27].



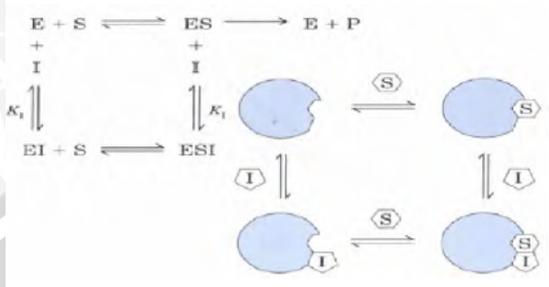
Gambar 2.5 Reaksi enzimatik untuk inhibisi kompetitif

Inhibitor kompetitif merupakan suatu bahan yang biasanya menyerupai substrat yang berkompetisi secara langsung dengan suatu substrat normal untuk secara spesifik mengikat sisi aktif enzim. Reaksi enzimatik untuk inhibisi kompetitif ditunjukkan pada gambar 2.5.

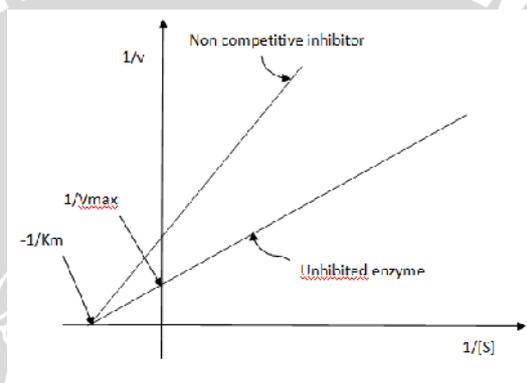


Gambar 2.6 Grafik inhibisi kompetitif

Inhibitor non-kompetitif merupakan inhibitor yang 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 . Reaksi enzimatik untuk inhibisi non-kompetitif ditunjukkan pada gambar 2.7.

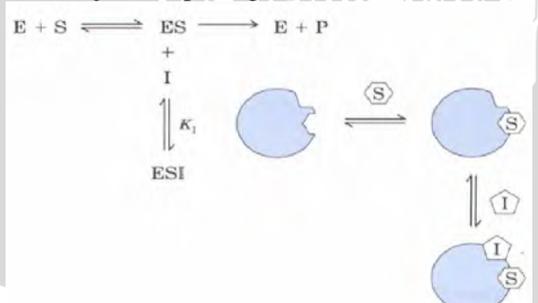


Gambar 2.7 Reaksi enzimatik untuk inhibisi non- kompetitif

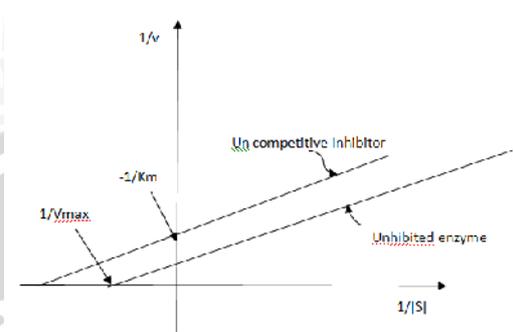


Gambar 2.8 Grafik Inhibisi non-kompetitif

Inhibitor un-kompetitif merupakan inhibitor yang terikat pada sisi selain sisi aktif enzim, berbeda dengan inhibitor non-kompetitif, inhibitor ini hanya terikat pada kompleks ES sehingga tidak terikat pada enzim bebas. Reaksi enzimatik untuk inhibisi un-kompetitif ditunjukkan pada gambar 2.9.



Gambar 2.9 Reaksi enzimatik untuk inhibisi un-kompetitif



Gambar 2.10 Grafik Inhibisi un-kompetitif

2.11 Ion Logam Kalsium (Ca^{2+})

Kalsium merupakan logam yang kurang stabil sehingga sangat sulit ditemukan dalam keadaan bebas di alam. Kalsium merupakan unsur esensial yang terkandung dalam tumbuhan dalam jumlah besar [30]. Keberadaan mineral ini dapat mempengaruhi aktivitas enzim dalam proses enzimatik. Ca^{2+} dapat bertindak sebagai aktivator (meningkatkan aktivitas) maupun inhibitor (menghambat aktivitas) enzim [7]. Peranan ion logam dalam aktivitas katalitik enzim bergantung pada konsentrasi ion tersebut. Penambahan ion logam pada konsentrasi yang relatif rendah cenderung akan meningkatkan aktivitas enzim atau sebagai aktivator, sebaliknya pada penambahan yang relatif tinggi cenderung menurunkan aktivitas enzim atau inhibitor.

2.12 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan teoritis di atas dapat diduga bahwa terdapat pengaruh penambahan Ca^{2+} terhadap aktivitas enzim xilanase dari *Trichoderma viride* dimana penambahan Ca^{2+} pada konsentrasi rendah akan meningkatkan aktivitas xilanase dan pada konsentrasi tinggi akan menurunkan aktivitas enzim 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 Februari-Mei 2012.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni *Trichoderma viride* yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang dan klobot jagung yang diperoleh dari Pasar Blimbing Malang.

Bahan kimia yang digunakan adalah bahan yang memiliki derajat kemurnian pro analisa (p.a.) antara lain dekstrosa, CH_3COOH , CH_3COONa , asam oleat, KH_2PO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, glukosa anhidrat, HCl , BaCl_2 , DNS (asam dinitrosalisilat), bahan-bahan *for microbiology* antara lain kentang, pepton, tepung agar, xilan, tepung klobot jagung, dan akuades.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, pengaduk kaca, pipet ukur 5 mL dan 10 mL, pipet tetes, erlenmeyer 100 mL dan 250 mL, gelas arloji, labu ukur 10 mL dan 100 mL, sentrifuse dingin (Joan MR 1889), jarum ose, inkubator (Heraeus Type B 5042), magnetik stirer, neraca analitik mettler (Bosch PE 620), pH meter (inolab WTW), kuvet, penangas air (Memmert W 200), autoklaf (All American Model 20x0), shaker (Edmund Buhler SM 252413).

3.3 Tahapan Penelitian

1. Pembuatan tepung dari klobot jagung
2. Pembuatan media padat
3. Penanaman biakan murni *Trichoderma viride*
4. Pembuatan media cair
5. Pembuatan inokulum

6. Produksi xilanase
7. Isolasi ekstrak kasar xilanase dari biakan *Trichoderma viride*
8. Pemurnian xilanase
9. Penentuan aktivitas enzim xilanase:
 - Pembuatan kurva standar gula pereduksi dan uji kadar gula pereduksi dengan metode spektrofotometri menggunakan reagen DNS
 - Pengukuran aktivitas enzim xilanase
10. Uji aktivitas xilanase dengan penambahan Ca^{2+}
11. Penentuan konstanta kinetika enzim (K_M , V_m , dan K_i)
12. Analisis data

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Pembuatan Tepung Klobot Jagung

Klobot jagung sebanyak 50 gram dicuci dan dikeringkan di bawah terik sinar matahari kemudian dikeringkan dalam oven. Setelah kering, klobot jagung tersebut dipotong-potong kurang lebih 0,5 cm kemudian dihaluskan dengan blender. Klobot jagung yang telah halus diayak dengan ukuran ayakan 150 mesh. Klobot jagung yang lolos dari ayakan tersebut digunakan sebagai induser.

3.4.2 Pembuatan Media Padat

Media padat yang digunakan adalah Potato Dextrose Agar (PDA). Adapun pembuatan PDA adalah 20 gram kentang yang telah dikupas, dicuci dan diiris kecil-kecil, ditambahkan akuades hingga 100 mL dan dididihkan selama 60 menit sambil ditambahkan akuades sedikit demi sedikit agar volume tetap 100 mL. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh sari kentang. Selanjutnya sari kentang ditambahkan 2 gram dekstrosa, pH diatur pada pH 5, ditambahkan buffer asetat pH 5 sebanyak 1 mL. Kemudian dipanaskan hingga mendidih dan ditambahkan 1,5 gram tepung agar, lalu diaduk. Larutan PDA tersebut dipipet sebanyak 4 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas, dilapisi dengan aluminium foil dan diikat dengan karet. Larutan PDA disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. PDA yang telah steril didinginkan pada suhu ruang atau disimpan dalam kulkas dengan posisi miring.

3.4.3 Penanaman Biakan *Trichoderma viride*

Jarum ose disiapkan, kemudian dilakukan pemindahan secara aseptis kapang *Trichoderma viride* sebanyak satu mata ose ke dalam media padat yang telah dibuat, kemudian diinkubasi selama 6 hari pada temperatur 30 °C.

3.4.4 Pembuatan Media Cair

0,25 g pepton; 0,1 g KH_2PO_4 ; 0,15 g CaCl_2 ; 0,5 mL asam oleat; 0,7 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 2,0 g tepung klobot jagung ditimbang menggunakan neraca analitik mettler. Kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 500 mL, ditambahkan akuades dan diatur pada pH 5 dan larutan dibuat sebanyak 500 mL. Kemudian ditambahkan buffer asetat pH 5 sebanyak 1 mL. Campuran ini diaduk dan dipanaskan hingga mendidih, dimasukkan dalam erlenmeyer, lalu ditutup dengan kapas dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121 °C dan tekanan 15 psi.

3.4.5 Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan dengan mengambil spora dari biakan murni *Trichoderma viride* yang telah berumur 6 hari, kemudian disuspensikan dalam 10 mL akuades steril. Suspensi diambil sebanyak 2 mL dan ditanam dalam erlenmeyer yang berisi 13 mL media cair steril. Selanjutnya media tersebut diinkubasi dalam shaker hingga mencapai pertengahan fase logaritma (jam ke-36) dan dilanjutkan dengan produksi enzim.

3.4.6 Produksi Enzim Xilanase

Disiapkan erlenmeyer 250 mL yang telah berisi 150 mL media cair, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Setelah dingin, ditambahkan secara aseptis 15 mL inokulum (prosedur 3.4.5). selanjutnya media diinkubasi dalam shaker dengan kecepatan 150 rpm pada temperatur kamar hingga mencapai awal fase stasioner (jam ke-60), setelah itu dilakukan isolasi enzim.

3.4.7 Isolasi Enzim

Pada akhir masa inkubasi, xilanase diisolasi dengan metode sentrifugasi. Pada media cair ditambahkan dengan 15 mL buffer

asetat pH 5 dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4 °C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar xilanase.

3.4.8 Pemurnian Xilanase

3.4.8.1 Fraksinasi menggunakan Ammonium Sulfat ((NH₄)₂SO₄)

Ekstrak kasar xilanase difraksinasi menggunakan garam amonium sulfat, dengan fraksi 0-40% dan 40-80%. Fraksinasi adalah penambahan garam amonium sulfat pada enzim (ekstrak kasar) dengan tingkat kejenuhan garam yang berbeda dalam enzim. 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 dalam penangas air hingga seluruh padatan amonium sulfat larut. Larutan didiamkan dalam lemari pendingin selama 30 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi dingin pada temperatur 4 °C pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. supernatan yang diperoleh dipisahkan dari endapannya. 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%.

3.4.8.2 Dialisis Enzim

Endapan dari fraksi 40-80% ditambahkan 10 mL buffer asetat 0,2 M pH 5. Larutan enzim dimasukkan dalam membran selofan yang diikat kedua ujungnya agar tidak ada komponen enzim yang lolos. Kantong selofan berisi enzim direndam dalam 250 mL buffer asetat 0,1 M pH 5 dan diaduk perlahan dengan pengaduk magnet. Dialisis dilakukan sampai semua amonium sulfat terpisah dari xilanase murni dengan penggantian larutan buffer asetat perendam setiap 2 jam. Dialisis dihentikan jika dalam pengujian 5 mL buffer asetat (perendam) dengan 1 mL HCl 0,01 M dan 1 mL BaCl₂ 0,1 M tidak terbentuk endapan putih (BaSO₄).

3.4.9 Uji Aktivitas Enzim Xilanase

3.4.9.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

1 mL larutan glukosa 900 µg/mL dipipet dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5 dan ditambahkan 2 mL reagen DNS. Setelah itu dipanaskan dalam

penangas air mendidih selama 5 menit, didinginkan dengan air mengalir. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Untuk blanko digunakan akuades dengan perlakuan yang sama seperti sampel. Diukur absorbansinya pada kisaran panjang gelombang 460-650 nm.

3.4.9.2 Pembuatan Kurva Standar Gula Pereduksi

Sebanyak 0,15 gram glukosa anhidrat ditimbang dan dilarutkan dengan akuades secukupnya dalam gelas kimia. Setelah itu dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan stok glukosa 1500 $\mu\text{g/mL}$. Dari larutan stok glukosa 1500 $\mu\text{g/mL}$ dipipet (2; 4; 6; 6,8; dan 8) mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditandabatkan dengan akuades sehingga diperoleh larutan (300, 600, 900, 1000, dan 1200) $\mu\text{g/mL}$.

Setiap konsentrasi larutan glukosa diambil 1 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5 dan ditambahkan 2 mL reagen DNS. Kemudian dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit dan didinginkan dengan air mengalir. Setelah itu larutan campuran dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer Uv-Vis.

3.4.9.3 Penentuan Aktivitas Enzim Xilanase

Disiapkan 2 tabung reaksi, masing-masing diisi 1 mL substrat xilan 1% (b/v). Kemudian dipanaskan dalam penangas air dengan temperatur 60 $^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. Setelah itu ditambahkan 1 mL ekstrak kasar xilanase pada tabung 1 dan 1 mL xilanase fraksi 40-80% pada tabung 2. Kedua tabung diinkubasi pada temperatur 60 $^{\circ}\text{C}$ selama 55 menit, setelah itu dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan. Aktivitas enzim pada kedua tabung diukur dengan analisis kadar gula pereduksi menggunakan reagen DNS.

Ditambahkan 2 mL reagen DNS ke dalam masing-masing tabung. Kedua tabung dimasukkan dalam penangas air mendidih selama 5 menit, setelah itu didinginkan dengan air mengalir. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades

hingga tanda batas. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

Aktivitas enzim diukur berdasarkan kadar gula pereduksi yang dihasilkan enzim xilanase yang dihitung dari data absorbansi larutan uji yang diplotkan pada persamaan garis lurus kurva baku pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Aktivitas enzim xilanase dinyatakan dalam satuan $\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$. Pengukuran aktivitas dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi dengan kurva standar gula pereduksi sehingga dapat diketahui konsentrasi gula pereduksi yang diperoleh dari hasil hidrolisis xilan yang dikatalisis enzim xilanase. Satuan unit aktivitas enzim dapat diperoleh dari persamaan berikut ini:

$$AE = [\text{Gula pereduksi}] \times \frac{V \cdot fp}{p \cdot q} \quad (3.1)$$

Dimana

- AE = aktivitas enzim ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$)
- V = volume total sampel tiap tabung (mL)
- fp = faktor pengenceran
- p = volume ekstrak kasar enzim (mL)
- q = waktu reaksi (menit)

3.4.10 Uji Aktivitas Enzim Xilanase dengan Penambahan Ca^{2+}

Tabung reaksi disiapkan sebanyak 8 buah, masing-masing diisi substrat xilan 1% (b/v) sebanyak 1 mL. Setelah itu dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 60°C selama 15 menit. Ditambahkan xilanase fraksi 40-80% sebanyak 1 mL, kemudian 1 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan Ca^{2+} 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30 dan 35 mM, dan diinkubasi pada temperatur 60°C selama 55 menit. Setelah itu, masing-masing tabung dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dalam air es hingga mencapai temperatur kamar. Diukur kadar gula pereduksi secara spektrofotometri menggunakan reagen DNS.

3.4.11 Penentuan V_m , K_M , dan K_i

Harga V_m dan K_M ditentukan melalui uji aktivitas xilanase tanpa penambahan Ca^{2+} dan uji aktivitas dengan penambahan Ca^{2+} . Untuk variasi konsentrasi substrat xilan yang digunakan adalah 0,2; 0,4; 0,6; 0,8, dan 1 % (b/v). Substrat xilan dengan variasi konsentrasi

0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1% (b/v) dipipet 1 mL ke dalam tabung reaksi. Setelah itu dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 60 °C selama 15 menit kemudian didinginkan. Ditambahkan 1 mL xilanase fraksi 40-80%, 1 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor ke dalam tabung reaksi tersebut. Kemudian diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 55 menit. Setelah itu masing-masing tabung dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan hingga mencapai temperatur kamar. Diukur kadar gula pereduksi secara spektrofotometri menggunakan reagen DNS.

Untuk uji aktivitas xilanase dengan penambahan Ca^{2+} , substrat xilan dengan variasi konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1% (b/v) dipipet 1 mL ke dalam tabung reaksi. Setelah itu dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 60 °C selama 15 menit dan didinginkan. Ditambahkan 1 mL xilanase fraksi 40-80%, 1 mL buffer asetat pH 5, 1 mL Ca^{2+} , dan 1 mL air bebas reduktor ke dalam tabung reaksi tersebut. Kemudian diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 55 menit. Setelah itu masing-masing tabung dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan hingga mencapai temperatur kamar. Diukur kadar gula pereduksi secara spektrofotometri menggunakan reagen DNS.

Harga konstanta inhibisi ditentukan melalui persamaan Lineweaver-Burk yaitu dengan membandingkan persamaan garis penentuan harga V_m dan K_M tanpa penambahan Ca^{2+} dengan persamaan garis penentuan harga V_m dan K_M menggunakan Ca^{2+} .

3.4.12 Analisis Data

Data aktivitas xilanase dan pengaruh konsentrasi Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase dianalisis menggunakan analisis ragam (uji F) pada Rancangan Acak Lengkap (RAL) dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil 5% (BNT). Langkah perhitungan analisa data adalah sebagai berikut:

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n y_{ij}]^2}{np}$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK)

- a. JK total = $[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2] - FK$

$$b. JK_{\text{perlakuan}} (JK_p) = \frac{[\sum_{i=1}^p (\sum_{j=1}^n y_{ij})^2]}{n_1} - FK$$

$$c. JK_{\text{galat percobaan}} (JK_G) = JK_{\text{total}} - JK_{\text{perlakuan}}$$

3. Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber keragaman

$$a. \text{Kuadrat Tengah}_{\text{perlakuan}} (KT_p) = \frac{JK_p}{db_{\text{perlakuan}}}$$

$$b. \text{Kuadrat Tengah}_{\text{galat percobaan}} (KT_G) = \frac{JK_G}{db_{\text{percobaan}}}$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KT_p}{KT_G}$$

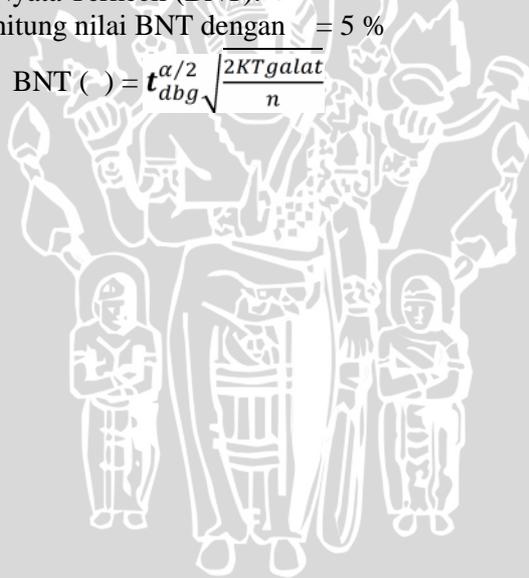
Keterangan: p = banyaknya percobaan

n = banyaknya ulangan

5. Untuk mengetahui perlakuan mana saja yang berpengaruh berbeda satu dengan lainnya, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT):

Menghitung nilai BNT dengan $\alpha = 5\%$

$$BNT(\cdot) = t_{\alpha/2}^{dbs} \sqrt{\frac{2KT_{\text{galat}}}{n}}$$



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan Pemurnian Xilanase dari *Trichoderma viride*

Pada akhir masa inkubasi, yaitu pada saat kapang *Trichoderma viride* mencapai awal fasa stasioner sesuai dengan kurva pertumbuhan *Trichoderma viride* hasil penelitian Widyasari [22], dilakukan isolasi xilanase. Isolasi ini dilakukan pada saat kapang *Trichoderma viride* mencapai awal fasa stasioner pada kurva pertumbuhannya karena pada saat ini kapang sangat aktif mensintesis enzim xilanase. Isolasi xilanase dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi. Sentrifugasi adalah proses pemisahan dengan menggunakan gaya sentrifugal. Dari hasil sentrifugasi ini diperoleh supernatan yang merupakan ekstrak kasar enzim xilanase. Penambahan buffer asetat pada saat isolasi enzim digunakan untuk mempertahankan kestabilan enzim.

Hasil dari isolasi enzim diperoleh ekstrak kasar xilanase yang masih bercampur dengan protein-protein non enzim sehingga perlu dilakukan pemurnian. Dengan dilakukan pemurnian, maka peluang interaksi antara enzim xilanase dengan substrat akan menjadi lebih besar.

Ekstrak kasar xilanase dimurnikan dengan cara fraksinasi dan dilanjutkan dengan dialisis. Fraksi pengendapan yang digunakan adalah 40-80%. Fraksi ini dipilih karena berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Sholihah [9] dan Firmansyah [31] pada lampiran G yang menentukan aktivitas spesifik xilanase dalam berbagai fraksi, ditunjukkan bahwa aktivitas spesifik xilanase tertinggi berada pada fraksi 40-80%. Pada penelitian Sholihah [9] enzim xilanase diproduksi oleh *Aspergillus niger* sedangkan Firmansyah [31] menggunakan *Bacillus sp.* Jumlah (gram) ammonium sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ yang ditambahkan pada enzim xilanase untuk fraksinasi sesuai dengan tabel pengendapan ammonium sulfat pada lampiran F.

Fraksinasi adalah salah satu cara pemurnian protein melalui pengendapan. Fraksinasi ini dilakukan berdasarkan prinsip *salting out* di mana kelarutan protein akan menurun pada konsentrasi garam yang tinggi. 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. Garam ammonium sulfat dipilih karena bersifat mudah larut dalam air dan tidak menyebabkan perubahan aktivitas enzim walaupun konsentrasinya cukup pekat.

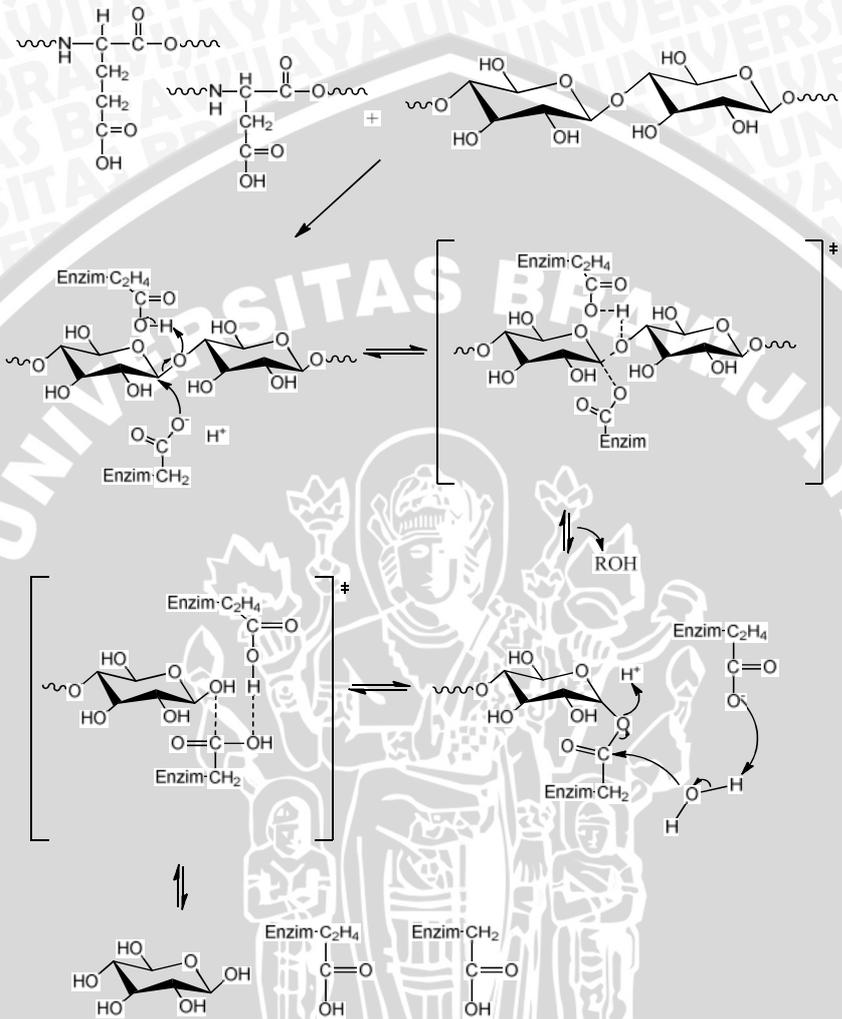
Endapan yang diperoleh pada fraksi 40-80% selanjutnya dipisahkan dari garam amonium sulfat dengan cara dialisis. Endapan ini ditambahkan dengan buffer asetat untuk menjaga kestabilan enzim. Dialisis dilakukan dengan menggunakan membran selofan yang merupakan membran semipermeabel.

Dialisis merupakan proses pemisahan partikel-partikel protein dengan ukuran besar dari partikel amonium sulfat yang berukuran kecil melalui membran selofan. Proses dialisis ini didasarkan pada prinsip difusi, yaitu adanya perbedaan konsentrasi antara larutan buffer asetat di dalam membran dan di luar membran, molekul yang berukuran kecil yaitu garam amonium sulfat akan keluar melalui pori-pori membran selofan sedangkan protein yang berukuran lebih besar akan tetap berada di dalam membran. Proses dialisis ini dilakukan dengan pengadukan menggunakan *stirer* bertujuan untuk mempermudah keluarnya garam amonium sulfat dari membran selofan dan dilakukan dalam wadah yang berisi es agar tidak terjadi peningkatan suhu larutan sehingga mencegah terjadinya denaturasi protein. Penggantian larutan perendam dilakukan setiap dua jam. Dialisis dihentikan ketika dalam pengujian larutan perendam dengan HCl dan BaCl₂ tidak terbentuk endapan BaSO₄. Reaksi yang terjadi pada saat pengujian larutan perendam sesuai dengan persamaan 4.1.



4.2 Penentuan Aktivitas Xilanase

Xilanase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa yang merupakan gula pereduksi. Aktivitas xilanase dapat ditentukan melalui gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis xilan oleh xilanase menggunakan reagen DNS secara spektrofotometri. Gula pereduksi ini akan mereduksi asam dinitrosalisilat dan membentuk kompleks warna merah kecoklatan sebagai kompleks warna dari asam-3-amino-5-nitrosalisilat. Kompleks warna inilah yang kemudian diukur absorbansinya pada pada panjang gelombang 490 nm.



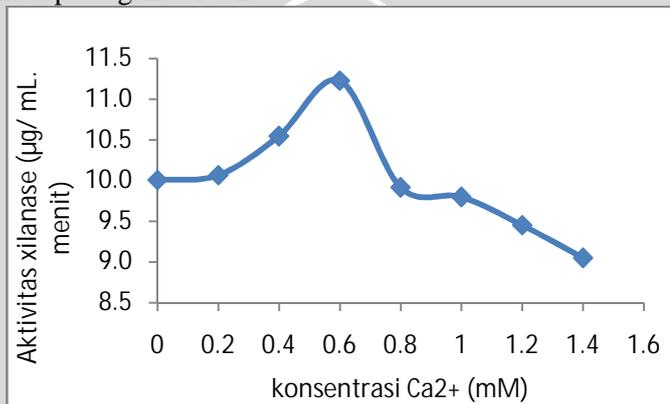
Gambar 4.1 Mekanisme reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa

Mekanisme pembentukan gula pereduksi terjadi melalui pembentukan intermediet kompleks enzim-substrat (ES) yang terbentuk karena gugus fungsi $-\text{COOH}$ dari rantai samping asam aspartat terionisasi lebih awal daripada asam glutamat. Ion karboksilat dari asam aspartat tersebut menyerang ikatan glikosidik

yakni atom C_1 yang mengikat atom O pada polimer xilan. Adanya H^+ pada gugus $-COOH$ dari rantai samping asam glutamat pada xilanase akan mempermudah penyerangan tersebut karena H^+ akan menerima pasangan elektron bebas atom O. Kemudian kompleks enzim-substrat (ES) dihidrolisis oleh H_2O sehingga ikatannya terputus dan terbentuk produk yaitu gula pereduksi (xilosa). Mekanisme reaksi yang terjadi dijelaskan pada gambar 4.1.

4.3 Pengaruh Penambahan Ca^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase

Untuk mengetahui pengaruh penambahan Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase dapat dilakukan dengan cara mengukur aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi Ca^{2+} . Hasil yang diperoleh ditunjukkan pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Kurva aktivitas xilanase fraksi 40-80% pada variasi konsentrasi Ca^{2+}

Berdasarkan gambar 4.2 diketahui bahwa sampel yang mengandung Ca^{2+} dengan konsentrasi rendah yakni 0,2; 0,4; dan 0,6 mM memberikan peningkatan pada aktivitas xilanase bila dibandingkan dengan xilanase tanpa penambahan Ca^{2+} . Ca^{2+} pada konsentrasi ini bertindak sebagai aktivator.

Ca^{2+} dapat berperan sebagai aktivator enzim dalam pembentukan intermediet enzim-substrat. Dalam hal ini Ca^{2+} berperan seperti H^+ dari gugus $-COOH$ asam glutamat yang dapat mempermudah penyerangan ion karboksilat dari asam aspartat terhadap atom C_1 yang mengikat atom O pada ikatan glikosidik

polimer xilan. Ca^{2+} akan menerima pasangan elektron bebas atom O, selanjutnya terjadi hidrolisis oleh H_2O yang menyebabkan ikatan glikosidik polimer xilan terputus dan terbentuk gula pereduksi (xilosa).

Selain berperan sebagai aktivator, Ca^{2+} juga berperan sebagai inhibitor. Pada sampel yang mengandung Ca^{2+} dengan konsentrasi 0,8; 1; 1,2; dan 1,4 mM aktivitas xilanase mengalami penurunan yang berarti bahwa Ca^{2+} pada konsentrasi tersebut berperan sebagai inhibitor enzim xilanase. Jenis inhibisi Ca^{2+} dapat diketahui dengan cara mengukur aktivitas enzim pada variasi konsentrasi substrat tanpa dan dengan penambahan Ca^{2+} .

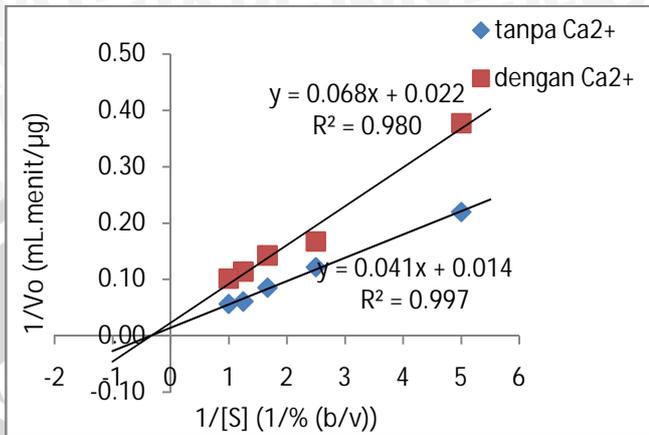
Berdasarkan analisis statistik dengan RAL ditunjukkan bahwa penambahan Ca^{2+} berpengaruh terhadap aktivitas xilanase yang ditunjukkan dengan F hitung $>$ F tabel (data lengkap lampiran O). dan berdasarkan uji BNT 5% ditunjukkan bahwa pada konsentrasi 10 mM hingga 35 mM mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap aktivitas xilanase yang ditunjukkan dengan BNT hitung $>$ BNT 5%.

4.4 Penentuan Nilai Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis

Cara yang dapat digunakan untuk menentukan harga V_m dan K_M sebelum dan setelah adanya inhibitor adalah dengan memplotkan data kinetik sebagai perbandingan terbalik dari konsentrasi substrat ($[S]$) dengan V_0 yaitu menggunakan persamaan Lineweaver-Burk (persamaan 4.2).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (4.2)$$

Berdasarkan gambar 4.3 diperoleh kurva hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_0$ tanpa penambahan Ca^{2+} dengan slope dan intersep masing-masing sebesar 0,041 dan 0,014 sehingga diperoleh nilai V_m 71,43 $\mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ dan K_M 2,93%. Sedangkan pada kurva hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_0$ dengan penambahan Ca^{2+} 1 mM diperoleh slope dan intersep masing-masing sebesar 0,068 dan 0,022 sehingga diperoleh nilai V_m 45,45 $\mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ dan K_M 3,09%.



Gambar 4.3 Kurva hubungan $1/[S]$ dan $1/V_0$

Aktivitas xilanase dipengaruhi oleh adanya inhibitor. Dari hasil perhitungan, diperoleh nilai K_M yang hampir sama namun V_m yang diperoleh memiliki nilai yang berbeda, di mana nilai V_m tanpa Ca^{2+} lebih besar bila dibandingkan dengan nilai V_m dengan Ca^{2+} konsentrasi 1 mM. Sehingga dari gambar 4.3 dan hasil perhitungan V_m dan K_M dapat diketahui bahwa jenis inhibisi Ca^{2+} adalah inhibisi non-kompetitif. Pada kondisi ini, dengan adanya penambahan konsentrasi Ca^{2+} yang semakin meningkat, maka konformasi enzim-substrat menjadi tidak optimal karena enzim telah jenuh dengan Ca^{2+} sehingga Ca^{2+} terikat pada sisi lain enzim yang bukan merupakan sisi aktifnya, yakni pada sisi alosterik (pengaturan) enzim. Dengan adanya Ca^{2+} yang terikat pada sisi alosterik enzim, akan menekan keberadaan gugus aktif sehingga konformasi enzim tidak sesuai dengan substrat dan menghambat pembentukan produk gula pereduksi (xilosa) sehingga menurunkan aktivitas xilanase. Hal ini ditunjukkan pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Inhibisi non-kompetitif

Selain V_m dan K_M , nilai K_i juga perlu ditentukan. K_i yang diperoleh dari hasil perhitungan pada lampiran 14 adalah 1,75 mM. Konstanta inhibisi (K_i) merupakan konstanta yang menggambarkan kesetimbangan disosiasi kompleks enzim-inhibitor (EI). Konstanta inhibisi (K_i) dapat diperoleh dengan membandingkan kedua persamaan Lineweaver-Burk tanpa dan dengan Ca^{2+} . Jika nilai K_i besar maka enzim memiliki afinitas yang rendah terhadap inhibitor sehingga kompleks EI tidak stabil. Sebaliknya jika nilai K_i kecil, maka enzim memiliki afinitas yang tinggi terhadap inhibitor sehingga inhibitor akan terikat dengan kuat pada enzim dan menghambat aktivitas enzim.



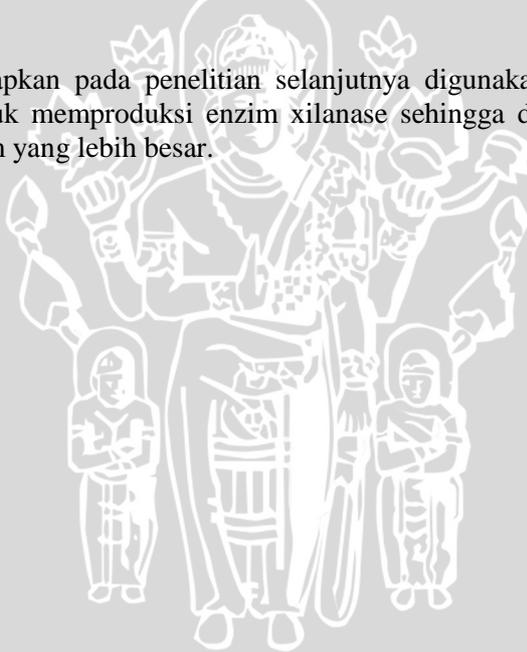
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa penambahan Ca^{2+} pada konsentrasi 5, 10, dan 15 mM, Ca^{2+} meningkatkan aktivitas xilanase (aktivator), sedangkan penambahan Ca^{2+} pada konsentrasi 20, 25, 30, dan 35 mM Ca^{2+} menurunkan aktivitas xilanase (inhibitor). Nilai V_m dan K_M yang diperoleh dari persamaan Lineweaver-Burk untuk enzim tanpa penambahan Ca^{2+} adalah sebesar $71,43 \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ dan $2,93\%$. Sedangkan untuk enzim dengan penambahan Ca^{2+} adalah sebesar $45,45 \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ dan $3,09\%$, serta nilai K_i sebesar $1,75 \text{ mM}$.

5.2 Saran

Diharapkan pada penelitian selanjutnya digunakan kapang jenis lain untuk memproduksi enzim xilanase sehingga didapatkan aktivitas enzim yang lebih besar.



DAFTAR PUSTAKA

- [1] Mayasari, Dian, 2009, **Pengaruh Sumber Karbon terhadap Produksi Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride*, Skripsi**, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
- [2] Budiman, A., dan Setyawan, 2011, **Pengaruh konsentrasi Substrat, Lama Inkubasi, dan pH dalam Proses Isolasi Enzim Xylanase dengan Menggunakan Media Jerami Padi**, Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.
- [3] Hatrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W. and Zupaneie, S., 1996, **Production of Fungal xylanases**, <http://www2.psu.ac.th/PresidentOffice/EduService/journal/27-2-pdf/10xylanase.pdf>, diakses tanggal 10 Februari 2012.
- [4] Richana, N., 2002, **Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia**, Buletin Agrobio 5 (1) 29-35.
- [5] Muawanah, Anna., 2006, **Produksi Enzim Xilanase Termostabil dari *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada Bagasse Tebu**, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [6] Ariani, Yuli, 2007, **Penentuan Kondisi Optimum Biokonversi Selulosa dalam Jerami Padi (*Oryza sativa*) menjadi Glukosa menggunakan *Trichoderma viride*, skripsi**, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
- [7] Boyer, P.D., 1970, **The Enzim**, Academic Press Inc., New York, 465-524.

- [8] Haryati, T., P. A. Marbun, dan T. Purwadaria, 2010, **Ppreservasi Xilanase *Bacillus pumilus* PU4-2 dengan Teknik Imobilisasi pada Pollard dan Penambahan Kation**, JTTV Vol.15 No. 1 Th. 2010: 63-71.
- [9] Sholihah, D. B., 2010, **Pengaruh Pemurnian Enzim dan Penambahan Ion Ca²⁺ terhadap Aktivitas Xilanase dari *Aspergillus niger*, Skripsi**, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
- [10] Hadriyono, R. P. H., Paramyta N. P., dan Fatiqotul H., 2008, **Pembuatan BACOCAN (Baby Corn Candy) sebagai Jajanan Sehat**, Laporan Akhir PKM IPB, Bogor.
- [11] Haryanti, 2004, **Konsumsi dan Kecernaan Bahan Kering Organik dan Protein Kasur dan Rumput Raja dan Hijauan Jagung sebagai Pakan Basal pada Sapi Peranakan Frieslan Holstein**, Skripsi, Fakultas Peternakan, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- [12] Yusra, Fauzi dan Hendy Firmanto, 2011, **Pembuatan Etanol dari Xilan dalam Jerami Padi melalui Degradasi Enzimatik Diikuti Proses Fermentasi menggunakan *Pichia stipitis***, Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS, Surabaya.
- [13] Meryandini, A., Nunuk Widhyastuti, dan Yulin Lestari, 2008, **Pemurnian dan Karakterisasi Xilanase *Streptomyces* sp. SKK1-8**, Makara, Sains, Vol. 12, no. 2.
- [14] Noviana, E., 2008, **Hubungan Lamanya Penimbunan Kayu *Eucalyptus* sp Dilogpond Dengan Perubahan Kandungan Pentosan Pada PT. Toba Pulp Lestari**, Sekolah Pascasarjana, Universitas Sumatra Utara, Medan.

- [15] Nurlaili, N., 2009, **Uji Biologis Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) yang Diolah dengan Ekstrak Metanol dan Fermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae* serta *Trichoderma viride* pada Ayam Broiler**, Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan Fakultas Peternakan IPB, Bogor.
- [16] Waksman, S. A., 1961, **Soil Microbiology**, John Wiley and Sons, London.
- [17] Djafarudin, 2000, **Dasar-dasar Pengendalian Penyakit Tanaman**, Bumi Aksara, Jakarta.
- [18] Poedjiadi, A., 1994, **Dasar-dasar Biokimia**, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- [19] Syamsudin, Sri Purwati, dan Andri Taufick R., 2008, **Efektivitas Aplikasi Enzim dalam Sistem Lumpur Aktif pada Pengolahan Air Limbah Pulp dan Kertas**, Berita Selulosa Vol. 43, hal. 83-92.
- [20] Septiningrum, K., dan Moeis, M.R., 2008, **Isolasi Dan Karakterisasi Xilanase dari *Bacillus circulans***, SITH Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- [21] Cooper, P.D., 1986, **The Enzim**, Academic Press Inc., New York
- [22] Widyasari, Siska., 2008, **Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Xilanase dari *Trichoderma viride***, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

- [23] Widjaja, I.N.K., N.M.P. Susanti, dan I.M.A.G. Wirasuta, 2008, **Buku Ajar Analisis Farmasi Fisiko Kimia**, Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Udayana, Jimbaran.
- [24] Sastrohamidjojo, H., 2001, **Dasar-dasar Spektroskopi**, Liberty, Jogjakarta.
- [25] Lehninger, A.L., 2000, **Dasar-Dasar Biokimia, jilid I**, Alih Bahasa: Thenawidjaja, M., Erlangga, Jakarta.
- [26] Chaplin, M., 2008, **Enzymes and Enzyme Technology**, www.lsbu.ac.uk/biology/enzyme/practical1.html, tanggal akses 24 Februari 2012.
- [27] Lehninger, L. A., 1997, **Dasar-dasar Biokimia**, Jilid 1, Alih bahasa: Maggy Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta.
- [28] Segel, I.H., 1975, **Biochemical Calculation**, 2nd ed, John Wiley and Sons, New York.
- [29] Lehninger, L. A., 1982, **Dasar-dasar Biokimia**, Erlangga, Jakarta.
- [30] Dinoto, W., 1990, **Unsur-unsur Penting Penyusun Tubuh**, Penerbit Lyberty, Yogyakarta.
- [31] Firmansyah, R., 2009, **Pengaruh Penambahan Ion Logam Mg²⁺ terhadap Aktivitas Xilanase dari *Bacillus sp.* dengan Induser Tepung Klobot Jagung**, *Skripsi*, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang.

LAMPIRAN

Lampiran A. Komposisi Media Pertumbuhan

A.1 Media padat

Dua puluh gram kentang, 2 g dekstrosa, dan 1,5 g tepung agar

A.2 Media cair

0,25 gram pepton; 0,1 g KH_2PO_4 ; 0,15 g CaCl_2 ; 0,5 mL asam oleat; 0,7 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 2,0 g tepung klobot jagung



Lampiran B. Preparasi Larutan

B.1 Pembuatan air bebas reduktor

Satu liter akuades ditambahkan KMnO_4 hingga berwarna merah kemudian didestilasi sehingga diperoleh air bebas reduktor.

B.2 Pembuatan larutan stok glukosa 1500 $\mu\text{g/mL}$

Sebanyak 0.15 gram glukosa anhidrat ditimbang dan dilarutkan dengan akuades dalam gelas beaker, kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas.

B.3 Pembuatan larutan baku gula pereduksi

Larutan stok glukosa 1500 $\mu\text{g/mL}$ dipipet (2; 4; 6; 6,8; dan 8)mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan gula konsentrasi 300, 600, 900, 1000 dan 1200 $\mu\text{g/mL}$.

B.4 Pembuatan larutan asam asetat 0,2 M

Larutan ini dibuat dengan pengenceran asam asetat glasial 100 % (Bj: 1,05 g/mL; BM: 60 g/mol; konsentrasi 17,5 M). Dipipet 1,15 mL asam asetat glasial dengan pipet ukur 5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian diencerkan dengan aquades hingga tanda batas.

B.5 Pembuatan larutan natrium asetat 0,2 M

Larutan ini dibuat dengan pengenceran natrium asetat (BM: 82,02 g/mol). Na-asetat sebanyak 1,64 gram dilarutkan dengan akuades secukupnya dan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

B.6 Pembuatan reagen DNS (asam dinitrosalisilat)

Sebanyak 1 gram NaOH ; 18,2 gram Na-K Tartarat; 0,2 gram fenol dan 0,5 gram Na_2SO_3 dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam beaker glass 100 mL. Ditambahkan 1 gram asam dinitrosalisilat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan magnetik stirer. Setelah larut, dipindahkan dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas.

B.7 Pembuatan substrat xilan 1%

Sebanyak 1 gr xilan ditimbang kemudian dimasukkan dalam beaker glass 100 mL dan dilarutkan dengan buffer asetat pH 5 secukupnya. Dipindahkan larutan dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan buffer asetat pH 5 hingga tanda batas.

B.8 Pembuatan substrat xilan 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 % (b/v)

Substrat xilan 1% dipipet sebanyak 2, 4, 6, 8 mL dan dipindahkan dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan larutan buffer asetat pH 5 sampai tanda batas.

B.9 Pembuatan larutan CaCl_2 5; 10; 15; 20; 25; 30; dan 35 mM

Kalsium klorida (CaCl_2) ditimbang sebanyak 0,55 gram (BM CaCl_2 110,99 g/mol), dilarutkan dengan akuades dan diencerkan dalam labu ukur 100 mL (CaCl_2 50 mM). CaCl_2 50mM dipipet sebanyak 1; 2; 3; 4; 5; 6; dan 7mL, dimasukkan dalam ukur 10 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan CaCl_2 5; 10; 15; 20; 25; 30; dan 35 mM.



Lampiran C. Perhitungan Preparasi Larutan

C.1 Larutan asam asetat 0,2 M

Larutan asam asetat 0,2 M dibuat dari asam asetat glasial 100% (Bj: 1,05 gr/mL; BM: 60 gr/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi asam asetat glasial} &= \frac{\text{Berat Jenis}}{\text{BM}} \\ &= \frac{1,05 \times 1000 \text{ gr/L}}{60 \text{ gr/mol}} \\ &= 17,5 \text{ M}\end{aligned}$$

Untuk membuat konsentrasi 0,2 M dilakukan pengenceran dengan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 17,5 &= 100 \times 0,2 \\ V_1 &= 1,143 \text{ mL}\end{aligned}$$

Dipipet larutan asam asetat dengan pipet ukur 5 mL sebanyak 1,15 mL, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

C.2 Larutan natrium asetat 0,2 M

Larutan natrium asetat 0,2 M dibuat sebanyak 100 mL (BM $\text{CH}_3\text{COONa} = 82,02 \text{ gr/mol}$):

$$\begin{aligned}\text{mol CH}_3\text{COONa} &= [\text{CH}_3\text{COONa}] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Berat CH}_3\text{COONa} &= \text{mol CH}_3\text{COONa} \times \text{BM CH}_3\text{COONa} \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 80,02 \text{ gr/mol} \\ &= 1,6 \text{ gram}\end{aligned}$$

C.3 Larutan Buffer Asetat pH 5

Untuk mendapatkan larutan buffer dengan pH yang diharapkan dibuat dengan mencampurkan larutan asam asetat dengan larutan natrium asetat berdasarkan persamaan di bawah ini:

$$\text{pH} = \text{pKa} - \log \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}$$

Untuk membuat larutan buffer asetat pH 5 maka 50 mL larutan asam asetat ditambah dengan 90,99 mL larutan Na-asetat dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{pKa Asam asetat} = 4,74$$

$$5 = 4,74 - \log \frac{(50 \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}) / (50+v) \text{ mL}}{V \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} / (50+v) \text{ mL}}$$

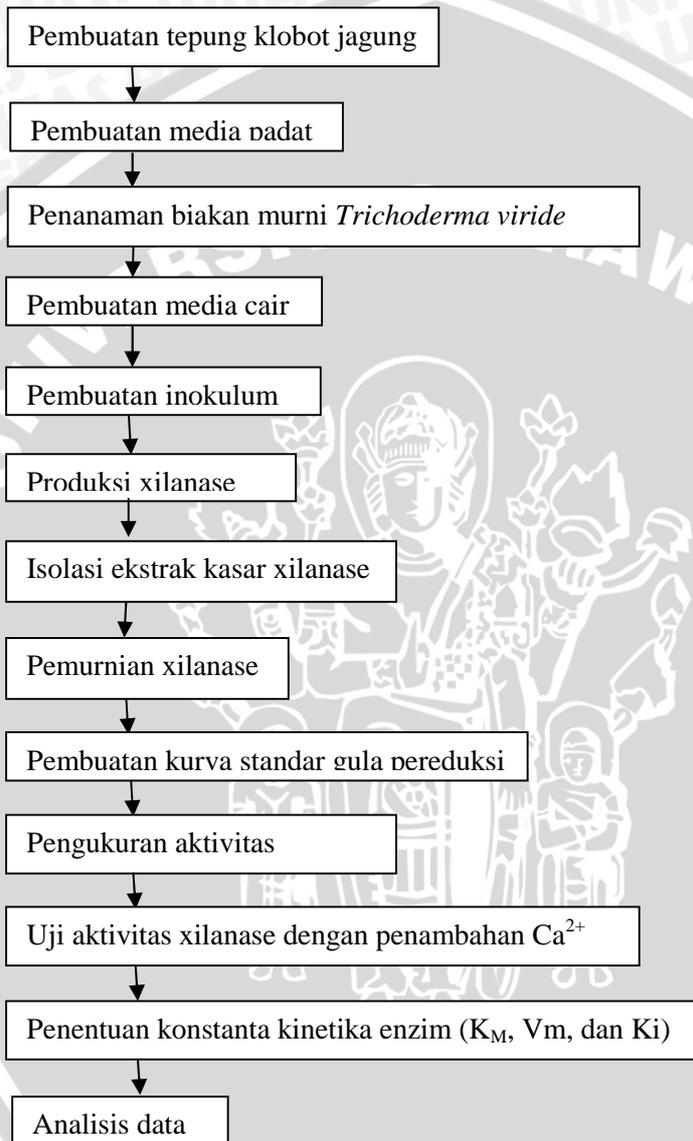
$$5 = 4,74 - \log \frac{50}{V}$$

$$V = 90,99 \text{ mL}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



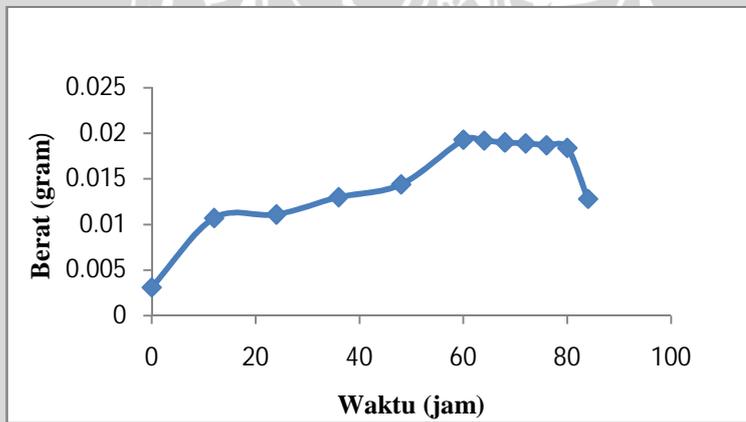
Lampiran D. Tahapan Kerja



Lampiran E. Kurva pertumbuhan *Trichoderma viride*

Tabel E.1 Data pertumbuhan *Trichoderma viride*

Waktu (jam ke)	Berat kering sel (gram)		
	I	II	Rata-rata
0	0,0026	0,0036	0,0031
12	0,0106	0,0108	0,0107
24	0,0109	0,0112	0,0111
36	0,0139	0,0121	0,0130
48	0,0157	0,0131	0,0144
60	0,0194	0,0192	0,0193
64	0,0193	0,0190	0,0192
68	0,0192	0,0188	0,0190
72	0,0190	0,0187	0,0189
76	0,0186	0,0187	0,0187
80	0,0183	0,0184	0,0184
84	0,0126	0,0130	0,0128



Gambar E.1 Kurva pertumbuhan *Trichoderma viride*

Lampiran F. Fraksinasi menggunakan Ammonium Sulfat

Banyaknya ammonium sulfat yang ditambahkan dalam 100 mL ekstrak kasar xilanase dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel F.1 Berat (gram) Ammonium sulfat pada berbagai fraksi (% kejenuhan)

		Final concentration of ammonium sulphate-% saturation at 0°C																
		g solid ammonium sulphate to add to 100 ml of solution																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	10,5	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	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	52,5	57	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	11,1	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	2,8	5,7	8,7	11,8	15,1	18,4	21,8	25,4	29,1	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	29,5	33,5	37,6	41,8	
45						0	2,9	5,9	9,0	12,3	15,6	19,0	22,6	26,3	30,2	34,2	38,3	
50							0	3	5,0	9,2	12,5	15,9	19,4	23,0	26,8	30,8	34,8	
55								0	3,0	6,1	9,3	12,7	16,1	19,7	23,5	27,3	31,3	
60									0	3,1	6,2	9,5	12,9	16,4	20,1	23,9	27,9	
65										0	3,1	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	3,2	6,6	10,1	13,7	17,4	
80													0	3,3	6,7	10,3	13,9	
85														0	3,4	6,8	10,5	
90															0	3,4	7	
95																0	3,5	
100																	0	

Lampiran G. Aktivitas Spesifik Xilanase pada Berbagai Fraksi

Tabel G.1 Aktivitas spesifik xilanase dari *Aspergillus niger* pada berbagai fraksi

Fraksi	Aktivitas spesifik (Unit.mg ⁻¹)
Ekstrak kasar	3,165
0-40%	44,127
40-80%	82,401
80-100%	0,832

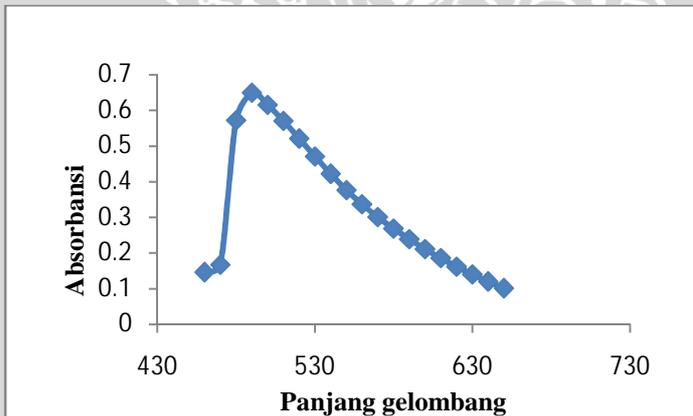
Tabel G.2 Aktivitas spesifik xilanase dari *Bacillus sp.* pada berbagai fraksi

Fraksi	Aktivitas spesifik (Unit.mg ⁻¹)
Ekstrak kasar	0,6599
0-40%	3,4283
40-80%	7,4766
80-100%	3,9553

Lampiran H. Panjang Gelombang Maksimum

Tabel H.1 Data absorbansi gula pereduksi pada $\lambda = 460-650 \text{ nm}$

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi (A)	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi (A)
460	0,146	560	0,337
470	0,167	570	0,301
480	0,573	580	0,269
490	0,650	590	0,239
500	0,616	600	0,211
510	0,571	610	0,186
520	0,521	620	0,162
530	0,471	630	0,140
540	0,422	640	0,120
550	0,377	650	0,101

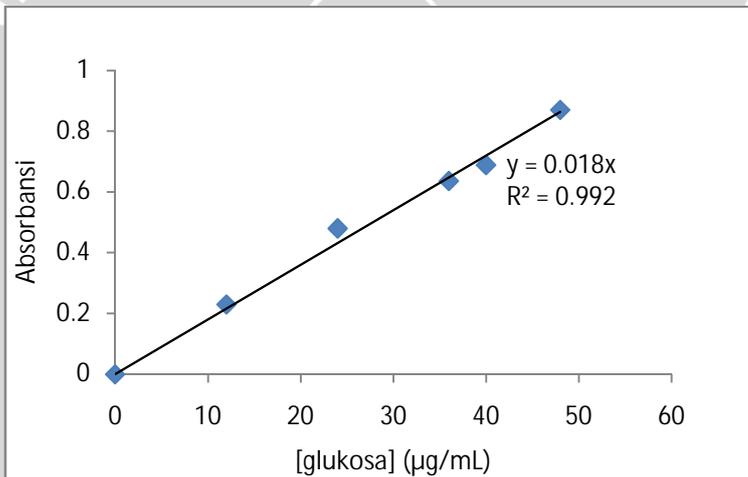


Gambar H.1 Kurva panjang gelombang maksimum gula pereduksi

Lampiran I. Kurva Standar Gula Pereduksi

Tabel I.1 Data absorbansi gula pereduksi

Konsentrasi glukosa ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	A rata-rata
12	0,230	0,230	0,229	0,230
24	0,474	0,482	0,484	0,480
36	0,628	0,641	0,639	0,636
40	0,680	0,691	0,695	0,689
48	0,823	0,897	0,889	0,870



Gambar I.1 Kurva standar gula pereduksi

Lampiran J. Aktivitas Xilanase

Tabel J.1 Data absorbansi xilanase pada $\lambda = 490$ nm

Fraksi enzim	Absorbansi			
	A1	A2	A3	A rata-rata
Ekstrak kasar	0,618	0,660	0,652	0,643
Fraksi 40-80%	0,539	0,599	0,601	0,580

Tabel J.2 Data aktivitas xilanase pada $\lambda = 490$ nm

Fraksi enzim	A rata-rata	Konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas Enzim ($\mu\text{g/mL. menit}$)
Ekstrak kasar	0,643	35,74	16,25
Fraksi 40-80%	0,580	32,20	14,64

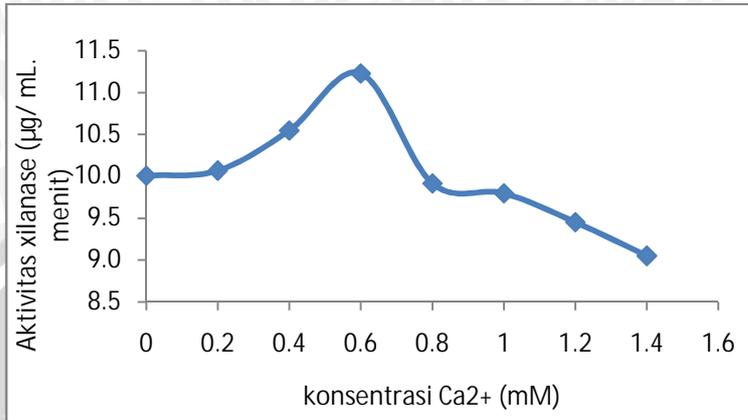
Lampiran K. Aktivitas xilanase fraksi 40-80% pada variasi konsentrasi Ca^{2+}

Tabel K.1 Absorbansi xilanase fraksi 40-80% pada variasi konsentrasi Ca^{2+}

Konsentrasi Ca^{2+} (mM)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	A rata-rata
0	0,381	0,401	0,407	0,396
0,2	0,394	0,398	0,404	0,399
0,4	0,416	0,418	0,419	0,418
0,6	0,443	0,448	0,443	0,445
0,8	0,387	0,393	0,398	0,393
1	0,390	0,388	0,386	0,388
1,2	0,374	0,373	0,376	0,374
1,4	0,350	0,363	0,362	0,358

Tabel K.2 Aktivitas xilanase fraksi 40-80% pada variasi konsentrasi Ca^{2+}

Konsentrasi Ca^{2+} (mM)	Absorbansi	Konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas xilanase ($\mu\text{g/mL.menit}$)
0	0,396	22,02	10,01
0,2	0,399	22,15	10,07
0,4	0,418	23,20	10,55
0,6	0,445	24,70	11,23
0,8	0,393	21,81	9,92
1	0,388	21,56	9,80
1,2	0,374	20,80	9,45
1,4	0,358	19,91	9,05



Gambar K.1 Kurva aktivitas xilanase fraksi 40-80% pada variasi konsentrasi Ca²⁺



Lampiran L. Pengukuran Konstanta Kinetika Vm, KM dan Ki

Tabel L.1 Data absorbansi xilanase fraksi 40-80% dengan variasi konsentrasi substrat pada $\lambda = 490$ nm

Konsentrasi xilan % (b/v)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	A rata-rata
0,2	0,177	0,184	0,180	0,180
0,4	0,321	0,325	0,330	0,325
0,6	0,454	0,470	0,468	0,464
0,8	0,638	0,658	0,658	0,651
1	0,686	0,711	0,705	0,701

Tabel L.2 Data aktivitas xilanase fraksi 40-80% dengan variasi konsentrasi substrat pada $\lambda = 490$ nm

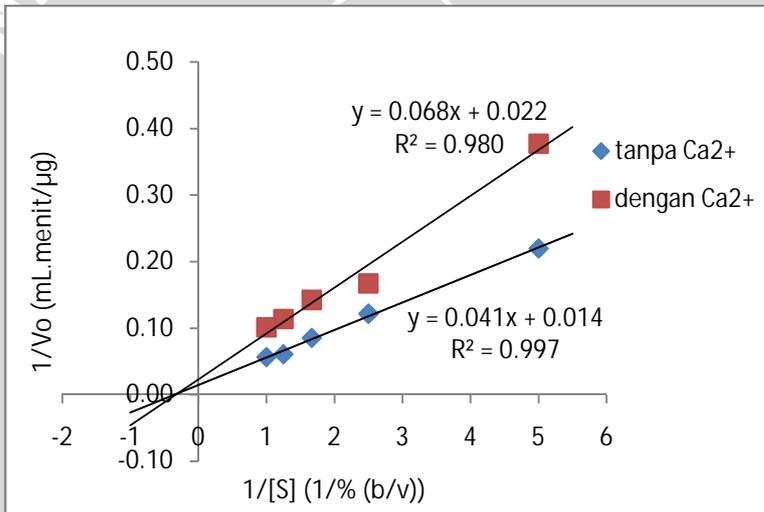
Konsentrasi substrat % (b/v)	Konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas xilanase ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$)	1/[S]	1/V ₀
0,2	10,02	4,55	5	0,22
0,4	18,07	8,22	2,5	0,12
0,6	25,78	11,72	1,67	0,09
0,8	36,19	16,45	1,25	0,06
1	38,93	17,69	1	0,06

Tabel L.3 Data absorbansi xilanase fraksi 40-80% dengan konsentrasi Ca^{2+} 1 mM pada $\lambda = 490$ nm

Konsentrasi xilan % (b/v)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	A rata-rata
0,2	0,102	0,105	0,107	0,105
0,4	0,233	0,240	0,237	0,237
0,6	0,273	0,279	0,283	0,278
0,8	0,344	0,346	0,355	0,348
1	0,393	0,392	0,389	0,391

Tabel L.4 Data aktivitas xilanase fraksi 40-80% dengan konsentrasi Ca^{2+} 1 mM pada $\lambda = 490 \text{ nm}$

Konsentrasi substrat % (b/v)	Konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas xilanase ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$)	1/[S]	1/V ₀
0,2	5,83	2,65	5	0,38
0,4	13,17	5,98	2,5	0,17
0,6	15,44	7,02	1,67	0,14
0,8	19,33	8,79	1,25	0,11
1	21,72	9,87	1	0,10



Gambar L.1 Grafik hubungan $1/V_0$ dengan $1/[S]$

Lampiran M. 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:

$$AE = [\text{Gula pereduksi}] \times \frac{v \cdot fp}{p \cdot q}$$

Dengan

- AE = aktivitas enzim ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$)
- V = volume total sampel tiap tabung (mL)
- fp = faktor pengenceran
- p = volume ekstrak kasar enzim (mL)
- q = waktu reaksi (menit)

Contoh perhitungan :

Data absorbansi rata-rata xilanase murni fraksi 40-80% pada $\lambda = 490$ nm adalah 0,580. Sedangkan persamaan regresi linear pada kurva standar gula pereduksi yaitu $y = 0,00072 x$, sehingga dapat ditentukan konsentrasi gula pereduksi.

$$\begin{aligned}y &= 0,018 x \\0,580 &= 0,018 x \\x &= \frac{0,580}{0,018} \\&= 32,20 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

Dengan demikian maka dapat ditentukan aktivitas xilanase:

$$\begin{aligned}AE &= [\text{Gula pereduksi}] \times \frac{v \cdot fp}{p \cdot q} \\&= 32,20 \mu\text{g/mL} \times \frac{25 \text{ mL} \times 1}{1 \text{ mL} \times 55 \text{ menit}} \\&= 14,64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}\end{aligned}$$

Lampiran N. Perhitungan Harga V_m , K_M , K_i

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

- ❖ Tanpa menggunakan Ca^{2+}

$$y = 0,041x + 0,014$$

$$\frac{1}{V_m} = 0,014$$

$$V_m = 71,43 \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$$

$$\frac{K_M}{V_m} = \frac{K_M}{71,43} = 0,041$$

$$K_M = 2,93\%$$

- ❖ Menggunakan Ca^{2+}

$$y = 0,068x + 0,022$$

$$\frac{1}{V_m} = 0,022$$

$$V_m = 45,45 \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$$

$$\frac{K_M}{V_m} = \frac{K_M}{45,45} = 0,068$$

$$K_M = 3,09\%$$

- ❖ Penentuan konstanta inhibisi

Membandingkan persamaan Lineweaver-Burk tanpa dan menggunakan Ca^{2+} :

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

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

Sehingga,

$$71,43 \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1} = (1 + \frac{[I]}{K_i}) \cdot V_m \text{ dengan inhibisi}$$

$$71,43 \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1} = (1 + \frac{[I]}{K_i}) \cdot 45,45 \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$$

$$(1 + \frac{[I]}{K_i}) = 1,57$$

$$\frac{[I]}{K_i} = 0,57$$

$$K_i = \frac{1 \text{ mM}}{0,57}$$

$$K_i = 1,75 \text{ mM}$$

Lampiran O. Analisis statistika

O.1 Aktivitas xilanase dengan penambahan Ca^{2+}

Data aktivitas xilanase fraksi 40-80% dengan penambahan variasi konsentrasi Ca^{2+} dianalisis menggunakan pola rancangan acak lengkap:

Konsentrasi Ca^{2+} (mM)	Aktivitas Enzim ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{Menit}^{-1}$)			Jumlah	Rataan
	1	2	3		
0	9,62	10,13	10,28	30,03	$10,01 \pm 0,34$
5	9,95	10,05	10,20	30,20	$10,07 \pm 0,13$
10	10,51	10,56	10,58	31,64	$10,55 \pm 0,04$
15	11,19	11,31	11,19	33,69	$11,23 \pm 0,07$
20	9,77	9,92	10,05	29,75	$9,92 \pm 0,14$
25	9,85	9,80	9,75	29,39	$9,80 \pm 0,05$
30	9,44	9,42	9,49	28,36	$9,45 \pm 0,04$
35	8,44	9,17	9,14	27,15	$9,05 \pm 0,18$

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh penambahan Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase, maka dilakukan analisis dengan menggunakan uji F dengan cara sebagai berikut:

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$\text{FK} = \frac{[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2]}{np} = \frac{57697,01}{3 \cdot 8} = 2404,04$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK total = $[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2] - \text{FK}$
 $= 2413,64 - 2404,04$
 $= 9,59$

- b. JK Perlakuan (JKp) = $\frac{[\sum_{i=1}^p (\sum_{j=1}^n Y_{ij})^2]}{n_1} - \text{FK}$
 $= 2413,24 - 2404,04$
 $= 9,20$

- c. JK percobaan (JKg) = JK total – JK perlakuan
 $= 9,59 - 9,20$
 $= 0,40$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT) Setiap Sumber Keragaman

$$\begin{aligned} \text{a. Kuadrat tengah perlakuan (KT}_p) &= \frac{JK_p}{db\ perlakuan} \\ &= \frac{9,20}{7} \\ &= 1,31 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. Kuadrat Tengah galat percobaan (KT}_G) &= \frac{JK_{GP}}{db\ percobaan} \\ &= \frac{0,40}{16} \\ &= 0,02 \end{aligned}$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KT_p}{KT_G} = \frac{1,31}{0,02} = 53,11$$

$$F_{tabel} = F(0,05; 7; 16) = 2,66$$

Karena $F_{hitung} > F_{tabel}$ maka H_0 ditolak yang artinya Ca^{2+} berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas xilanase, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$

❖ Menghitung nilai BNT dengan $\alpha = 5\%$

$$BNT(\alpha) = t_{dbg}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2 KT_{galat}}{n}}$$

$$\begin{aligned} BNT(0,05) &= t_{16}^{0,025} \sqrt{\frac{2 \times 0,02}{3}} \\ &= t_{16}^{0,025} \times 0,13 \\ &= 0,27 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-ran dari ketujuh variasi Ca^{2+} yang disusun dari nilai terkecil hingga nilai terbesar.

Tabel O.1 Analisis ragam satu arah pengaruh Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel}
Perlakuan	7	9,20	1,31	53,11	2,66
Galat percobaan	16	0,40	0,02		
Total	23	9,59			

Tabel O.2 Data uji BNT pengaruh Ca^{2+} terhadap aktivitas xilanase

Ca^{2+}	Ca^{2+}	35	30	25	20	0	5	10	15
	Rataan	9,0	9,4	9,8	9,9	10,0	10,0	10,5	11,
	n	5	5	0	2	1	7	5	23
35	9,05	0,0	0,4	0,7	0,8	0,96	1,02	1,50	2,1
		0	0	5	7				8
30	9,45		0,0	0,3	0,4	0,56	0,61	1,09	1,7
			0	5	6				8
25	9,80			0,0	0,1	0,21	0,27	0,75	1,4
				0	2				3
20	9,92				0,0	0,09	0,15	0,63	1,3
					0				1
0	10,01					0,00	0,06	0,54	1,2
									2
5	10,07						0,00	0,48	1,1
									6
10	10,55							0,00	0,6
									8
15	11,23								0,0
									0
Notasi		a	b	c	cd	de	ef	g	h

Keterangan:

a, b, c, g, h = berbeda nyata

cd, de, ef = tidak berbeda nyata