

**Optimasi Amobilisasi Urease dari *Schizosaccharomyces pombe*  
Menggunakan Matrik Kitosan-Natrium Tripolifosfat**

**SKRIPSI**

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

oleh :

**IVONE FATMAWATI**

**0910920013**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**Optimasi Amobilisasi Urease dari *Schizosaccharomyces pombe*  
Menggunakan Matrik Kitosan-Natrium Tripolifosfat**

oleh :

**IVONE FATMAWATI  
0910920013**

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

Pembimbing I

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS  
NIP. 196304041987011001

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc  
NIP. 195807111992032002

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Edi Priyo Utomo, MS  
NIP. 195712271986031003

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ivone Fatmawati  
NIM : 0910920013  
Jurusan : Kimia  
Penulis skripsi berjudul : Optimasi Amobilisasi Urease dari  
*Schizosaccharomyces pombe* Menggunakan Matrik Kitosan-  
Natrium tripolifosfat

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 diisi 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,  
Yang menyatakan,

(Ivone Fatmawati)  
NIM. 0910920013

# Optimasi Amobilisasi Urease dari *Schizzosaccharomyces pombe* Menggunakan Matrik Kitosan-Natrium Tripolifosfat ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk menentukan kondisi optimum urease yang diamobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat. Urease yang digunakan diisolasi dari *Schizzosaccharomyces pombe* dan dimurnikan melalui metode pemurnian bertingkat menggunakan amonium sulfat fraksi 30–45%. Urease merupakan enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis urea menjadi ammonia dan karbondioksida. Aktivitas urease ditentukan berdasarkan jumlah mikromol ammonia yang dihasilkan per mL enzim per menit dimana kadar ammonia ditentukan dengan spektrofotometri melalui penambahan reagen Nessler. Urease diamobilisasi menggunakan metode penjebakan dalam kitosan-natrium tripolifosfat. Kondisi optimum amobilisasi urease dipelajari dengan menentukan aktivitas tertinggi pada variasi konsentrasi kitosan (1,5 ; 2,0 ; 2,5 ; 3,0 ; 3,5) % w/v, konsentrasi urease (0,840 ; 1,680 ; 2,520 ; 3,360 ; 4,200) mg/mL, dan efisiensi penggunaan ulang urease amobil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan optimum yaitu 2,5% (w/v) dan konsentrasi urease optimum pada 2,520 mg/mL dengan aktivitas tertinggi sebesar 0,57 unit. Efisiensi penggunaan urease amobil menggunakan matrik kitosan-natrium tripolifosfat dapat digunakan sebanyak 4 kali dengan aktivitas sebesar 65,62%.

*Kata kunci : aktivitas, efisiensi, kitosan-natrium tripolifosfat, Schizzosaccharomyces pombe, urease*

# Optimization of Immobilized Urease from *Schizosaccharomyces pombe* Using Matrix Chitosan-Sodium Tripolyphosphate

## ABSTRACT

The research to determine optimum condition of immobilized urease has been done. Urease was isolated from *Schizosaccharomyces pombe* and was purified through fractional purification method using ammonium sulphate saturation of 30– 45%. Urease is an enzyme that has the ability to hydrolyze of urea into carbon dioxide and ammonia. The activity of urease was defined as the amount of micromol ammonia per mL enzyme per minute and resulted ammonia was analyzed by spectrofotometri using Nessler reagen. Urease was immobilized by entrapment method in chitosan-sodium tripolyphosphate. The optimum condition of immobilization urease was studied by determining the highest activity in various chitosan concentration (1.5 ; 2.0 ; 2.5 ; 3.0 ; 3.5) % w/v, urease concentration (0.840 ; 1.680 ; 2.520 ; 3.360 ; 4.200) mg/mL, and efficiency of immobilized urease. The result of this experiment showed that the optimum chitosan concentration was 2.5% w/v while the optimum urease concentration was 2.520 mg/mL with the highest activity of 0.57 units. Efficiency of immobilized urease using chitosan-sodium tripolyphosphate matrix can be performed four repetitions with activity of 65.62%

*Keywords :* activity, chitosan-sodium tripolyphosphate, efficiency, *Schizosaccharomyces pombe*, urease



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Yang Maha Mendengar lagi Maha Melihat dan atas segala limpahan rahmat, hidayah, serta karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Optimasi Amobilisasi Urease dari *Schizzosaccharomyces pombe* Menggunakan Matrik Kitosan-Natrium Tripolifosfat** ini tepat pada waktunya. Penyusunan tugas akhir ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam Jurusan Kimia di Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis secara khusus menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS, selaku Dosen Pembimbing I, atas bimbingan, pengarahan, kesabaran, dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc, selaku Dosen Pembimbing II, atas bimbingan, pengarahan, kesabaran, dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
3. Dr. Ir. Chasan Bisri, selaku dosen pembimbing akademik.
4. Dr. Edi Priyo Utomo, MS, selaku Ketua Jurusan Kimia, serta segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia.
5. Ayah, ibu, dan kakak-kakakku tercinta atas motivasi, perhatian, do'a yang tak pernah putus, dan dukungan baik material maupun moril yang menjadi semangat bagi penulis sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
6. Dan semua pihak yang telah membantu selama penelitian sampai terselesaikannya tugas akhir ini.

Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini masih jauh dari sempurna. Dengan segala kerendahan hati, penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembaca untuk kesempurnaan tugas akhir ini, sehingga dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, Juni 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b>	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI</b>	ii
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b>	iii
<b>ABSTRAK</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>KATA PENGANTAR</b>	vi
<b>DAFTAR ISI</b>	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	ix
<b>DAFTAR TABEL</b>	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	xii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	5
2.1 Enzim	5
2.2 Urease	5
2.3 <i>Shizzosaccharomyces pombe</i>	5
2.4 Isolasi Enzim	6
2.5 Pemurnian Enzim	7
2.6 Amobilisasi Enzim	7
2.7 Kitosan-Tripolifosfat	10
2.8 Hipotesis	11
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b>	12
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	12
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	12
3.2.1 Bahan Penelitian	12
3.2.2 Bahan Kimia	12
3.2.3 Alat Penelitian	12
3.3 Tahapan Penelitian	13
3.4 Prosedur Kerja Penelitian	14
3.4.1 Pembuatan Media Padat	14
3.4.2 Pembuatan Media Cair	14
3.4.3 Peremajaan Biakan Murni <i>Schizzosaccharomyces pombe</i>	15
3.4.4 Pembuatan Inokulum	15
3.4.5 Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Urease dari	15

*Shizosaccharomyces pombe*

3.4.6 Pemurnian Ekstrak Kasar Urease	15
3.4.7 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein	16
3.4.8 Pembuatan Kurva Standar Larutan Kasein	17
3.4.9 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Ammonia	17
3.4.10 Pembuatan Kurva Standar Larutan Ammonia	18
3.4.11 Uji Kadar Protein Awal	18
3.4.12 Penentuan Aktivitas Urease Bebas	19
3.4.13 Preparasi Matrik Kitosan	20
3.4.14 Amobilisasi Urease	20
3.4.14.1 Penentuan Konsentrasi Kitosan Optimum	20
3.4.14.2 Penentuan Konsentrasi Urease Optimum	20
3.4.15 Uji Kadar Protein Sisa	21
3.4.16 Penentuan Aktivitas Urease Amobil	21
3.4.17 Penentuan Efisiensi Penggunaan Ulang Urease Amobil	22
3.4.18 Analisa Data	22
<b>BAB IV. PEMBAHASAN</b>	23
4.1 Amobilisasi Urease dalam Kitosan-Natrium Tripolifosfat	23
4.2 Penentuan Konsentrasi Kitosan Optimum	25
4.3 Penentuan Konsentrasi Urease Optimum	27
4.4 Penentuan Efisiensi Penggunaan Ulang Urease Amobil	29
<b>BAB V. PENUTUP</b>	31
5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran	31
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	32
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b>	38



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 :	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	6
Gambar 2.2 :	Enzim terikat secara adsorpsi fisik	8
Gambar 2.3 :	Ikatan ionik antara enzim dengan matrik	8
Gambar 2.4 :	Ikatan kovalen antara enzim dengan matrik	9
Gambar 2.5 :	Ikatan silang antara enzim dengan matrik	9
Gambar 2.6 :	Enzim terikat pada kisi-kisi polimer	9
Gambar 2.7 :	Enzim terikat pada kantong membran semipermeabel	10
Gambar 2.8 :	Struktur kitosan	10
Gambar 2.9 :	Struktur senyawa tripolifosfat yang berikatan dengan kitosan	11
Gambar 4.1 :	Reaksi disosiasi natrium tripolifosfat	24
Gambar 4.2 :	Ikatan silang antara kitosan dengan natrium-tripolifosfat	24
Gambar 4.3 :	Grafik hubungan konsentrasi kitosan terhadap jumlah urease yang terjebak (mg) pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat	25
Gambar 4.4 :	Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas urease amobil pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat	26
Gambar 4.5 :	Grafik hubungan konsentrasi urease terhadap jumlah urease yang terjebak (mg) pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat	28
Gambar 4.6 :	Pengaruh konsentrasi urease terhadap aktivitas urease amobil pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat	28
Gambar C.1:	Kurva penentuan panjang gelombang maksimum ammonia 2 ppm	48
Gambar D.1:	Kurva standar ammonia	49
Gambar E.1:	Kurva penentuan panjang gelombang maksimum kasein 5000 ppm	50
Gambar F.1:	Kurva standar kasein	51

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	: Pengaruh penggunaan ulang urease amobil terhadap aktivitas	30
Tabel C.1	: Data absorbansi larutan ammonia 2 ppm pada berbagai panjang gelombang	48
Tabel D.1	: Data absorbansi kurva standar ammonia	49
Tabel E.1	: Data absorbansi larutan kasein 5000 ppm pada berbagai panjang gelombang	50
Tabel F.1	: Data absorbansi larutan kasein	51
Tabel G.1	: Data absorbansi uji kadar protein sisa penentuan konsentrasi kitosan optimum	52
Tabel G.2	: Data absorbansi uji aktivitas urease amobil penentuan konsentrasi kitosan optimum	52
Tabel G.3	: Data absorbansi uji kadar protein sisa penentuan konsentrasi urease optimum	53
Tabel G.4	: Data absorbansi uji aktivitas urease amobil penentuan konsentrasi urease optimum	53
Tabel G.5	: Data absorbansi uji aktivitas penggunaan ulang urease amobil	54
Tabel I.1	: Aktivitas urease bebas	57
Tabel I.2	: Kadar protein urease awal	58
Tabel I.3	: Volume larutan urease setelah amobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi [kitosan])	59
Tabel I.4	: Jumlah urease yang tidak terjebak setelah amobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi [kitosan])	60
Tabel I.5	: Jumlah urease terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi [kitosan])	61
Tabel I.6	: Volume larutan urease setelah amobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi [urease])	62
Tabel I.7	: Jumlah urease yang tidak terjebak setelah amobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi urease))	63
Tabel I.8	: Jumlah urease terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi [urease])	64
Tabel I.9	: Aktivitas urease variasi konsentrasi kitosan	65

Tabel I.10 : Aktivitas urease variasi konsentrasi urease	65
Tabel I.11 : Aktivitas urease amobil penggunaan ulang (efisiensi)	66
Tabel I.12 : Persen (%) efisiensi	66
Tabel J.1 : Jumlah urease yang terjebak pada variasi konsentrasi kitosan	67
Tabel J.2 : Data analisa varian satu arah	69
Tabel J.3 : Data uji BNT urease yang terjebak pada variasi konsentrasi kitosan	69
Tabel J.4 : Aktivitas urease pada variasi konsentrasi kitosan	70
Tabel J.5 : Data analisa varian satu arah	72
Tabel J.6 : Data uji BNT aktivitas urease variasi konsentrasi kitosan	72
Tabel J.7 : Jumlah urease yang terjebak pada variasi konsentrasi urease	73
Tabel J.8 : Data analisa varian satu arah	74
Tabel J.9 : Data uji BNT urease yang terjebak pada variasi konsentrasi urease	74
Tabel J.10 : Aktivitas urease pada variasi konsentrasi urease	74
Tabel J.11 : Data analisa varian satu arah	75
Tabel J.12 : Data uji BNT aktivitas urease variasi konsentrasi urease	76
Tabel J.13 : Aktivitas urease amobil penggunaan ulang (efisiensi)	76
Tabel J.14 : Data analisa varian satu arah	77
Tabel J.15 : Data uji BNT aktivitas urease amobil penggunaan ulang (efisiensi)	78

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Tahapan Penelitian	38
Lampiran B. Preparasi Larutan	39
B.1 Larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,2 M	39
B.2 Larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,2 M	39
B.3 Larutan Buffer Fosfat 0,2 M pH 7	39
B.4 Larutan Buffer Fosfat 0,2 M pH 8	40
B.5 Larutan Asam Asetat 0,1 M	41
B.6 Larutan Buffer Asetat pH 5,5	41
B.7 Larutan Baku Kasein 1000-10000 ppm	43
B.7.1 Larutan Baku Kasein 10000 ppm	43
B.7.2 Larutan Baku Kasein 1000-9000 ppm	43
B.8 Reagen Biuret	44
B.9 Reagen Nessler	44
B.10 Larutan HCl 0,1 M	44
B.11 Larutan $\text{BaCl}_2$ 0,1 M	44
B.12 Larutan Stok Ammonia 500 ppm	44
B.13 Larutan Standar Ammonia	45
B.14 Larutan NaOH 0,1 M	45
B.15 Larutan NaOH 1 M	45
B.16 Larutan NaOH 10%	46
B.17 Larutan Urea 0,2 mM	46
B.18 Larutan $\text{CH}_3\text{COOH}$ 3%	46
B.19 Larutan Kitosan	46
B.20 Larutan $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ 3%	47
B.21 Larutan $\text{CCl}_3\text{COOH}$ 8% (w/v)	47
Lampiran C. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Ammonia	48
Lampiran D. Kurva Standar Ammonia	49
Lampiran E. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein	50
Lampiran F. Kurva Standar Kasein	51
Lampiran G. Data Pengamatan	52
G.1 Amobilisasi Urease Penentuan Konsentrasi Kitosan Optimum	52
G.1.1 Data Absorbansi Uji Kadar Protein Sisa	52
G.1.2 Data Absorbansi Uji Aktivitas Urease Amobil	52
G.2 Amobilisasi Urease Penentuan Konsentrasi Urease Optimum	53

G.2.1 Data Absorbansi Uji Kadar Protein Sisa	53
G.2.2 Data Absorbansi Uji Aktivitas Urease Amobil	53
G.3 Data Absorbansi Penentuan Efisiensi Penggunaan Ulang Urease Amobil	54
G.3.1 Data Absorbansi Uji Aktivitas Urease Amobil	54
Lampiran H. Pemurnian Urease	55
H.1 Pemurnian Ekstak Kasar Urease dengan Amonium Sulfat Fraksi 30-45%	55
H.2 Massa Ammonium Sulfat yang Ditambahkan dalam Setiap Liter Larutan	56
Lampiran I. Perhitungan	57
I.1 Perhitungan Aktivitas Urease Bebas	57
I.2 Perhitungan Kadar Protein Awal	58
I.3 Penentuan Jumlah Urease Terjebak Variasi Konsentrasi Kitosan	58
I.3.1 Jumlah urease sebelum amobilisasi	58
I.3.2 Jumlah urease setelah amobilisasi variasi konsentrasi kitosan	59
I.3.3 Penentuan jumlah urease terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat	60
I.4 Penentuan Jumlah Urease Terjebak Variasi Konsentrasi Urease	61
I.4.1 Jumlah urease sebelum amobilisasi	61
I.4.2 Jumlah urease setelah amobilisasi variasi konsentrasi urease	62
I.4.3 Penentuan jumlah urease terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat	63
I.5 Penentuan Aktivitas Urease Amobil	64
I.5.1 Penentuan aktivitas urease variasi konsentrasi kitosan	64
I.5.2 Penentuan aktivitas urease variasi konsentrasi urease	65
I.6 Penentuan Aktivitas Efisiensi Penggunaan Ulang Urease Amobil	66
Lampiran J. Analisa Statistika	67
J.1 Analisa Data Urease yang Terjebak Pada Variasi Konsentrasi Kitosan	67
J.2 Analisa Data Aktivitas Urease Variasi Konsentrasi Kitosan	70
J.3 Analisa Data Urease yang Terjebak Pada Variasi	73



Konsentrasi Urease

J.4	Analisa Data Aktivitas Urease Variasi Konsentrasi Urease	74
J.5	Analisa Data Efisiensi Penggunaan Ulang Urease Amobil	76

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan suatu biokatalis yang dapat mempercepat reaksi kimia antara  $10^8$ - $10^{11}$  kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi tersebut tanpa enzim. Hal ini dikarenakan enzim dapat menurunkan energi aktivasi tanpa mengubah besarnya tetapan keseimbangan sebagai pengendali reaksinya. Sebagai biokatalisator, enzim hanya dapat bekerja pada substrat tertentu saja sehingga dapat dikatakan memiliki sifat yang spesifik[1]. Enzim diproduksi didalam protoplasma sel tetapi aktivitas enzim terjadi di dalam sel tempat sintesisnya (endoenzim) maupun di tempat yang lain di luar tempat sintesisnya (eksoenzim)[2].

Sifat-sifat menguntungkan dari enzim antara lain: sangat efisien dalam penggunaannya, dapat beroperasi pada kondisi lunak, aman, mudah dikontrol, dapat menggantikan bahan kimia yang berbahaya, dan dapat didegradasi secara biologis. Besarnya keuntungan yang diperoleh, menjadikan enzim banyak digunakan dalam industri karena bersifat sangat spesifik apabila dibandingkan dengan katalis anorganik[3].

Urease merupakan enzim spesifik yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis urea menjadi  $\text{NH}_3$  dan  $\text{CO}_2$ [4]. Urease dapat diisolasi dari beberapa jenis mikroorganisme seperti bakteri, khamir, dan kapang. *Bacillus pasteurii* dan *Escherichia coli* merupakan golongan bakteri penghasil urease. Kadar urease yang terdapat pada golongan bakteri sekitar 17-77%, sedangkan pada golongan khamir mempunyai kadar urease yang lebih tinggi yaitu 78-98%[5,6]. *Schizosaccharomyces pombe* merupakan salah satu khamir yang memproduksi urease[7].

Dalam perkembangannya, enzim urease ini dimanfaatkan sebagai biosensor optik urea. Biosensor optik urea ini telah diaplikasikan dalam bidang kesehatan dan pertanian untuk menganalisa kadar urea[4]. Urea merupakan senyawa organik yang terdiri atas unsur karbon, hidrogen, oksigen dan nitrogen dengan rumus kimia  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ . Urea banyak digunakan petani untuk menyuburkan tanah[8]. Penambahan kandungan urea pada tanah memacu peningkatan pertumbuhan tanaman karena hampir semua

proses metabolisme tanaman melibatkan unsur nitrogen (N) untuk mengoptimalkan produktivitas tanaman[9]. Di dunia medis, pengukuran tingkat nitrogen urea yang terdapat di dalam darah maupun urin berguna untuk mendeteksi penyakit dan gangguan pada organ tubuh tertentu seperti gagal ginjal akut, gangguan liver, dan diabetes[4,8].

Enzim bebas bersifat mudah larut di dalam air, sehingga penggunaan enzim pada pengoperasian tipe *batch* dalam bidang industri berskala besar menjadi tidak ekonomis dan efisien. Hal ini disebabkan, enzim tersebut sukar dipisahkan dari substrat dan produknya sehingga tidak dapat digunakan secara berulang kali[10]. Namun dalam beberapa tahun belakangan ini telah banyak ditemukan metode untuk memperbaiki kerja enzim yaitu dengan cara mengikat enzim pada bahan-bahan yang tidak mudah larut dalam air dan bahan tersebut dapat dipisahkan dari produk secara mudah. Hal ini memungkinkan penggunaan kembali enzim yang terikat pada bahan tersebut. Metode ini dikenal dengan metode amobilisasi enzim[11]. Metode amobilisasi enzim merupakan suatu metode yang bertujuan untuk membatasi secara fisik pergerakan enzim di dalam ruang reaksi yang dikatalisisnya[12]. Keuntungan dari metode ini adalah enzim teramobil dapat digunakan secara efisien dalam suatu reaksi kimia yang dikatalisisnya sehingga dapat meminimalisir anggaran penggunaan enzim[13].

Salah satu teknik amobilisasi enzim adalah penjebakan (*entrapment*). Metode ini didasarkan pada penempatan enzim didalam kisi dari suatu polimer. Struktur kisi/ruang gel akan melindungi enzim dari faktor lingkungan yang dapat mengakibatkan kerusakan enzim. Struktur gel tersebut akan memberikan ruang yang cukup sempit bagi pergerakan enzim namun masih memungkinkan terjadi pertukaran substrat dengan produknya[14]. Beberapa bahan yang umum digunakan untuk amobilisasi sel dengan metode penjebakan adalah kitosan, alginat, dan agar/agarosa[15]. Penelitian sebelumnya telah berhasil mengamobilisasi urease yang diisolasi dari khamir *Schizosaccharomyces pombe* dengan metode penjebakan menggunakan kombinasi antara kitosan yang diikatkan silang pada glutaraldehid, lama amobilisasi adalah 24 jam dan pengukuran pada pH 4 dengan konsentrasi enzim awal sebesar  $6,5 \text{ mg/mL}$ . Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah optimum urease yang



teramobilkan sebesar  $0,9 \text{ mg/mL}$ . Dari data hasil penelitian tersebut, terlihat jelas bahwa enzim yang tak teramobilkan cukup banyak yaitu  $5,6 \text{ mg/mL}$ [16].

Penggunaan kitosan sebagai matrik pendukung memiliki beberapa kelebihan diantaranya yaitu mudah didapat, prosedur isolasinya mudah, mudah terdegradasi didalam tubuh manusia, afinitas terhadap enzim tinggi, non toksik, dan aman[17]. Untuk memperbaiki sifat mekanik kitosan dapat dilakukan dengan cara mengkoagulasikan kitosan pada temperatur rendah dan menautkannya dengan senyawa pengikat silang[18].

Senyawa pengikat silang yang umum digunakan dalam amobilisasi enzim selain glutaldehida adalah senyawa natrium tripolifosfat. Ketika natrium tripolifosfat dilarutkan di dalam air, akan menghasilkan ion hidroksil dan ion fosfat. Kedua ion tersebut akan berinteraksi dengan  $-\text{NH}_3^+$  dari kitosan sehingga terbentuk ikatan silang antara kitosan dan tripolifosfat[19]. Proses modifikasi kitosan dengan senyawa tripolifosfat sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain yaitu konsentrasi kitosan, pH natrium tripolifosfat, dan waktu terjadinya ikatan silang[20]. Adanya penambahan natrium-tripolifosfat pada suatu matrik kitosan dapat mengubah ukuran pori dan porositas matrik tersebut sehingga akan mempengaruhi jumlah enzim yang tertahan pada matrik[21].

Berdasarkan uraian diatas, pada penelitian ini akan dipelajari lebih lanjut mengenai pengaruh konsentrasi kitosan maupun konsentrasi urease terhadap amobilisasi urease dari khamir *Schizzosaccharomyces pombe* menggunakan matrik kitosan-natrium tripolifosfat dan ditentukan pula konsentrasi kitosan serta urease optimum dan efisiensi penggunaan ulang urease amobil.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut:

1. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi kitosan terhadap optimasi dari amobilisasi urease?
2. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi urease terhadap optimasi dari amobilisasi urease?

3. Bagaimana efisiensi penggunaan ulang urease yang terambil dengan matrik kitosan-natrium tripolifosfat?

### 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dibahas, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Pemurnian enzim menggunakan metode pengendapan bertingkat dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 30-45%.
2. Uji aktivitas urease diukur berdasarkan  $\text{NH}_3$  yang dihasilkan melalui penambahan reagen Nessler menggunakan spektrometri 20.

### 1.4 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Menentukan kondisi optimum amobilisasi urease dengan menggunakan metode penjemuran dalam kitosan-natrium tripolifosfat yang dipengaruhi oleh konsentrasi kitosan.
2. Menentukan kondisi optimum amobilisasi urease dengan menggunakan metode penjemuran dalam kitosan-natrium tripolifosfat yang dipengaruhi oleh konsentrasi urease.
3. Mengetahui efisiensi penggunaan ulang urease amobil dalam kitosan-natrium tripolifosfat.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai konsentrasi kitosan dan konsentrasi urease untuk mengamobilisasikan urease hasil isolasi dari *Schizosaccharomyces pombe* yang menghasilkan aktivitas urease tertinggi dan juga mengetahui efisiensi penggunaan ulang urease amobil. Urease amobil yang diperoleh diharapkan dapat digunakan secara efisien sehingga dapat menghemat anggaran produksi.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Enzim

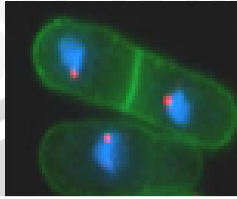
Enzim memiliki spesifitas tinggi terhadap substrat, artinya enzim hanya dapat mengkatalis reaksi tertentu dengan substrat tertentu saja[1]. Meskipun dalam jumlah sedikit, adanya satu molekul enzim didalam suatu reaksi kimia dapat digunakan secara berulang kali selama molekul tersebut tidak mengalami kerusakan struktur. Sebab, enzim tidak ikut bereaksi terhadap reaksi kimia yang dikatalisirnya[22]. Aktivitas enzim dalam mengkatalis suatu reaksi kimia dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya yaitu pH, waktu inkubasi, temperatur, dan konsentrasi substrat[15].

### 2.2 Urease

Urease merupakan salah satu enzim yang banyak dimanfaatkan sebagai katalisator dalam proses hidrolisa urea menjadi  $\text{NH}_3$  dan  $\text{CO}_2$ [7]. Enzim ini mempunyai berat molekul (Mr) 480 kDa dan aktivitas optimum dari urease terjadi pada pH 7,4[23]. Urease disintesis oleh beragam organisme contohnya tanaman, bakteri, fungi, dan invertebrata. Beberapa tanaman yang memproduksi urease antara lain yaitu mulberry (*Morus alba*)[24] dan kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*)[25]. Pada golongan bakteri, enzim ini dapat ditemukan pada *Bacillus pasteurii* dan *Escherichia coli*[26]. Enzim ini juga disintesis oleh beberapa jenis kapang, contohnya *Coccidioides immitis*[27] dan *Schizosaccharomyces pombe* [7].

### 2.3 *Schizosaccharomyces pombe*

*Schizosaccharomyces pombe* merupakan eukariota bersel satu berbentuk batang. *Schizosaccharomyces pombe* mempunyai ukuran diameter sekitar 2-3 mikron dan panjang 7-14 mikron (Gambar 2.1)[28]. *Schizosaccharomyces pombe* termasuk mikroorganisme bersel haploid yang dapat mengalami lisis pada temperatur (-70°C)[29].



**Gambar 2.1:** *Schizosaccharomyces pombe*

Adapun klasifikasi dari *Schizosaccharomyces pombe* adalah sebagai berikut[28]:

Superkingdom : Eukaryota  
Kingdom : Fungi  
Filum : Ascomycota  
Kelas : Schizosaccharomycetes  
Ordo : Schizosaccharomycetales  
Famili : Schizosaccharomycetaceae  
Genus : Schizosaccharomyces  
Species : Schizosaccharomyces pombe

#### 2.4 Isolasi Enzim

Berdasarkan keberadaan enzim di dalam sel, maka enzim dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu enzim ekstraseluler (di luar sel) dan enzim intraseluler (di dalam sel). Untuk memperoleh enzim yang terdapat pada sel hewan maupun tumbuhan, maka enzim yang diinginkan harus dipisahkan dari komponen protein yang lain dengan cara isolasi. Tahapan isolasi pada enzim ekstraseluler lebih mudah dilakukan dibandingkan enzim intraseluler, sebab enzim ekstraseluler dapat diperoleh tanpa melalui pemecahan sel dan enzim akan terpisah dari pengotornya secara mudah[2]. Setelah dilakukan pemecahan sel, ekstrak kasar enzim yang diperoleh disentrifugasi untuk memisahkan enzim dari pengotornya[30]. Proses sentrifugasi dilakukan pada temperatur 4°C[31].

Faktor yang sangat mempengaruhi banyak/sedikitnya jumlah serta besar/kecilnya aktivitas dari enzim yang diisolasi adalah kondisi pertumbuhan enzim. Kondisi pertumbuhan enzim bergantung pada pH medium, temperatur inkubasi dan waktu inkubasi[32].



## 2.5 Pemurnian Enzim

Tahapan pemurnian enzim berhubungan erat dengan pemurnian protein. Prinsip dasar dari pemurnian enzim adalah memisahkan protein dari protein lain yang tidak diperlukan di dalam satu material[33]. Metode pemurnian enzim yang paling umum digunakan adalah presipitasi atau pengendapan. Presipitasi atau pengendapan merupakan metode pemurnian enzim yang didasarkan atas perbedaan kelarutan akibat adanya penambahan konsentrasi garam yang tinggi ke dalam larutan enzim, atau biasa disebut *salting out*. Salah satu garam yang sering digunakan pada *salting out* adalah garam amonium sulfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Penambahan garam ammonium sulfat di dalam ekstrak kasar enzim akan mengendapkan protein yang dikehendaki dan membuang endapan protein yang tidak dikehendaki. Endapan yang diperoleh dilarutkan kembali dan sisa garam dihilangkan melalui dialisis. Prinsip kerja dari metode ini didasarkan atas proses difusi zat terlarut terhadap membran selofan. Cara kerja dari membran selofan dapat diibaratkan seperti saringan dengan ukuran pori tertentu sehingga dapat dilewati partikel-partikel berdiameter kecil namun partikel-partikel yang berdiameter lebih besar dari ukuran pori membran akan tertahan pada membran tersebut[34].

## 2.6 Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim merupakan suatu teknik untuk menempatkan enzim atau sel di dalam ruang atau matrik yang dapat menyebabkan penurunan sebagian besar aktivitasnya namun masih menampilkan aktivitas katalitik sehingga enzim dapat digunakan secara berulang[15].

Amobilisasi enzim dapat dilakukan dengan berbagai metode, antara lain yaitu metode pengikatan pada *carrier*, ikatan silang, penjeratan (*entrapment*), dan enkapsulasi (*encapsulation*).

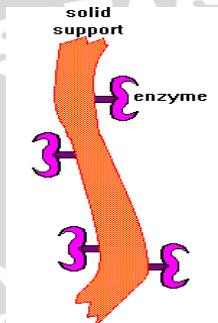
### 1. Pengikatan pada *carrier*

*Carrier* adalah bahan pembantu pada amobilisasi enzim yang bersifat tidak larut dalam air. Bahan pembantu ini dapat berupa bahan organik maupun anorganik[35]. Metode ini terbagi menjadi 3 jenis yaitu adsorpsi fisik, ikatan ionik, dan ikatan kovalen.



a. Adsorpsi fisik

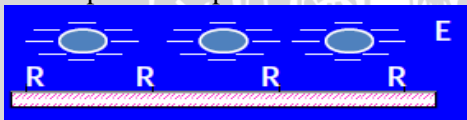
Metode amobilisasi enzim ini melibatkan interaksi antara enzim dengan suatu permukaan padat karena adanya gaya *Van der Waals*[36]. Padatan yang umum digunakan sebagai matrik penyanggah diantaranya yaitu alumina, kaca, kitosan, kolagen, silika/gel silika, selulosa, dan zeolit[36,37]. Enzim yang terikat secara adsorpsi fisik dapat dilihat pada Gambar 2.2:



**Gambar 2.2:** Enzim terikat secara adsorpsi fisik

b. Ikatan ionik

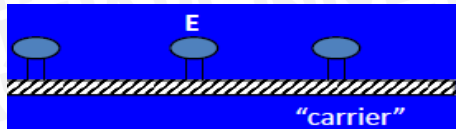
Metode amobilisasi enzim ini didasarkan atas ikatan ionik yang terjadi antara enzim dengan matrik tidak larut air yang memiliki pusat pertukaran ion[15]. Ikatan ionik antara enzim dan matrik dapat dilihat pada Gambar 2.3:



**Gambar 2.3:** Ikatan ionik antara enzim dengan matrik

c. Ikatan kovalen

Metode ini didasarkan pada pembentukan ikatan kovalen antara gugus fungsional enzim dengan matrik tak larut air[15]. Ikatan kovalen antara enzim dan matrik dapat dilihat pada Gambar 2.4:



**Gambar 2.4:** Ikatan kovalen antara enzim dengan matrik

## 2. Ikatan silang

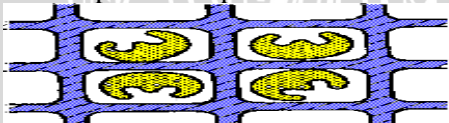
Metode ambolisasi ini didasarkan pada pembentukan ikatan kimia antara molekul enzim dan matrik padat atau matrik pendukung lainnya misalnya gel[37]. Agen pengikat silang yang umum digunakan pada metode ini adalah glutaraldehida dan tripolifosfat[38]. Enzim yang terikat secara pengikatan silang dapat dilihat pada Gambar 2.5:



**Gambar 2.5:** Ikatan silang antara enzim dengan matrik

## 3. Penjeratan (*entrapment*)

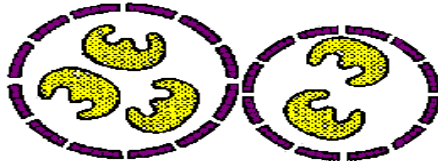
Metode amobilisasi enzim ini didasarkan pada penempatan enzim di dalam kisi dari suatu polimer [14]. Bahan yang umum digunakan sebagai media amobilisasi dalam metode ini antara lain yaitu kolagen, gelatin, agar/agarosa, gelatin, kitosan, dan alginat[39]. Keuntungan dari metode ini adalah enzim tidak mengalami perubahan konformasi karena tidak terjadinya ikatan kimia antara enzim dengan gel namun enzim yang terjebak masih dapat lolos akibat adanya difusi[40]. Enzim yang terikat pada metode penjeratan dapat dilihat pada Gambar 2.6:



**Gambar 2.6:** Enzim terikat pada kisi-kisi polimer

#### 4. Enkapsulasi (*encapsulation*)

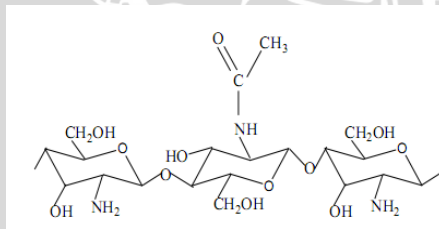
Pada metode ini, enzim ditempatkan di dalam kantong membran semipermeabel[14]. Enzim yang terikat pada metode enkapsulasi dapat dilihat pada Gambar 2.7:



**Gambar 2.7:** Enzim terikat pada kantong membran semipermeabel

### 2.7 Kitosan-Tripolifosfat

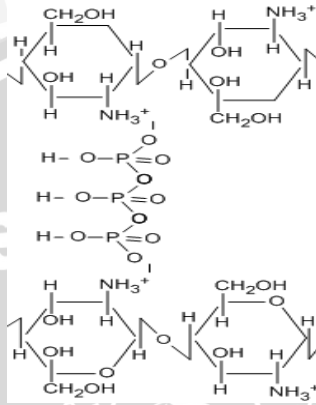
Kitosan merupakan produk deasetilasi parsial dari kitin yang tersusun atas kopolimer glukosamin dan N-asetilglukosamin, dengan rumus molekul  $(C_6H_{11}NO_4)_n$ . Kitosan memiliki dua gugus fungsi yang reaktif, diantaranya yaitu satu gugus amino dan satu gugus hidroksi primer[41]. Adanya gugus amina dan gugus hidroksil di dalam kitosan menjadikan kitosan bersifat polikationik. Struktur kitosan dapat dilihat pada Gambar 2.8[42].



**Gambar 2.8:** Struktur kitosan

Kitosan sebagai media amobilisasi dapat diubah ukuran pori dan porositasnya melalui penambahan agen pengikat silang, salah satu contohnya natrium tripolifosfat ( $Na_5P_3O_{10}$ )[21]. Tripolifosfat merupakan polianion non-toksik yang dapat berinteraksi dengan

kitosan melalui gaya elektrostatik untuk membentuk ikatan silang seperti pada Gambar 2.9[43].



**Gambar 2.9:** Struktur senyawa tripolifosfat yang berikatan dengan kitosan

## 2.8 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah:

1. Variasi konsentrasi kitosan dan variasi konsentrasi urease untuk proses amobilisasi berpengaruh terhadap aktivitas urease amobil.
2. Urease amobil dapat digunakan untuk beberapa kali penggunaan.

## 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. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan bulan Mei 2013.

#### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

##### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur murni khamir *Schizosaccharomyces pombe* yang diperoleh dari Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gajah Mada.

##### 3.2.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analisis dan *for microbiology*. Bahan kimia dengan kualitas pro analisis antara lain  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ( $\text{bj}=1,05 \text{ g/cm}^3$ ),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$  (37% w/w;  $\text{bj}=1,19 \text{ g/cm}^3$ ),  $\text{BaCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$ ,  $\text{NaCO}_3$ , EDTA,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ,  $\text{CCL}_3\text{COOH}$ , kitosan, dan reagen nessler. Bahan kimia dengan kualitas *for microbiology* meliputi agar, kentang, dekstroza, urea, pepton, kasein (Merk Fluka), dan *yeast extract*.

##### 3.2.3 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain erlenmeyer berukuran 250 mL, pipet ukur dengan ukuran 1 mL, dan 10 mL, pipet tetes, pengaduk gelas, tabung reaksi, gelas kimia berukuran 50 mL, 100 mL, 250 mL, dan 500 mL, labu ukur (25 mL, 50 mL, dan 100 mL), neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), pH meter (schott-gerate tipe CG-820), inkubator (Heraeus Type B 5042), jarum ose, *magnetik stirrer*, motor rotary (Ikamag RH), spektronik 20 (Genesys), kuvet, oven (Memmert), autoklaf (Tipe LS-C35L),



pemanas listrik (Jankle-Kunkel), *shaker* (Edmund Buhler SM 2524B), *sentrifuse* dingin (Denley), kertas saring Whatman No. 40, *syringe*, kertas saring halus, aluminium foil, kapas, kasa, kantong selofan, bunsen dan pH universal.

### 3.3 Tahapan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan meliputi isolasi urease, amobilisasi urease serta efisiensi penggunaan ulang urease amobil. Pada tahapan amobilisasi urease terdiri dari 2 perlakuan yaitu variasi konsentrasi kitosan yang meliputi 1,5% ; 2,0% ; 2,5% ; 3,0%, dan 3,5% ( $W/V$ ) dan variasi konsentrasi urease yang meliputi 0,840 ; 1,680 ; 2,520 ; 3,360 dan 4,200 ( $mg/mL$ ). Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap sederhana (RAL). Tahapan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan media padat
2. Pembuatan media cair
3. Peremajaan biakan murni *Schizzosaccharomyces pombe*
4. Pembuatan inokulum
5. Produksi dan isolasi ekstrak kasar urease dari *Schizzosaccharomyces pombe*
6. Pemurnian ekstrak kasar urease
7. Uji kadar protein awal
8. Penentuan aktivitas urease bebas
9. Preparasi matrik kitosan
10. Amobilisasi enzim urease meliputi:
  - a. Penentuan konsentrasi kitosan optimum saat amobilisasi
  - b. Penentuan konsentrasi urease optimum saat amobilisasi
11. Uji kadar protein sisa
12. Penentuan aktivitas urease amobil
13. Penentuan efisiensi penggunaan ulang urease amobil
14. Analisa data

### 3.4 Prosedur Kerja Penelitian

#### 3.4.1 Pembuatan Media Padat

Media padat yang digunakan untuk pertumbuhan kultur murni *Schizzosaccharomyces pombe* adalah Potato Dekstrosa Agar (PDA) dengan komposisi :

- Kentang                    50 gram
- Dekstrosa                4 gram
- Agar                        4 gram

Kentang sejumlah 50 gram tersebut dikupas kulitnya dan dipotong kecil-kecil lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia berukuran 250 mL, ditambah 200 mL akuades dan dipanaskan hingga 30 menit. Kemudian disaring menggunakan kapas dan kasa sehingga didapatkan filtrat. Dekstrosa sejumlah 4 gram dan 4 gram agar ditambahkan ke dalam filtrat yang diperoleh lalu diaduk menggunakan pengaduk magnetik hingga larut. Kemudian didinginkan, lalu pH larutan diatur melalui penambahan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,1 M hingga pH 5,5. Setelah itu, ditambahkan 10 mL buffer asetat pH 5,5 untuk mempertahankan pH larutan. Lalu, dipindahkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, kemudian ditutup menggunakan kapas, kasa, dan aluminium foil. Setelah itu, disterilkan menggunakan autoklaf pada temperatur  $121^\circ\text{C}$ , 15 psi selama 15 menit. Berikutnya, campuran dipindahkan ke cawan steril lalu, ditutup rapat dan dibiarkan memadat pada temperatur ruang selama 24 jam.

#### 3.4.2 Pembuatan Media Cair

Media pertumbuhan *Schizzosaccharomyces pombe* untuk menghasilkan enzim urease dibuat dengan menimbang 2,50 gram pepton, 1,25 gram ekstrak yeast, 1,25 gram NaCl, 2,50 gram dekstrosa, dan 4,00 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL dan dilarutkan dengan 250 mL akuades. Lalu ditambahkan 2,5 mL urea 0,2 mM. Setelah itu, campuran diatur pada pH 5,5 melalui penambahan larutan asam asetat pH 5,5. Kemudian, ditambahkan larutan buffer asetat pH 5,5 sebanyak 10 mL. Campuran disterilkan di dalam autoklaf pada temperatur  $121^\circ\text{C}$ , 15 psi selama 15 menit.

### **3.4.3 Peremajaan Biakan Murni *Schizosaccharomyces pombe***

Biakan murni *Schizosaccharomyces pombe* dipindahkan ke cawan yang berisi PDA yang telah dipersiapkan menggunakan jarum ose sebanyak satu ose secara aseptis. Proses pemindahan ini dilakukan dengan cara mendekatkan mulut cawan pada pembakar Bunsen saat menggoreskan jarum ose. Lalu, cawan ditutup dan diinkubasi di dalam inkubator pada temperatur 30°C selama 4 hari.

### **3.4.4 Pembuatan Inokulum**

Kapang yang telah tumbuh di dalam media padat PDA yang berumur 4 hari diencerkan dengan 15 mL akuades, kemudian dikocok. Suspensi spora yang diperoleh merupakan inokulum.

### **3.4.5 Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Urease dari *Schizosaccharomyces pombe***

Inokulum yang diperoleh dari tahapan sebelumnya diambil 15 mL dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 150 mL media cair. Lalu, diletakkan di atas *sheaker* dan dikocok dengan kecepatan putar 175 rpm pada temperatur ruang selama 2 hari. Selanjutnya, ditambahkan 15 mL buffer asetat pH 5,5 dan disentrifugasi dingin dengan kecepatan 3000 rpm pada temperatur 4°C selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar dari urease, kemudian dilakukan uji aktivitas melalui penambahan reagen Nessler dan diuji pula kadar protein enzim melalui penambahan reagen Biuret.

### **3.4.6 Pemurnian Ekstrak Kasar Urease**

Ekstrak kasar urease dimurnikan dengan cara pengendapan bertingkat menggunakan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dengan fraksi 0-30%, 30-45%, dan proses dialisis.

#### **3.4.6.1 Fraksi 0-30%**

Langkah pertama, ditimbang 7,04 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  lalu dicampurkan ke dalam 40 mL larutan ekstrak kasar urease. Penambahan dilakukan secara sedikit demi sedikit sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik pada temperatur 4°C. Setelah semua  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  yang ditambahkan larut, kemudian dibiarkan

selama 1 jam. Endapan yang dihasilkan dipisahkan menggunakan sentrifugasi dingin pada temperatur 4°C selama 35 menit sehingga menghasilkan endapan I dan supernatan I.

#### 3.4.6.2 Fraksi 30-45%

Berikutnya, ditimbang 3,312 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kemudian ditambahkan ke dalam supernatan I. Penambahan ini dilakukan secara sedikit demi sedikit sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik pada temperatur 4°C. Setelah semua  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  yang ditambahkan larut, kemudian dibiarkan selama 1 jam. Endapan yang dihasilkan dipisahkan menggunakan sentrifugasi dingin pada temperatur 4°C selama 35 menit sehingga menghasilkan endapan II dan supernatan II.

#### 3.4.6.3 Dialisis

Endapan II dilarutkan dalam 5 mL larutan buffer fosfat 0,2 M pH 8. Setelah itu, endapan yang larut dimasukkan ke dalam kantong selofan. Kemudian, dilakukan dialisis dengan cara merendam kantong selofan tersebut dalam 500 mL larutan buffer fosfat 0,2 M pH 8 dalam beaker gelas 500 mL pada posisi tergantung sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik pada temperatur 4°C. Dialisis dilakukan dengan mengganti larutan buffer perendam dengan buffer perendam yang baru setiap 3 jam hingga semua garam terpisah. Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai, diuji dengan cara 5 mL buffer perendam diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah 1 mL larutan HCl 0,1 M dan 5 tetes larutan  $\text{BaCl}_2$  0,1 M. Apabila tidak ada endapan, maka dialisis dapat dihentikan. Larutan enzim yang diperoleh merupakan larutan urease murni dan dilakukan uji kadar protein serta aktivitasnya.

### 3.4.7 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein

Larutan kasein 5000 ppm dipipet 2 ml, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer fosfat 0,2 M pH 7. Setelah itu, dikocok dan didiamkan pada temperatur kamar selama 30 menit. Larutan yang diperoleh ini merupakan larutan sampel. Sebagai blanko, dipipet 2 mL akuades, dipindahkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer fosfat 0,2 M pH 7 dengan perlakuan yang sama dengan sampel. Selanjutnya, kedua larutan tersebut diukur



serapannya pada kisaran panjang gelombang 200-600 nm dengan menggunakan spektrometri Genesys 20. Data serapan maksimum yang diperoleh merupakan nilai dari panjang gelombang maksimum kasein.

#### **3.4.8 Pembuatan Kurva Standar Larutan Kasein**

Kasein sebanyak 1,0020 g dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia 100 mL. Kemudian, ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 M hingga kasein larut lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan stok kasein 10000 ppm. Setelah itu, dipipet masing-masing (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berbeda. Lalu, ditambahkan akuades sampai tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan kasein (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000) ppm.

Larutan kasein dari tiap konsentrasi diambil 2 mL, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer fosfat 0,2 M pH 7. Tahapan selanjutnya, campuran dikocok dan diinkubasi pada temperatur ruang selama 30 menit. Setelah itu, diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum kasein 5000 ppm menggunakan spektrometri Genesys 20. Kurva standar kasein dibuat dengan cara memplot data konsentrasi kasein (ppm) pada sumbu x dan absorbansinya pada sumbu y, sehingga didapatkan persamaan regresi linier dari kurva standar kasein tersebut.

#### **3.4.9 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Ammonia**

Larutan ammonia 2 ppm dipipet 10 mL menggunakan pipet ukur 10 mL. Kemudian, ditambahkan 0,2 mL reagen Nessler menggunakan pipet ukur 1 mL. Lalu dikocok hingga terbentuk warna kuning dan selanjutnya diukur absorbansinya pada kisaran panjang gelombang 390-450 nm dengan menggunakan spektrometri Genesys 20. Data serapan maksimum yang diperoleh merupakan nilai dari panjang gelombang maksimum ammonia 2 ppm. Sebagai blanko, dipipet 10 mL menggunakan pipet ukur 10 mL, ditambah 0,2 mL



reagen Nessler menggunakan pipet ukur 1 mL, lalu dikocok hingga terbentuk warna kuning.

#### **3.4.10 Pembuatan Kurva Standar Larutan Ammonia**

Ditimbang 1,941 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  menggunakan neraca analitik kemudian dipindahkan ke dalam gelas kimia 250 mL. Lalu dilarutkan dengan 50 mL akuades dan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL. Selanjutnya, ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan stok ammonia 500 ppm. Setelah itu, dipipet masing-masing (0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8) mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang berbeda. Lalu, ditambahkan akuades sampai tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan ammonia (1, 2, 3, 4) ppm.

Larutan ammonia dari tiap konsentrasi diambil 10 mL, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu ditambah 0,2 mL reagen Nessler. Tahapan selanjutnya, campuran dikocok hingga terbentuk warna kuning dan selanjutnya masing-masing larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum ammonia 2 ppm menggunakan spektrometri Genesys 20. Kurva standar ammonia dibuat dengan cara memplot data konsentrasi ammonia (ppm) pada sumbu x dan absorbansinya pada sumbu y, sehingga didapatkan persamaan regresi linier dari kurva standar ammonia tersebut.

#### **3.4.11 Uji Kadar Protein Awal**

Larutan enzim yang telah dimurnikan dipipet sejumlah 2 mL, lalu ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, lalu ditambah 2 mL buffer fosfat pH 7, kemudian dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur ruang. Selanjutnya diukur absorbansi dari larutan campuran yang telah diperoleh pada panjang gelombang maksimum kasein sehingga kadar protein dapat diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein. Sebagai blanko dipipet 2 mL akuades, 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer fosfat pH 7 selanjutnya diperlakukan sama seperti di atas.

### 3.4.12 Penentuan Aktivitas Urease Bebas

Larutan urea 0,2 mM dipipet 5 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 1 mL larutan urease yang telah dimurnikan. Lalu, ditambah 1 mL buffer fosfat pH 7, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada temperatur 45°C. Selanjutnya, ditambahkan 10 mL CCL<sub>3</sub>COOH 8% untuk menghentikan hidrolisis. Lalu, disentrifugasi selama 15 menit. Ammonia hasil hidrolisis/supernatan diambil 10 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok sampai homogen. Larutan dipipet 10 mL, dipindahkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 0,2 mL reagen Nessler dan dikocok hingga homogen. Kemudian, diukur absorbansi dari kompleks yang terbentuk antara ammonia dan reagen Nessler menggunakan spektrometri Genesys 20 pada panjang gelombang maksimum ammonia 2 ppm dan dibandingkan dengan absorbansi larutan standar. Larutan blanko dibuat sama dengan sampel tetapi tanpa enzim. Satu unit aktivitas enzim bebas (U) diartikan sebagai 1 μmol ammonia yang dihasilkan per menitnya tiap mL enzim.

Pengukuran aktivitas urease dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi menjadi konsentrasi ammonia. Setelah nilai konsentrasi ammonia diketahui, maka dimasukkan ke dalam rumus seperti di bawah ini:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Ammonia}] \times v}{\text{Mr Ammonia}} \times \frac{fp}{p \times q}$$

Keterangan :

v = volume total larutan produk hidrolisis (mL)

p = jumlah enzim (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

fp = faktor pengenceran

Adapun kompleks yang terbentuk antara ion ammonium dan reagen Nessler adalah sebagai berikut :



### 3.4.13 Preparasi Matrik Kitosan

Ditimbang kitosan dengan massa yang bervariasi yaitu 0,75 ; 1,00 ; 1,25 ; 1,50 ; 1,75 g. Kemudian, dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL yang berbeda-beda, lalu dilarutkan dalam 50 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (3%  $\text{W}/\text{V}$ ) dan diaduk menggunakan pengaduk magnetik pada temperatur ruang hingga homogen. Larutan kitosan yang dihasilkan memiliki konsentrasi 1,5 ; 2,0 ; 2,5 ; 3,0 dan 3,5 %.

### 3.4.14 Amobilisasi Urease

#### 3.4.14.1 Penentuan Konsentrasi Kitosan Optimum

Amobilisasi urease dengan kitosan-natrium tripolifosfat dilakukan dengan cara mencampurkan 1 mL larutan urease hasil pemurnian ke dalam 4 mL larutan kitosan dengan berbagai konsentrasi (1,5 ; 2,0 ; 2,5 ; 3,0 ; 3,5)% di dalam gelas ukur 10 mL. Setelah itu, tiap-tiap larutan campuran dimasukkan ke dalam *syringe* dan ditekan secara perlahan sehingga campuran menetes ke dalam wadah yang berisi 10 mL larutan  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  3%. Manik-manik yang terbentuk dibiarkan terendam di dalam larutan  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  3% selama 75 menit. Hasil preparasi disaring menggunakan kertas saring sehingga dihasilkan filtrat dan endapan. Kemudian, filtrat yang diperoleh diuji kadar protein sisanya dan urease amobil yang diperoleh diuji aktivitasnya.

#### 3.4.14.2 Penentuan Konsentrasi Urease Optimum

Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi urease dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi konsentrasi kitosan. Penentuan ini dilakukan pada konsentrasi optimum kitosan yang hasilnya diperoleh dari tahapan sebelumnya. Perbedaannya terletak pada jumlah enzim urease hasil pemurnian yang dipipet yaitu (0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1) mL dan ditambahkan larutan buffer fosfat pH 7 hingga volumenya mencapai 1 mL. Kemudian, dibiarkan terendam selama 75 menit di dalam 10 mL larutan  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  3%. Hasil preparasi disaring menggunakan kertas saring sehingga dihasilkan filtrat dan endapan. Setelah itu, filtrat yang diperoleh diuji kadar protein sisanya dan urease amobil yang diperoleh diuji aktivitasnya.

### 3.4.15 Uji Kadar Protein Sisa

Kadar protein yang tidak terjebak ditentukan dengan cara dipipet 2 mL filtrat dari enzim yang tidak teramobilkan, lalu ditambahkan larutan kasein 5000 ppm sejumlah 2 mL dan reagen Biuret sejumlah 8 mL, kemudian dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur ruang. Selanjutnya, diukur absorbansi larutan campuran pada panjang gelombang maksimum kasein sehingga kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein.

### 3.4.16 Penentuan Aktivitas Urease Amobil

Larutan urea 0,2 mM dipipet 5 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 0,5 g padatan urease yang telah diamobilkan. Setelah itu, ditambah 1 mL buffer fosfat pH 7, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada temperatur 45°C. Produk ammonia diambil dengan cara menyaring enzim amobil, filtrat ditampung dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan 10 mL  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  8% untuk menghentikan hidrolisis. Lalu, disentrifugasi selama 15 menit. Ammonia hasil hidrolisis/supernatan diambil 10 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok sampai homogen. Larutan dipipet 10 mL, ditambah 0,2 mL reagen Nessler dan dikocok hingga homogen. Kemudian, diukur absorbansi dari kompleks yang terbentuk antara ammonia dan reagen Nessler menggunakan spektrometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ammonia 2 ppm dan dibandingkan dengan absorbansi larutan standar. Larutan blanko dibuat sama dengan sampel tetapi tanpa enzim.

Pengukuran aktivitas urease dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi menjadi konsentrasi ammonia. Setelah nilai konsentrasi ammonia diketahui, maka dimasukkan ke dalam rumus seperti di bawah ini:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Ammonia}] \times v}{\text{Mr Ammonia}} \times \frac{fp}{p \times q}$$

Keterangan :

v = volume total larutan produk hidrolisis (mL)

p = jumlah enzim (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

fp = faktor pengenceran



Adapun kompleks yang terbentuk antara ion ammonium dan reagen Nessler adalah sebagai berikut :



#### **3.4.17 Penentuan Efisiensi Penggunaan Ulang Urease Amobil**

Urease amobil dengan kondisi amobilisasi urease optimum digunakan secara berulang kali. Urease amobil dalam larutan uji dilakukan uji aktivitas urease amobil dengan melakukan inkubasi pada temperatur 45°C selama 20 menit. Selanjutnya, dilakukan penyaringan dan dimasukkan ke dalam larutan uji yang baru. Filtrat dari hasil penyaringan selanjutnya diuji aktivitas ureasenya. Urease amobil pada larutan uji yang baru diberi perlakuan yang sama seperti sebelumnya. Perlakuan ini diulang sebanyak lima kali.

#### **3.4.18 Analisa Data**

Hasil dari variasi berdasarkan perlakuan 3.4.14 dilakukan penentuan kadar protein dan aktivitas berdasarkan perlakuan 3.4.15 dan 3.4.16. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji F menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Bila F hitung lebih besar dari F tabel ( $\alpha$  db) maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT 5%).



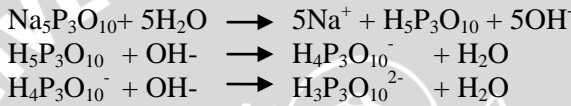
## BAB IV PEMBAHASAN

### 4.1 Amobilisasi Urease dalam Kitosan-Natrium Tripolifosfat

Pada penelitian ini, urease yang digunakan diisolasi dari *Schizosaccharomyces pombe*. Dari penelitian sebelumnya diperoleh data kurva pertumbuhan *Schizosaccharomyces pombe* sebagai berikut : a) fase adaptasi terjadi pada waktu inkubasi 0-11 jam, b) fase logaritmik pada waktu inkubasi 11-48 jam dan c) fase stasioner terjadi setelah 48 jam. Oleh karena itu, tahapan isolasi *Schizosaccharomyces pombe* dilakukan pada awal fase stasioner yakni pada jam ke-48 karena pada waktu tersebut penambahan populasi sel meningkat secara eksponensial dan jumlah sel bertambah seiring dengan penambahan komponen seluler serta produk metaboliknya. Proses isolasi urease dilakukan dengan cara sentrifugasi dingin pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Hal ini bertujuan untuk memisahkan pecahan dinding sel supernatan dan menghindari terjadinya kerusakan struktur enzim akibat panas yang ditimbulkan selama proses putaran. Hasil dari tahapan isolasi tersebut selanjutnya dimurnikan menggunakan metode pemurnian enzim secara pengendapan bertingkat melalui penambahan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 30-45% yang dilanjutkan dengan proses dialisis untuk memisahkan garam dari enzim yang diinginkan sehingga diperoleh urease murni. Urease murni yang diperoleh dilakukan uji kadar protein awal menggunakan reagen Biuret serta diuji pula aktivitas bebasnya menggunakan reagen Nessler. Kadar protein urease bebas setelah pemurnian sebesar 4,200 mg/mL dengan aktivitas urease bebas sebesar 0,37 unit.

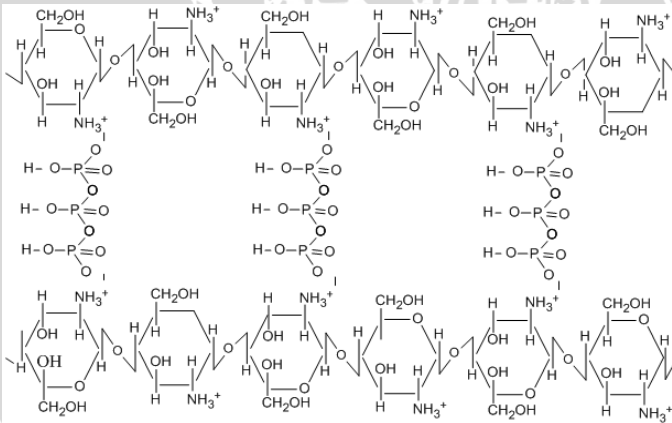
Pada metode ini, amobilisasi urease dilakukan dengan metode penjabakan menggunakan matrik kitosan-natrium tripolifosfat. Urease amobil dibuat dengan cara mencampurkan urease dengan larutan kitosan. Larutan kitosan yang digunakan diperoleh dengan cara melarutkan padatan kitosan didalam larutan asam asetat 3%. Adanya gugus karboksil (-COOH) pada asam asetat akan memudahkan pelarutan kitosan karena terjadinya interaksi hidrogen antara gugus karboksil dengan gugus amina (-NH<sub>2</sub>) dari kitosan membentuk gugus amino kationik (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Pencampuran enzim dan larutan kitosan ini bertujuan supaya kedua larutan tercampur secara

homogen. Campuran enzim dan kitosan tersebut diinjeksikan ke dalam *syringe* dan ditekan secara perlahan sehingga menetes ke dalam larutan  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  3%. Penggunaan *syringe* dalam penetasan larutan campuran ke dalam larutan  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  3% bertujuan untuk membentuk manik-manik yang berukuran kecil. Manik-manik yang terbentuk selanjutnya dibiarkan terendam selama 75 menit dalam  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  3% supaya manik-manik tersebut mengeras. Larutan  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  yang digunakan diperoleh dengan cara melarutkan padatan  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  didalam akuades. Apabila  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  ini dilarutkan didalam akuades, maka akan mengalami disosiasi menjadi  $\text{H}_3\text{P}_3\text{O}_{10}^{2-}$  (Gambar 4.1).



**Gambar 4.1:** Reaksi disosiasi natrium tripolifosfat

Gugus  $-\text{NH}_3^+$  dari kitosan akan berikatan secara elektrostatis dengan  $\text{O}^-$  dari  $\text{H}_3\text{P}_3\text{O}_{10}^{2-}$  sehingga terjadi tautan silang, seperti Gambar 4.2 di bawah ini:

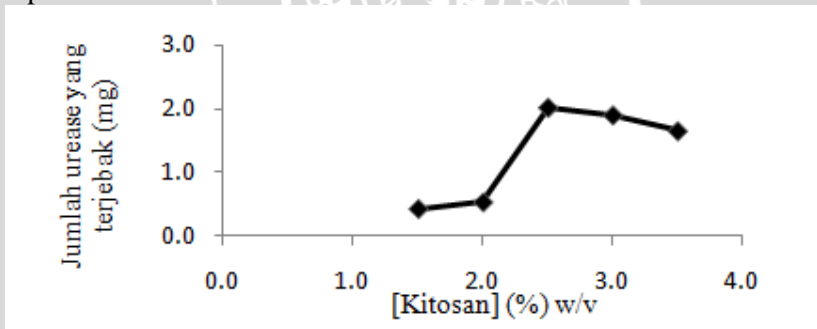


**Gambar 4.2:** Ikatan silang antara kitosan dengan natrium tripolifosfat

Kondisi optimum amobilisasi urease menggunakan matrik kitosan-natrium tripolifostat dipengaruhi oleh konsentrasi kitosan dan konsentrasi urease.

#### 4.2 Penentuan Konsentrasi Kitosan Optimum

Peningkatan konsentrasi kitosan berbanding lurus dengan jumlah urease yang terjebak, sebab ikatan silang yang terbentuk antara  $\text{-NH}_3^+$  dari kitosan dengan  $\text{H}_3\text{P}_3\text{O}_{10}^{2-}$  dari natrium tripolifostat akan semakin banyak sehingga ukuran diameter pori-pori matrik semakin kecil dan mempersulit urease yang telah terjebak untuk terlepas dari matrik. Namun pada konsentrasi tertentu akan terjadi penurunan karena ukuran pori matrik tidak sesuai dengan ukuran diameter enzim. Pada penelitian ini, urease diamobilkan pada lima variasi larutan kitosan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi kitosan terhadap jumlah urease amobil pada matrik kitosan-natrium tripolifostat dan aktivitas urease amobil.

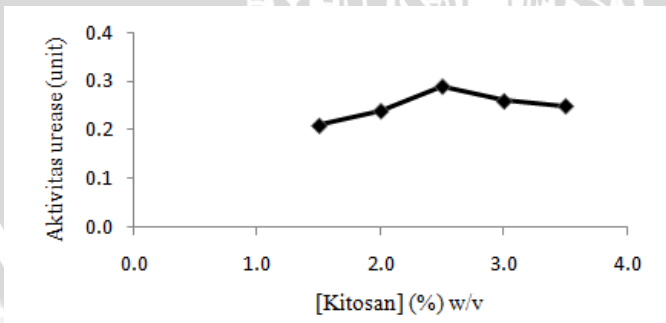


**Gambar 4.3:** Grafik hubungan konsentrasi kitosan terhadap jumlah urease yang terjebak (mg) pada matrik kitosan-natrium tripolifostat

Pada konsentrasi kitosan 1,5% hingga 2,5%, jumlah urease yang terjebak semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi kitosan. Namun pada konsentrasi kitosan 3% dan 3,5% mengalami penurunan secara signifikan (Gambar 4.3). Hal ini dimungkinkan karena ukuran diameter pori-pori sedikit lebih kecil dan tidak sesuai dengan ukuran molekul enzim, sehingga menyebabkan urease yang terjebak akan terlepas kembali. Hal ini

didukung dengan uji statistik, dimana nilai  $F_{hitung} > F_{tabel}$  yang mengindikasikan bahwa variasi konsentrasi kitosan berpengaruh nyata terhadap jumlah urease yang terjebak. Uji BNT 5% (Tabel J.3) menunjukkan bahwa kelima variasi konsentrasi kitosan yaitu (1,5 ; 2,0 ; 2,5 ; 3,0 ; 3,5) % memberikan pengaruh yang berbeda nyata antara satu dengan yang lainnya. Jumlah urease yang paling banyak terjebak terletak pada konsentrasi kitosan 2,5% yaitu sebesar 2,020 mg/mL sehingga dapat dikatakan bahwa konsentrasi kitosan 2,5% sebagai konsentrasi kitosan optimum.

Nilai aktivitas urease amobil berbanding lurus dengan jumlah urease yang terjebak didalam matrik kitosan-natrium tripolifosfat. Nilai aktivitas urease pada konsentrasi kitosan 1,5% hingga 2,5% meningkat secara signifikan seiring dengan bertambahnya konsentrasi kitosan sedangkan pada konsentrasi kitosan 3% dan 3,5% terjadi penurunan nilai aktivitas urease amobil (Gambar 4.4). Penurunan aktivitas urease amobil ketika konsentrasi kitosan 3% dan 3,5% disebabkan semakin besar konsentrasi kitosan, maka semakin besar pula kerapatan matrik kitosan-natrium tripolifosfat saat menjebak enzim. Semakin tinggi kerapatan matrik akan menyebabkan proses hidrolisis urea menjadi ammonia oleh urease berjalan tidak optimal. Hal ini dimungkinkan karena ukuran molekul urea yang lebih besar daripada matrik kitosan-natrium tripolifosfat, sehingga akan sulit untuk melewati matrik dan mengakibatkan kontak antara sisi aktif enzim teramobil dengan substrat urea menjadi kecil.



**Gambar 4.4:** Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas urease amobil pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat

Hasil analisa statistika menunjukkan bahwa  $F_{hitung}$  mempunyai nilai yang lebih besar daripada  $F_{tabel}$ , yang menunjukkan bahwa variasi konsentrasi kitosan berpengaruh nyata terhadap aktivitas urease amobil. Untuk mengetahui konsentrasi kitosan mana saja yang memiliki pengaruh terhadap aktivitas urease, maka dilanjutkan dengan uji BNT 5%. Berdasarkan hasil uji BNT 5% diketahui bahwa konsentrasi kitosan 1,5% hingga 3,5% memberikan pengaruh yang saling berbeda nyata terhadap nilai aktivitas urease amobil. Nilai aktivitas urease tertinggi terletak pada konsentrasi kitosan 2,5% yaitu sebesar 0,29 unit.

Berdasarkan analisa di atas, dapat diketahui bahwa konsentrasi kitosan 2,5% merupakan konsentrasi kitosan optimum untuk menghasilkan jumlah urease yang terjebak dan aktivitas maksimum, yaitu sebesar 2,020 mg/mL dengan aktivitas 0,29 unit.

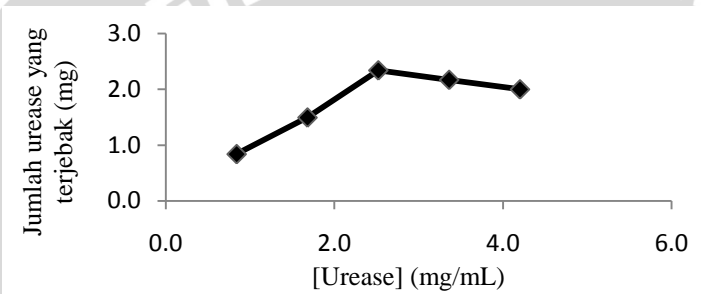
#### **4.3 Penentuan Konsentrasi Urease Optimum**

Konsentrasi enzim merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi reaksi enzimatik, dimana semakin tinggi konsentrasi enzim maka reaksi enzimatik menjadi semakin meningkat sampai batas tertentu. Hal ini dikarenakan, jumlah enzim yang terjebak di dalam matrik kitosan-natrium tripolifosfat akan semakin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi enzim, namun pada batas tertentu akan mengalami penurunan kecepatan reaksi yang kemungkinan disebabkan terlalu banyaknya jumlah enzim sehingga membatasi pergerakan enzim untuk berikatan dengan substrat. Selain itu, semakin tinggi konsentrasi enzim akan menyebabkan terjadinya kerusakan pada sisi aktif enzim sehingga kemampuan enzim dalam menghasilkan produk menjadi tidak optimal. Untuk mengetahui konsentrasi urease optimum, maka pada penelitian ini perlu dilakukan variasi konsentrasi urease pada saat amobilisasi yaitu 0,840 ; 1,680 ; 2,520 ; 3,360 ; 4,200 mg/mL dan digunakan konsentrasi kitosan optimum yang diperoleh dari tahapan sebelumnya yaitu, pada konsentrasi kitosan 2,5%.

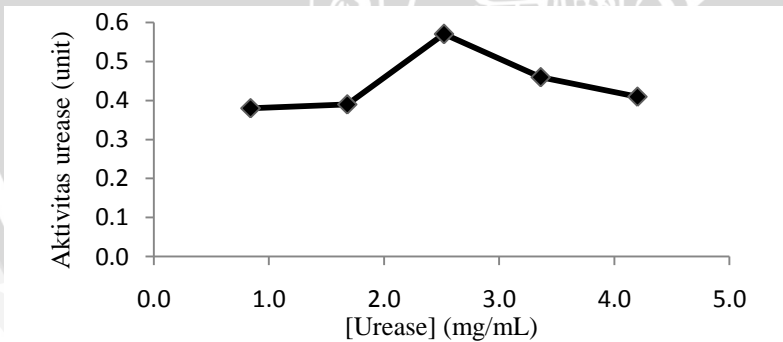
Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa pada konsentrasi urease 0,840 mg/mL hingga 2,520 mg/mL, jumlah urease yang terjebak di dalam matrik kitosan-natrium tripolifosfat mengalami peningkatan tetapi pada konsentrasi urease 3,360 mg/mL dan 4,200 mg/mL, jumlah urease yang terjebak berkurang secara signifikan



(Gambar 4.5). Hal ini didukung dengan uji statistik, dimana nilai  $F_{hitung} > F_{tabel}$  yang menunjukkan bahwa variasi konsentrasi urease berpengaruh nyata terhadap jumlah urease yang terjebak. Uji BNT 5% (Tabel J.9) menunjukkan bahwa pada konsentrasi urease yaitu (0,840 ; 1,680 ; 2,520 ) mg/mL memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap konsentrasi urease 3,360 mg/mL dan 4,200 mg/mL. Pada konsentrasi urease 2,520 mg/mL dikatakan sebagai konsentrasi urease optimum karena urease yang terjebak lebih banyak dibandingkan konsentrasi yang lain yakni sebesar 2,340 mg/mL.



**Gambar 4.5:** Grafik hubungan konsentrasi urease terhadap jumlah urease yang terjebak (mg) pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat



**Gambar 4.6:** Pengaruh konsentrasi urease terhadap aktivitas urease amobil pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat

Nilai aktivitas urease amobil mengalami peningkatan sebanding dengan konsentrasi urease dan jumlah urease yang terjebak didalam matrik kitosan-natrium tripolifosfat. Peningkatan konsentrasi urease akan menyebabkan semakin banyaknya sisi aktif dari enzim yang berikatan pada substrat hingga batas tertentu. Konsentrasi urease yang semakin meningkat menyebabkan reaksi hidrolisis urea menjadi ammonia mengalami peningkatan tetapi pada batas konsentrasi tertentu akan menurun. Nilai aktivitas urease pada konsentrasi enzim 0,840 mg/mL hingga 2,520 mg/mL meningkat secara signifikan seiring dengan bertambahnya konsentrasi urease sedangkan pada konsentrasi urease 3,360 mg/mL dan 4,200 mg/mL mengalami penurunan nilai aktivitas urease amobil (Gambar 4.6). Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi urease terhadap aktivitas dari urease amobil, maka dilakukan uji statistik yaitu dengan uji F dan BNT 5% yang terdapat pada lampiran J.12.

Berdasarkan hasil uji BNT 5% diketahui bahwa konsentrasi urease 0,840 mg/mL hingga 4,200 mg/mL memberikan pengaruh yang saling berbeda nyata terhadap nilai aktivitas urease amobil. Nilai aktivitas urease tertinggi terletak pada konsentrasi urease 2,520 mg/mL yaitu sebesar 0,57 unit.

Dari analisa di atas, dapat diketahui bahwa konsentrasi urease 2,520 mg/mL merupakan konsentrasi urease optimum untuk menghasilkan jumlah urease yang terjebak dan aktivitas maksimum, yaitu sebesar 2,340 mg/mL dengan aktivitas 0,57 unit.

#### **4.4 Penentuan Efisiensi Penggunaan Ulang Urease Amobil**

Keuntungan dari amobilisasi enzim yaitu enzim dapat digunakan secara berulang karena enzim tidak larut dalam substratnya sehingga enzim mudah untuk dipisahkan dari substrat. Namun, penggunaan enzim amobil secara berulang akan menurunkan nilai aktivitas enzim amobil tersebut. Pada penelitian ini, penentuan efisiensi penggunaan ulang urease amobil dilakukan dengan cara mengukur aktivitas urease hingga lima kali pengulangan menggunakan reagen Nessler pada kondisi optimum yang diperoleh dari data sebelumnya yaitu pada konsentrasi kitosan 2,5%, dan konsentrasi urease 2,520 mg/mL.

Dari data yang diperoleh, dapat diketahui bahwa aktivitas urease amobil selama penggunaan ulang mengalami penurunan seperti pada

Tabel 4.1. Hal ini didukung dengan uji statistik dimana  $F_{hitung} > F_{tabel}$  yang menunjukkan bahwa penggunaan ulang urease amobil berpengaruh nyata terhadap aktivitas urease amobil. Pada uji BNT 5% (Tabel J.15) menunjukkan bahwa dari penggunaan pertama hingga penggunaan kelima berbeda nyata.

Penurunan nilai aktivitas amobil selama penggunaan ulang kemungkinan dikarenakan terjadinya denaturasi urease amobil akibat proses sentrifugasi yang dapat menimbulkan panas selama proses pemutaran. Selain itu, penggunaan ulang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pori-pori matrik sehingga enzim yang telah terjebak dapat terlepas kembali. Dengan demikian, jumlah enzim yang berikatan pada substrat menjadi berkurang.

**Tabel 4.1:** Pengaruh penggunaan ulang urease amobil terhadap aktivitas

Penggunaan Ke-	Aktivitas Rata-rata (unit)	% Efisiensi
I	0,50	100
II	0,44	88,00
III	0,32	72,73
IV	0,21	65,62
V	0,10	47,62

Suatu enzim amobil masih efektif untuk digunakan kembali apabila efisiensinya di atas 50% [44]. Berdasarkan Tabel 4.1 diketahui bahwa urease amobil dapat digunakan sampai penggunaan keempat karena pada penggunaan kelima aktivitasnya terlalu kecil yaitu 0,10 unit dan nilai efisiensinya kurang dari 50% sehingga tidak efektif lagi untuk digunakan kembali.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Konsentrasi optimum larutan kitosan yang digunakan untuk amobilisasi urease dalam matrik kitosan-natrium tripolifosfat adalah 2,5% dengan jumlah urease terjebak sebanyak 2,020 mg dan aktivitas urease sebesar 0,29 unit.
2. Konsentrasi optimum urease yang digunakan untuk amobilisasi urease dalam matrik kitosan-natrium tripolifosfat adalah 2,520 mg/mL dengan jumlah urease terjebak sebanyak 2,340 mg dan aktivitas urease sebesar 0,57 unit.
3. Urease yang diamobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat dapat digunakan hingga empat kali penggunaan ulang dengan efisiensi sebesar 65,62%.

#### **5.2 Saran**

Penelitian ini hanya mempelajari pengaruh konsentrasi kitosan dan konsentrasi urease, maka sebaiknya pada penelitian berikutnya perlu dilakukan pengamatan mengenai pengaruh konsentrasi optimum larutan natrium tripolifosfat supaya diperoleh aktivitas urease amobil yang lebih optimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Poedjiadi, A., dan Supriyanti F. M. T., 2006, **Dasar-dasar Biokimia**, UI-Press, Jakarta.
- [2] Akhyasrinuki, 2011, **Definisi dan Fungsi Enzim, Pengertian Koenzim dan Sifat-sifat Khusus**, <http://id.shvoong.com/writing-and-speaking/2150299-definisi-dan-fungsi-enzim-pengertian/>, diakses tanggal 21 Juni 2013.
- [3] Long-Liu Lin; Charng-Cherng Chyau, dan Wen-Hwei Hsu, 1998, **Biotechnol. Appl., Biochem.** 28, 61-68.
- [4] Fauziah, B., 2012, **Optimasi Parameter Analitik Biosensor Urea Berbasis Immobilisasi Urease dalam Membran Polianilin**, *Saintis*, Vol. 1.
- [5] Roberge M.R. dan R. Knowels, 1967, **The Ureolytic Microflora in a Black Spruce (*Picea mariana* Mill) Humus**, *Soil Society of America Proceedings*, 31(1) : 76-79.
- [6] Lloyd A.B. dan M.J. Sheaffe, 1973, **Urease Activity in Soils**, *Plant and Soil*, 39(1) : 71-80.
- [7] Mulyasuryani, Ani., Anna Roosdiana dan Arie Srihardyastutie, 2010, **The Potentiometric Urea Biosensors Using Chitosan Membrane**, *Indo. J. Chem* 10(2), 162-166.
- [8] Andaiyani, 2013, **Pengertian Urea**, <http://id.shvoong.com/exact-sciences/agronomy-agriculture/2346841-pengertian-urea/>, diakses tanggal 23 Februari 2013.
- [9] Rahardjo, M. dan Pribadi, E.R., 2010, **Pengaruh Pupuk Urea SP36 dan KCl Terhadap Pertumbuhan dan Produksi**



**Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb), Jurnal Littri,**  
Vol. 16 No. 3, Hlm. 98 – 105.

- [10] Adriano, W.S., E.H.C. Filho, J.A. Silva, R.L.C. Giodarno, dan L.R.B. Gonçalves, 2005, **Stabilization of Penicillin G-Acylase by Immobilization on Glutaraldehyde Activated Chitosan**, *Braz. J.Chem. Eng.*, 22(4) : 529-538.
- [11] Acosta N, A. Beldarrain, dan Y. Alonso, 2000, **Characterization of Recombinant Invertase Expressed in Methylootropic Yeasts**, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32: 179-187.
- [12] Kan, J., Pan, X. dan C. Chen, 2004, **Polyaniline-Uricase Biosensor Prepared with Template Process**, *Journal Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 19. p. 1635-1640.
- [13] Wuryanti, 2006, **Amobilisasi Enzim Bromelin dari Bonggol Nanas dengan Bahan Pendukung (Support) Karagenan dari Rumput Laut**, *JSKA*, Vol.IX.No.3.
- [14] Jaenudin, D., 2007, **Studi Awal Amobilisasi Bakteri *Lactococcus lactis subsp lactis* Menggunakan Alginat dengan Kitin dan Kitosan sebagai Kombinasi Bahan Pembawa (Carrier)**, *Skripsi*, Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, IPB, Bogor.
- [15] Chibata, I., 1978, **Imobilized Enzyme, Research and Development**, John Wiley and Sons Inc., New York.
- [16] Nugroho, A., 2010, **Pengaruh Konsentrasi Glutaraldehida Terhadap Kinerja Biosensor Potensiometri Urea Menggunakan Membran Kitosan**, *Skripsi*, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

- [17] Jayani, R. S., S. Saxena dan R. Gupta, 2005, **Microbial Pectinolytic Enzymes : A Review**, *Process Biochemistry*, Vol. 40, 2931-2944.
- [18] Shu X.Z., Zhu K.J., dan Song W., 2001, **Novel pH Sensitive Citrate Cross-Linked Chitosan Film for Drug Controlled-Release**, *Int. J. Pharm.*, 212, 19-28.
- [19] Bhumkar, D.R., dan V.B. Pokharkar, 2006, **Studies on Effect of pH on Cross-Linking of Chitosan with Sodium Tripolyphosphate : A Technical Note**, AAPS PharmSciTech 7(2) Article 50.
- [20] J.A. Ko, H.J. Park, Y.S. Park, S.J. Hwang, dan J.B. Park, 2011, **Chitosan Microparticle Preparation for Controlled Drug Release by Response Surface Methodology**, *J. Microencapsulation* Vol. 20, No. 6, 791-797.
- [21] Fwu, L. M., S.C. Shin, T.C. Chin, dan Y.L. Juin, 2002, **Adsorptiom of Indomethacin into Chemically Modified Chitosan**, *Polymer*, Vol. 43, 757-765.
- [22] Wisnuwati, 2011, **Aplikasi Metabolisme dan Enzim dalam Bidang Pertanian**, Departemen Sains Terapan dan Lingkungan, <http://pjj.vedca.net/biologi3/modul/bioter2.pdf>, diakses tanggal 26 Desember 2012.
- [23] Fisbein, W., dan P. Carbone, 1965, **Urease Catálisis. II. Inhibition of Enzyme by Hidroxyurea, Hydroxylamine and Acetohydroxamic**, *J.Biol Chem*, 2 : 240-247.
- [24] Hirayama, C., Sugimura, M., Saito, H. dan Nakamura, M., 2000, **Purification and Properties of Urease from the Leaf of Mulberry (*Morus alba*)**, *Phytochemistry* 53, 325-330.

- [25] Severo, D.O., G.E. Wassermann, dan C.R. Carlini, 2006, **Urease Display Biological Effects Independent of Enzymatic Activity is there a Connection to Diseases Caused by Urease-Producing Bacteria?**, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39 : 851-861
- [26] Bachmeier, Keri L., Amy E. Williams, John R. Warmington, dan Sookie S. Bang, 2001, **Urease Activity in Microbiologically-Induced Calcite Precipitation**, *Journal of Biotechnology* 93 (2002) : 171–181.
- [27] Yu, J.J., S.L. Smithson, P.W. Thomas, T.N. Krikland, dan G.T. Cole, 1997, **Isolation and Characterization of the Urease Gene (URE) from the Pathogenic Fungus *Coccidioides immitis***. *Gene* 198, 387-391.
- [28] Jan, A., 2010, ***Schizosaccharomyces pombe***, [http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Schizosaccharomyces\\_pombe](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Schizosaccharomyces_pombe), diakses tanggal 27 Desember 2012.
- [29] Forsburg, S.L., 2005, **The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* : Models for Cell Biology Research**, *Gravitational and Space Biology*, 18(2)
- [30] Copper, T.G., 1977, **The Tool of Biochemistry**, John Wiley and Sons, New York, pp 391-404.
- [31] Sawhney, S. K. dan R. Singh, 2008, **Introduction Practical Biochemistry 2<sup>nd</sup> Edition**, Narosa Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- [32] Nurhasanah dan D. Herasari, 2008, **Pemurnian Enzim Lipase dari Bakteri Lokal dan Aplikasinya dalam Reaksi Esterifikasi**, *Seminar Nasional Sains dan Teknologi II*, Universitas Lampung, Lampung.

- [33] Dennison, C., 2002, **A Guide to Protein Isolation**, Kluwer Academic Publisnger, New York.
- [34] Risma, D., 2012, **Isolasi dan Karakterisasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Beras Lapuk (*Oryza sativa*)**, *Skripsi*, Program S1 Reguler Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok.
- [35] Sawhney, S.K. dan R. Sigh, 2008, **Introductory Practical Biochemistry, Second Ed.**, Narosa Publishing House, New Delhi.
- [36] Suklha., S.S., K.L. Dorris., A. Suklha dan J.L. Margrave., 2003, **Adsorption of Chromium from Aqueous Solution** by Maple Sawdust, *J. Haz Mater*, Vol 12: 1-3.
- [37] Eggins, B., 2002, **Chemical, Sensor and Biosensor**, John Wiley and Sons, New York.
- [38] Varshosaz, J. dan Reza Alinagari, 2005, **Effect of Citric Acid as Cross-Linking Agent on Insulin Loaded Chitosan Microsphere**, *Iranian Polymer Journal*, Vol. 14, No. 7.
- [39] Wook, K.S., 2004, **Development of Enzyme Immobilization Technique**, [http://www.cheric.org/ip\[age/e/ipdata/2004/02/file/e200402-1001.pdf](http://www.cheric.org/ip[age/e/ipdata/2004/02/file/e200402-1001.pdf), diakses tanggal 28 Desember 2012.
- [40] Su'I, M., Harijono, Yuniata, dan Aulani'am, 2008, **Perubahan Aktivitas Enzim Amobil Lipase dari Kentos Kelapa**, *Laporan Penelitian*, Universitas Brawijaya, Malang.
- [41] Shahidi F, Janak K.V.A, dan You J.J., 1999, **Food Applications of Chitin and Chitosan**, *J. Food Sci and Technology*, 10 : 37-51.

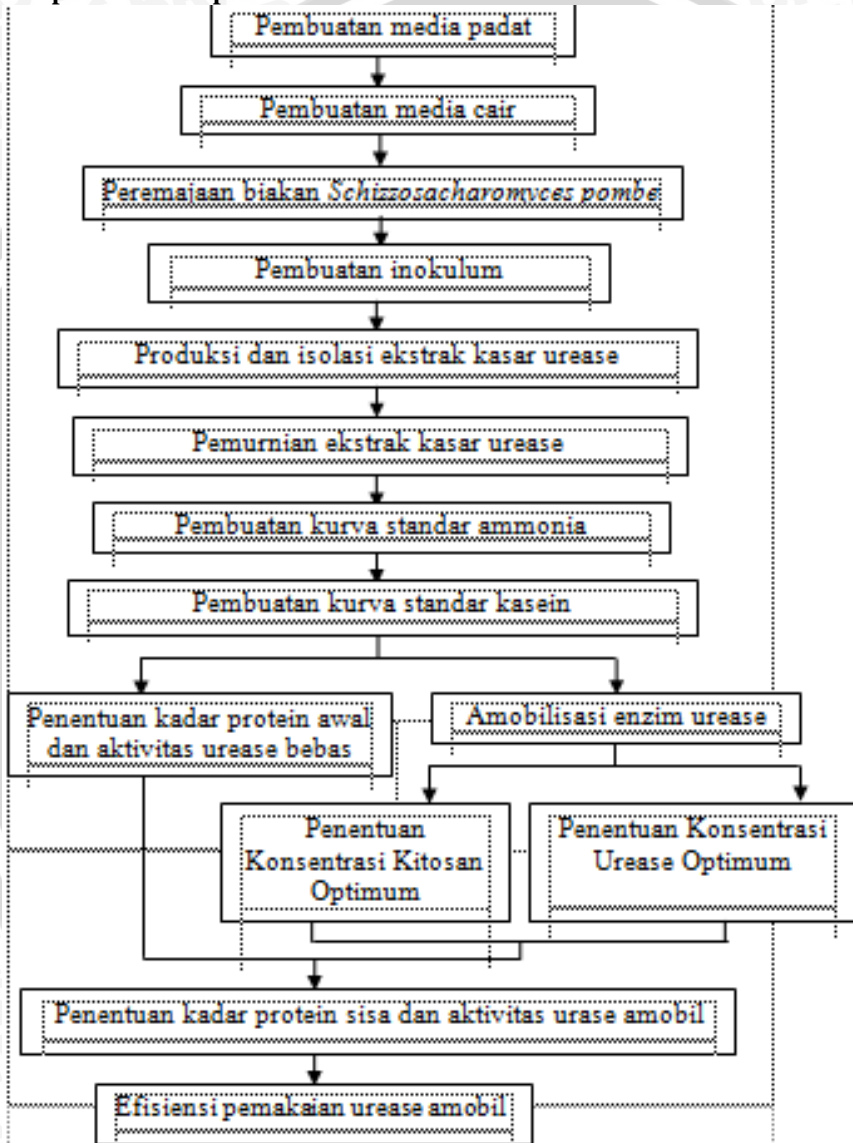
- [42] Fitri, K., 2005, **Kajian Adsorpsi dan Desorpsi  $\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_3^{3-}$  dalam Limbah Fotografi Pada dan dari Adsorben Kitin dan Asam Humat Terimobilisasi pada Kitin**, Tesis, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- [43] Mi, Fwu-Long, Hsing-Wen Sung, Shin-Shing Shyu, Chia-Ching Su, dan Chih-Kang Peng, 2003, **Synthesis and Characterization of Biodegradable TPP/Genipin Cocrosslinked Chitosan Gel Beads**, *Polymer*, 44, 6521-6530.
- [44] Roosdiana A., Setianingsih T., Mardiana D. dan Suratmo, 2009, **Characterization of Immobilized Lipase in Aluminosilicate for Lactosyl Palmitate Synthesis**, *Indonesia Journal Chemical.*, Vol 9, hal 201-205.





## LAMPIRAN

### Lampiran A. Tahapan Penelitian



## Lampiran B. Preparasi Larutan

### B.1 Larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,2 M

Untuk membuat larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M sebanyak 500 mL, berat padatan yang harus ditimbang adalah:

$$\begin{aligned}\text{massa Na}_2\text{HPO}_4 &= 142 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 0,2 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 0,5 \text{ L} \\ &= 14,2 \text{ g}\end{aligned}$$

Ditimbang 14,2 g padatan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  lalu dilarutkan dengan 50 mL akuades di dalam gelas kimia 100 mL sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik. Kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas lalu dikocok sampai homogen.

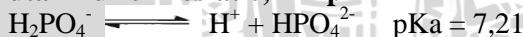
### B.2 Larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,2 M

Untuk membuat larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M sebanyak 500 mL, berat padatan yang harus ditimbang adalah:

$$\begin{aligned}\text{massa NaH}_2\text{PO}_4 &= 120 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 0,2 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 0,5 \text{ L} \\ &= 12 \text{ g}\end{aligned}$$

Ditimbang 12 g padatan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  lalu dilarutkan dengan 50 mL akuades di dalam gelas kimia 100 mL sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik. Kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas lalu dikocok sampai homogen.

### B.3 Larutan Buffer Fosfat 0,2 M pH 7



$$\text{pH} = 7; \text{pK}_a \text{ H}_2\text{PO}_4^- = 7,21$$

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{Na}_2\text{HPO}_4]}{[\text{NaH}_2\text{PO}_4]}$$

$$7 = 7,21 + \log a$$

$$\log a = 7 - 7,21$$

$$\log a = -0,21$$

$$a = 0,6166$$

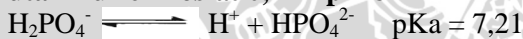
$$[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 0,6166$$

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4]$$

$$\begin{aligned}
 [\text{Na}_2\text{HPO}_4] &= 0,6166 [\text{NaH}_2\text{PO}_4] \\
 M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\
 V_1 &= 0,6166V_2 \\
 V_{\text{total}} &= V_1 + V_2 \\
 V_{\text{total}} &= 0,6166V_2 + V_2 \\
 V_{\text{total}} &= 1,6166V_2 \\
 V(\text{NaH}_2\text{PO}_4) &= \frac{1}{1,6166} \times 100 \text{ mL} = 61,9 \text{ mL} \\
 V(\text{Na}_2\text{HPO}_4) &= 100 \text{ mL} - 61,9 \text{ mL} = 38,1 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Untuk membuat larutan buffer fosfat pH 7 sebanyak 100 mL, dilakukan dengan cara memipet 61,9 mL larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  kemudian dipindahkan ke dalam gelas kimia 250 mL lalu ditambahkan 38,1 mL larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik dan diukur pH larutan menggunakan pH meter sehingga diperoleh larutan buffer fosfat pH 7.

#### B.4 Larutan Buffer Fosfat 0,2 M pH 8



$$\text{pH} = 8 ; \text{pK}_a \text{ H}_2\text{PO}_4^- = 7,21$$

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{Na}_2\text{HPO}_4]}{[\text{NaH}_2\text{PO}_4]}$$

$$8 = 7,21 + \log a$$

$$\log a = 8 - 7,21$$

$$\log a = 0,79$$

$$a = 6,166$$

$$[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 6,166$$

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4]$$

$$[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 6,166 [\text{NaH}_2\text{PO}_4]$$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$V_1 = 6,166V_2$$

$$V_{\text{total}} = V_1 + V_2$$

$$V_{\text{total}} = 6,166V_2 + V_2$$

$$V_{\text{total}} = 7,166V_2$$

$$V(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = \frac{1}{7,166} \times 100 \text{ mL} = 13,1 \text{ mL}$$

$$V(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 100 \text{ mL} - 13,1 \text{ mL} = 86,9 \text{ mL}$$

Untuk membuat larutan buffer fosfat pH 8 sebanyak 100 mL, dilakukan dengan cara memipet 13,1 mL larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  kemudian dipindahkan ke dalam gelas kimia 250 mL lalu ditambahkan 86,9 mL larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik dan diukur pH larutan menggunakan pH meter sehingga diperoleh larutan buffer fosfat pH 8.

### B.5 Larutan Asam Asetat 0,1 M

$$\text{Berat molekul CH}_3\text{COOH} = 60 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$\rho \text{ CH}_3\text{COOH} = 1,05 \cdot 10^3 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

$$[\text{CH}_3\text{COOH}] = \frac{\text{Berat molekul CH}_3\text{COOH}}{\rho \text{ CH}_3\text{COOH}}$$

$$= \frac{60 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1,05 \cdot 10^3 \frac{\text{g}}{\text{L}}}$$

$$= 0,05714 \text{ M}$$

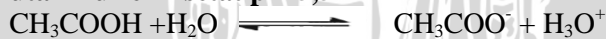
$$= 17,5 \text{ M}$$

Untuk larutan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,1 M sebanyak 100 mL :

$$\text{Vol. CH}_3\text{COOH} = \frac{0,1 \text{ M} \times 100 \text{ mL}}{17,5 \text{ M}} = 0,5714 \text{ mL} = 0,6 \text{ mL}$$

Asam asetat glasial dipipet sebanyak 0,6 mL dan dilarutkan dengan sedikit akuades di dalam gelas kimia 250 mL, lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dikocok sampai homogen.

### B.6 Larutan Buffer Asetat pH 5,5



$$\text{pH} = 5,5 ; \text{pKa CH}_3\text{COOH} = 4,74$$

$$K_a = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-] [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = K_a \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = 10^{-5,5} \text{ M}$$

$$-\log[\text{H}_3\text{O}^+] = -\log K_a \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}$$

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

$$5,5 = 4,74 - \log \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}$$

$$-0,76 = \log \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}$$

$$0,1738 = \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}$$

Untuk buffer asetat pH 5,5 0,1 M sebanyak 100 mL :

$$0,1738 = \frac{(0,1 \text{ M} \times 100 \text{ mL}) - (1 \text{ M} \times \text{Vol. NaOH})}{(x+100)\text{mL} - (1 \text{ M} \times \text{Vol. NaOH})}$$

$$0,1738 = \frac{(10 - \text{Vol. NaOH})}{(x+100)\text{mL}}$$

$$0,1738 \text{ Vol. NaOH} = 10 - \text{Vol. NaOH}$$

$$1,1738 \text{ Vol. NaOH} = 10$$

$$\text{Vol. NaOH} = \frac{10}{1,1738} = 8,5193 \text{ mL} = 8,5 \text{ mL}$$

Diukur pH 100 mL larutan asam asetat 0,1 M menggunakan pH meter sambil diaduk dengan pengaduk magnetik, lalu ditambahkan tetes demi tetes larutan NaOH 1M hingga pH larutan menjadi 5,5. Apabila pH larutan lebih dari 5,5 maka dilakukan penambahan larutan CH<sub>3</sub>COOH 0,1 M dan apabila pH larutan kurang dari 5,5, maka dilakukan penambahan larutan NaOH 1 M hingga diperoleh larutan dengan pH 5,5.



## B.7 Larutan Standar Kasein 1000-10000 ppm

### B.7.1 Larutan Standar Kasein 10000 ppm

$$\begin{aligned}[\text{kasein}] &= 10000 \text{ ppm} \\ &= \frac{10000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{10000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}}\end{aligned}$$

Untuk larutan kasein 10000 ppm sebanyak 100 mL :

$$\begin{aligned}\text{Massa kasein} &= \frac{10000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \text{ mL} \\ &= 1000 \text{ mg} = 1,0 \text{ g}\end{aligned}$$

Kasein ditimbang sebanyak 1,0 g dan dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia 100 mL. Kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 M hingga padatan kasein larut sempurna, lalu dipindahkan dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

### B.7.2 Larutan Standar Kasein 1000-9000 ppm

Contoh :

- Untuk larutan baku kasein 1000 ppm :

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 10000 \text{ ppm} \times V_1 &= 1000 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= \frac{1000 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{10000 \text{ ppm}} = 1 \text{ mL}\end{aligned}$$

Larutan baku kasein 10000 ppm dipipet pada volume tertentu dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, diencerkan secara kuantitatif dengan akuades sampai tandai batas.

<b>M<sub>1</sub> (ppm)</b>	<b>V<sub>1</sub> (mL)</b>	<b>M<sub>2</sub> (ppm)</b>	<b>V<sub>2</sub> (mL)</b>
10000	1	1000	10
10000	2	2000	10
10000	3	3000	10
10000	4	4000	10
10000	5	5000	10
10000	6	6000	10
10000	7	7000	10
10000	8	8000	10
10000	9	9000	10

### B.8 Reagen Biuret

Ditimbang 0,15 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dan 0,6 g  $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$ , kemudian dilarutkan dengan akuades sebanyak 30 mL dalam gelas kimia 100 mL. Lalu ditambahkan larutan  $\text{NaOH}$  10% sebanyak 30 mL sambil diaduk dengan pengaduk. Selanjutnya, larutan campuran dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas. Kemudian dikocok hingga homogen.

### B.9 Reagen Nessler

Ditimbang 10,0002 g  $\text{HgI}_2$  dan 7,0024 g  $\text{KI}$ . Kemudian dilarutkan menggunakan akuades di dalam gelas kimia 250 mL dan ditambahkan 16,0032 g  $\text{NaOH}$ . Lalu, dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditandabatkan menggunakan akuades sehingga didapat reagen Nessler dengan konsentrasi 0,22 M.

### B.10 Larutan $\text{HCl}$ 0,1 M

Larutan  $\text{HCl}$  pekat dipipet 0,8 mL, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan akuades hingga volume 100 mL. Kemudian dikocok hingga homogen.

### B.11 Larutan $\text{BaCl}_2$ 0,1 M

Ditimbang 2,4424 g  $\text{BaCl}_2$  dan dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia 100 mL lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas. Kemudian dikocok hingga homogen.

### B.12 Larutan Stok Ammonia 500 ppm

$$[\text{ammonia}] = \frac{\text{mg NH}_3}{1 \text{ L}}$$

$$500 \text{ ppm} = \frac{\text{mg NH}_3}{1 \text{ L}}$$

$$\text{mg NH}_3 = 500 \text{ mg}$$

$$\text{g NH}_3 = 0,5 \text{ g}$$

$$\begin{aligned} \text{massa (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 &= \frac{\text{Mr (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4}{2 \times \text{Mr NH}_3} \times 0,5 \text{ g} \\ &= \frac{132 \text{ g/mol}}{34 \text{ g/mol}} \times 0,5 \text{ g} \\ &= 1,941 \text{ g} \end{aligned}$$

Ditimbang 1,941 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan dilarutkan dengan 50 mL akuades di dalam gelas kimia lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas. Kemudian dikocok hingga homogen.

### B.13 Larutan Standar Ammonia

Dipipet sebanyak 0,2 mL ; 0,4 mL ; 0,6 mL ; 0,8 mL larutan stok ammonia 500 ppm, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL yang berbeda-beda dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Kemudian dikocok hingga homogen sehingga diperoleh larutan standar ammonia dengan konsentrasi 1 ppm ; 2 ppm ; 3 ppm ; 4 ppm.

### B.14 Larutan NaOH 0,1 M

$$\text{Mol NaOH} = 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} = 0,01 \text{ mol}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa NaOH} &= \text{mol NaOH} \times \text{Mr NaOH} \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol} = 0,4 \text{ g} \end{aligned}$$

Ditimbang 0,4 g NaOH dan dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia 100 mL. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditandabatkan menggunakan akuades dan dikocok hingga homogen.

### B.15 Larutan NaOH 1 M

$$\text{Mol NaOH} = 1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} = 0,1 \text{ mol}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa NaOH} &= \text{mol NaOH} \times \text{Mr NaOH} \\ &= 0,1 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol} = 4 \text{ g} \end{aligned}$$

Ditimbang 4 g NaOH dan dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia 100 mL. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditandabatkan menggunakan akuades dan dikocok hingga homogen.

#### **B.16 Larutan NaOH 10%**

Ditimbang 10 g NaOH kemudian lalu dilarutkan dengan akuades 50 mL dalam gelas kimia kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas kemudian dikocok hingga homogen.

#### **B.17 Larutan Urea 0,2 mM**

$$\begin{aligned}\text{mol urea} &= 0,2 \text{ mmol/L} \times 0,1 \text{ L} = 0,02 \text{ mmol} \\ \text{massa urea} &= \text{mol} \times \text{Mr} \\ &= 0,02 \text{ mmol} \times 60 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,0012 \text{ g}\end{aligned}$$

Ditimbang urea sebanyak 0,0012 g, dilarutkan dengan akuades di dalam gelas kimia, kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas. Dikocok sampai homogen.

#### **B.18 Larutan CH<sub>3</sub>COOH 3%**

Larutan asam asetat glasial dipipet sebanyak 3 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas. Kemudian dikocok hingga homogen.

#### **B.19 Larutan Kitosan**

Ditimbang (0,75 ; 1,00 ; 1,25 ; 1,50 ; 1,75) g bubuk kitosan kemudian dilarutkan dengan 50 mL asam asetat 3% dalam gelas kimia. Larutan diaduk dengan pengaduk magnetik hingga homogen sehingga diperoleh larutan kitosan 1,5% ; 2,0% ; 2,5% ; 3,0% ; 3,5%.

### **B.20 Larutan $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ 3%**

Ditimbang 3 g padatan  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  p.a, kemudian ditambahkan 50 mL akuades sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditandabatkan dengan akuades. Kemudian dikocok hingga homogen.

### **B.21 Larutan $\text{CCl}_3\text{COOH}$ 8% (W/v)**

Ditimbang 0,8010 g  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades steril di dalam gelas kimia 100 mL. Lalu, dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan ditandabatkan. Kemudian dikocok hingga homogen.

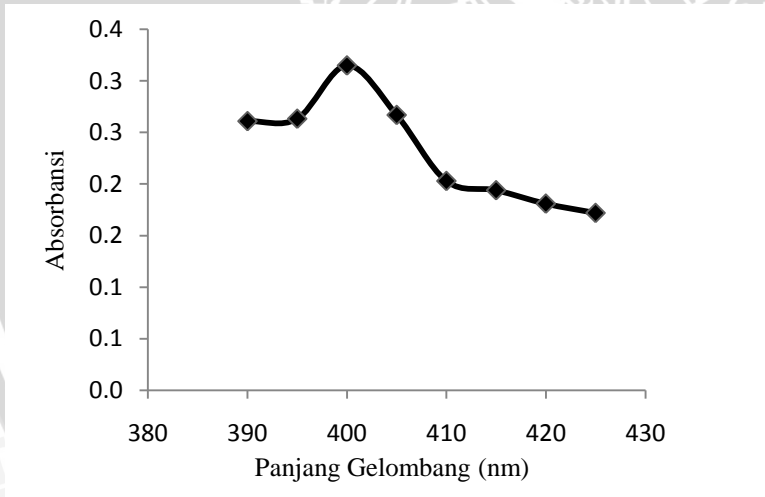




**Lampiran C. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Ammonia**

**Tabel C.1:** Data absorbansi larutan ammonia 2 ppm pada berbagai panjang gelombang

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3	Abs. Rata-rata
390	0,260	0,262	0,261	0,261
395	0,263	0,264	0,264	0,264
400	0,318	0,312	0,315	0,315
405	0,265	0,269	0,267	0,267
410	0,200	0,206	0,203	0,203
415	0,189	0,199	0,194	0,194
420	0,182	0,180	0,181	0,181
425	0,169	0,175	0,172	0,172

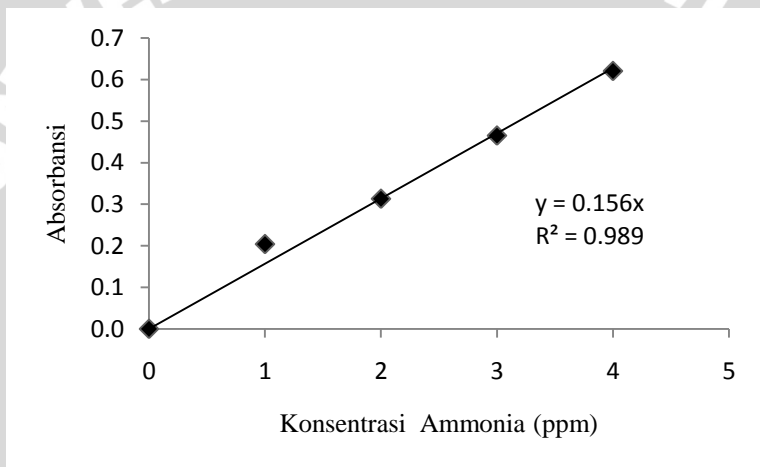


**Gambar C.1:** Kurva Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Ammonia 2 ppm

## Lampiran D. Kurva Standar Ammonia

**Tabel D.1:** Data absorbansi kurva standar ammonia

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3	Abs. rata-rata
0	0	0	0	0
1	0,211	0,199	0,202	0,204
2	0,302	0,305	0,332	0,313
3	0,461	0,466	0,468	0,465
4	0,602	0,629	0,630	0,620

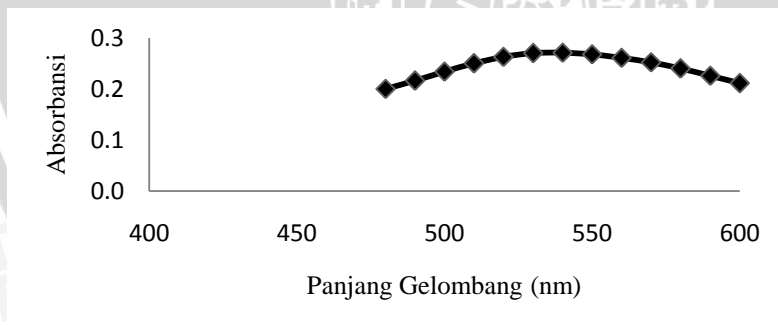


**Gambar D.1:** Kurva Standar Ammonia

## Lampiran E. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein

**Tabel E.1:** Data absorbansi larutan kasein 5000 ppm pada berbagai panjang gelombang

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi
600	0,211
590	0,226
580	0,240
570	0,252
560	0,261
550	0,268
540	0,271
530	0,270
520	0,263
510	0,250
500	0,234
490	0,216
480	0,200

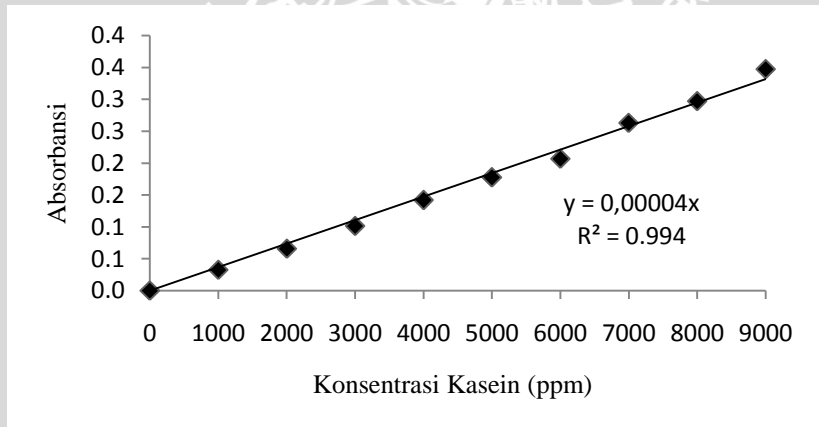


**Gambar E.1:** Kurva Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein 5000 ppm

## Lampiran F. Kurva Standar Kasein

**Tabel F.1:** Data absorbansi larutan kasein

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3	Abs. Rata-rata
0	0	0	0	0
1000	0,031	0,032	0,035	0,033
2000	0,066	0,067	0,064	0,066
3000	0,100	0,104	0,100	0,101
4000	0,141	0,140	0,144	0,142
5000	0,177	0,177	0,178	0,177
6000	0,208	0,206	0,206	0,207
7000	0,262	0,264	0,263	0,263
8000	0,297	0,299	0,295	0,297
9000	0,346	0,348	0,347	0,347



**Gambar F.1:** Kurva Standar Kasein

## Lampiran G. Data Pengamatan

### G.1 Amobilisasi Urease Penentuan Konsentrasi Kitosan Optimum

#### G.1.1 Data Absorbansi Uji Kadar Protein Sisa

**Tabel G.1:** Data absorbansi uji kadar protein sisa penentuan konsentrasi kitosan optimum

[Kitosan] (%)	Absorbansi		
	I	II	III
1,5	0,207	0,207	0,207
2,0	0,207	0,207	0,207
2,5	0,204	0,204	0,204
3,0	0,205	0,205	0,205
3,5	0,205	0,206	0,206

#### G.1.2 Data Absorbansi Uji Aktivitas Urease Amobil

**Tabel G.2:** Data absorbansi uji aktivitas urease amobil penentuan konsentrasi kitosan optimum

[Kitosan] (%)	Absorbansi		
	I	II	III
1,5	0,226	0,220	0,230
2,0	0,258	0,253	0,256
2,5	0,293	0,315	0,292
3,0	0,281	0,277	0,274
3,5	0,269	0,267	0,260



## G.2 Amobilisasi Urease Penentuan Konsentrasi Urease Optimum

### G.2.1 Data Absorbansi Uji Kadar Protein Sisa

**Tabel G.3:** Data absorbansi uji kadar protein sisa penentuan konsentrasi urease optimum

[urease] (mg/mL)	Absorbansi		
	I	II	III
0,840	0,200	0,200	0,200
1,680	0,201	0,200	0,200
2,520	0,200	0,200	0,201
3,360	0,203	0,202	0,202
4,200	0,204	0,203	0,204

### G.2.2 Data Absorbansi Uji Aktivitas Urease Amobil

**Tabel G.4:** Data absorbansi uji aktivitas urease amobil penentuan konsentrasi urease optimum

[urease] (mg/mL)	Absorbansi		
	I	II	III
0,840	0,400	0,396	0,399
1,680	0,418	0,412	0,415
2,520	0,602	0,604	0,610
3,360	0,483	0,485	0,490
4,200	0,433	0,438	0,432

### G.3 Data Absorbansi Penentuan Efisiensi Penggunaan Ulang Urease Amobil

#### G.3.1 Data Absorbansi Uji Aktivitas Urease Amobil

**Tabel G.5:** Data absorbansi uji aktivitas penggunaan ulang urease amobil

Penggunaan Ke-	Absorbansi		
	I	II	III
I	0,529	0,524	0,540
II	0,479	0,415	0,500
III	0,339	0,335	0,338
IV	0,218	0,216	0,221
V	0,108	0,103	0,111



## Lampiran H. Pemurnian Urease

### H.1. Pemurnian Ekstak Kasar Urease dengan Amonium Sulfat Fraksi 30-45%

Penambahan amonium sulfat ke dalam ekstrak kasar urease berdasarkan Tabel amonium sulfat yang ditambahkan pada setiap liter larutan urease (Lampiran H.2).

Contoh : fraksi 0-30%, maka perlu ditambahkan 176 g amonium sulfat pada 1000 mL larutan urease, sehingga pada 40 mL ekstrak kasar urease adalah :

$$\frac{176g}{1000mL} = \frac{w}{40mL}$$

$$w = 7,04 g$$

w = banyaknya amonium sulfat yang ditambahkan



## H.2. Massa Amonium Sulfat (g) yang Ditambahkan dalam Setiap Liter Larutan

Ammonium Sulfate Saturation Tables

Starting concentration	Final concentration													
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%
0%	56	114	144	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561
10%	—	57	86	118	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494
20%	—	—	29	59	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424
25%	—	—	—	30	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390
30%	—	—	—	—	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356
35%	—	—	—	—	—	31	63	94	129	164	200	238	278	319
40%	—	—	—	—	—	—	31	63	97	132	168	205	245	285
45%	—	—	—	—	—	—	—	32	65	99	134	171	210	250
50%	—	—	—	—	—	—	—	—	33	66	101	137	176	214
55%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	33	67	103	141	179
60%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	34	69	105	143

Values given are the number of grams to be added to 1 liter of solution to change the ammonium sulfate concentration from the starting concentration to final concentration. All values are adjusted for changes in volume at room temperature. The saturation of ammonium sulfate does not vary significantly between 4°C and 25°C, so the values given here can normally be used at both temperatures. Saturated ammonium sulfate is 4.1 M at 25°C. Add 761 grams to 1 liter of distilled H<sub>2</sub>O.

## Lampiran I. Perhitungan

### I.1 Perhitungan Aktivitas Urease Bebas

Rumus perhitungan aktivitas urease adalah sebagai berikut:

$$AE = \frac{x \times V}{Mr \text{ amonia}} \times \frac{fp}{p \times q}$$

Dimana:

Volume total larutan produk hidrolisis (V)	= 10 mL
Volume urease (p)	= 1 mL
Waktu reaksi (q)	= 20 menit
Faktor pengenceran (fp)	= 2,5 kali
Mr ammonia	= 17 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

Contoh : Perhitungan aktivitas urease bebas pada pH 7, temperatur 45°C, waktu inkubasi 20 menit dengan absorbansi 0,776 adalah:

Diketahui persamaan regresi ammonia:

$$y = 0,156x$$

Kadar ammonia :

$$Y = 0,156x$$

$$0,776 = 0,156x$$

$$X = 4,9744 \mu\text{g/mL}$$

Aktivitas urease bebas :

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas} &= \frac{4,9744(\mu\text{g} / \text{mL}) \times 10\text{mL}}{17(\mu\text{g} / \mu\text{mol})} \times \frac{2,5}{1\text{mL} \times 20\text{menit}} \\ &= 0,36 \mu\text{mol/mL menit (unit)} \end{aligned}$$

**Tabel I.1:** Aktivitas urease bebas

Enzim	Absorbansi			Aktivitas (unit)			Rata-rata
Urease	0,776	0,802	0,770	0,36	0,38	0,36	0,37



## I.2 Perhitungan Kadar Protein Awal

Kadar protein awal enzim urease ditentukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi pada kurva baku kasein. Persamaan regresi linearnya:

$$Y = 0,00004X$$

Volume enzim yang digunakan untuk penentuan = 2mL

Volume larutan standar kasein<sub>5000 ppm</sub> yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

Konsentrasi total = Konsentrasi Protein Enzim + Kasein 5000 ppm

Contoh : perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,371 adalah:

$$Y = 0,00004x$$

$$0,371 = 0,00004x$$

$$X = 9275 \text{ ppm}$$

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi protein total – konsentrasi kasein yang ditambahkan

$$= 9275 \text{ ppm} - 5000 \text{ ppm}$$

$$= 4275 \text{ ppm}$$

$$= 4,275 \text{ mg/mL}$$

**Tabel I.2:** Kadar protein urease awal

Enzim	Absorbansi	[protein] (mg/mL)	Rata-rata
Urease	0,371   0,366   0,367	4,275   4,150   4,175	4,200

## I.3 Penentuan Jumlah Urease Terjebak Variasi Konsentrasi Kitosan

### I.3.1 Jumlah urease sebelum amobilisasi

Diketahui bahwa jumlah urease bebas setelah pemurnian yaitu 4,200 mg/mL urease. Sehingga jumlah urease sebelum amobilisasi dapat ditentukan dengan rumus berikut :

$$W = 4,200 \text{ mg/mL enzim} \times V \text{ ml enzim yang dicuplik}$$

Dimana :

$$V = \text{volume urease murni yang dicuplik} = 1 \text{ mL}$$

$$W = \text{jumlah urease mula-mula sebelum amobilisasi (mg)}$$

Maka jumlah urease sebelum amobil yaitu:

$$W = 4,200 \text{ mg/mL} \times 1 \text{ mL} = 4,200 \text{ mg}$$

### I.3.2 Jumlah urease setelah amobilisasi variasi konsentrasi kitosan

**Tabel I.3:** Volume larutan urease setelah amobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi [kitosan])

[kitosan] (%)	Volume larutan urease (mL)			Volume larutan urease rata-rata (mL)
	I	II	III	
1,5	3,600	3,600	3,600	3,600
2,0	3,600	3,500	3,500	3,530
2,5	3,700	3,600	3,600	3,630
3,0	3,200	3,000	3,000	3,070
3,5	3,000	3,000	3,000	3,000

Volume urease yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan standar Kasein<sub>5000 ppm</sub> yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

Jumlah urease setelah amobilisasi ditentukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi urease yang tidak teramobil dengan persamaan regresi linear kasein. Untuk perhitungan jumlah urease setelah amobilisasi pada konsentrasi kitosan 1,5% dengan nilai absorbansi 0,207 adalah:

Diketahui persamaan regresi:

$$Y = 4,0 \cdot 10^{-5} X$$

$$0,207 = 4,0 \cdot 10^{-5} X$$

$$X = 5175 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total = konsentrasi urease + konsentrasi kasein 5000 ppm

Konsentrasi urease = 5175 ppm – 5000 ppm  
= 175 ppm  
= 0,175 mg/mL

Diketahui volume larutan urease setelah amobilisasi adalah 3,6 mL sehingga jumlah urease setelah amobilisasi :

$$0,175 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 3,6 \text{ mL} = 3,780 \text{ mg}$$

**Tabel I.4:** Jumlah urease yang tidak terjebak setelah amobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi [kitosan])

[kitosan] (%)	Absorbansi			Rata-rata	Jumlah urease (mg)			Rata-rata
	I	II	III		I	II	III	
1,5	0,207	0,207	0,207	0,207	3,780	3,780	3,780	3,780
2,0	0,207	0,207	0,207	0,207	3,780	3,675	3,675	3,675
2,5	0,204	0,204	0,204	0,204	3,220	2,160	2,160	2,180
3,0	0,205	0,205	0,205	0,205	2,400	2,250	2,250	2,300
3,5	0,205	0,206	0,206	0,206	2,250	2,700	2,700	2,550

### I.3.3 Penentuan jumlah urease yang terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat

Untuk menentukan jumlah urease yang terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat dilakukan dengan mengurangi jumlah urease sebelum amobilisasi dengan jumlah urease setelah amobilisasi, dengan rumus:

$$W_{\text{terjebak}} = W_{\text{sebelum amobilisasi}} - W_{\text{setelah amobilisasi}}$$

Dimana :  $W_{\text{sebelum amobilisasi}}$  = jumlah urease sebelum amobilisasi (mg)

$W_{\text{setelah amobilisasi}}$  = jumlah urease setelah amobilisasi (mg)

**Tabel I.5:** Jumlah urease terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi [kitosan])

Jumlah urease awal (mg)	[kitosan] (%)	Jumlah urease terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat (mg)			Rata-rata (mg)	SD	SD (%)
		I	II	III			
4,200	1,5	0,420	0,420	0,420	0,420	0	0
4,200	2,0	0,420	0,525	0,525	0,525	0,06	11,43
4,200	2,5	1,980	2,040	2,040	2,020	0,03	1,49
4,200	3,0	1,800	1,950	1,950	1,900	0,09	4,74
4,200	3,5	1,950	1,500	1,500	1,650	0,26	15,76

## I.4 Penentuan Jumlah Urease Terjebak Variasi Konsentrasi Urease

### I.4.1 Jumlah urease sebelum amobilisasi

Diketahui bahwa jumlah urease bebas setelah pemurnian yaitu 4,200 mg/mL urease. Sehingga jumlah urease sebelum amobilisasi dalam 1 mL larutan urease yang mengandung V mL urease dapat ditentukan dengan rumus berikut :

$$W = 4,200 \text{ mg/mL enzim} \times V \text{ ml enzim yang dicuplik}$$

Dimana :

V = volume urease murni yang dicuplik = 0,2 mL

W = jumlah urease mula-mula sebelum amobilisasi (mg)

Contoh :

$$W = 4,200 \text{ mg/mL} \times 0,2 \text{ mL} = 0,840 \text{ mg}$$

Dengan cara yang sama, maka jumlah urease sebelum amobilisasi yaitu: (0,840; 1,680; 2,520; 3,360; 4,200) mg. Konsentrasi urease sebelum amobilisasi untuk 0,2 mL/1 mL adalah :

$$\frac{4,200 \text{ mg/mL} \times 0,2 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0,840 \text{ mg/mL}$$

Dengan cara yang sama diketahui konsentrasi urease sebelum amobilisasi sebesar : (0,840; 1,680; 2,520; 3,360; 4,200) mg/mL.

#### I.4.2 Jumlah urease setelah amobilisasi variasi konsentrasi urease

**Tabel I.6:** Volume larutan urease setelah amobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi [urease])

[urease] (mg/mL)	Volume larutan urease (mL)			Volume larutan urease rata-rata (mL)
	I	II	III	
0,840	3,600	3,600	3,600	3,600
1,680	3,700	3,800	3,700	3,730
2,520	3,600	3,800	3,600	3,670
3,360	3,400	3,400	3,400	3,400
4,200	4,000	4,000	4,000	4,000

Volume urease yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan standar Kasein<sub>5000 ppm</sub> yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

Jumlah urease setelah amobilisasi ditentukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi urease yang tidak teramobil dengan persamaan regresi linear kasein. Untuk perhitungan jumlah urease setelah amobilisasi pada konsentrasi urease 0,840 mg/mL dengan nilai absorbansi 0,200 adalah:

Diketahui persamaan regresi:

$$Y = 4,0 \cdot 10^{-5} X$$

$$0,840 = 4,0 \cdot 10^{-5} X$$

$$X = 5000 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total = konsentrasi urease + konsentrasi kasein 5000 ppm

Konsentrasi urease = 5000 ppm – 5000 ppm  
= 0 ppm  
= 0 mg/mL

Diketahui volume larutan urease setelah amobilisasi adalah 3,6 mL sehingga jumlah urease setelah amobilisasi :

$$0 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 3,6 \text{ mL} = 0 \text{ mg}$$



**Tabel I.7:** Jumlah urease yang tidak terjebak setelah amobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi [urease])

[urease] (mg/mL)	Absorbansi			Rata-rata	Jumlah urease (mg)			Rata-rata
	I	II	III		I	II	III	
0,840	0,200	0,200	0,200	0,200	0	0	0	0
1,680	0,201	0,200	0,200	0,200	0,555	0	0	0,185
2,520	0,200	0,200	0,201	0,200	0	0	0,540	0,180
3,360	0,203	0,202	0,202	0,202	1,530	1,020	1,020	1,190
4,200	0,204	0,203	0,204	0,204	2,400	1,800	2,400	2,200

### I.4.3 Penentuan jumlah urease yang terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat

Untuk menentukan jumlah urease yang terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat dilakukan dengan mengurangi jumlah urease sebelum amobilisasi dengan jumlah urease setelah amobilisasi, dengan rumus:

$$W_{\text{terjebak}} = W_{\text{sebelum amobilisasi}} - W_{\text{setelah amobilisasi}}$$

Dimana :  $W_{\text{sebelum amobilisasi}}$  = jumlah urease sebelum amobilisasi (mg)  
 $W_{\text{setelah amobilisasi}}$  = jumlah urease setelah amobilisasi (mg)

**Tabel I.8:** Jumlah urease terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat (variasi [urease])

Jumlah urease awal (mg)	[urease] (mg/mL)	Jumlah urease terjebak dalam kitosan-natrium tripolifosfat (mg)			Rata-rata (mg)	SD	SD (%)
		I	II	III			
0,840	0,840	0,840	0,840	0,840	0,840	0	0
1,680	1,680	1,125	1,680	1,680	1,495	0,320	21,40
2,520	2,520	2,520	2,520	1,980	2,340	0,312	13,33
3,360	3,360	1,830	2,340	2,340	2,170	0,294	13,55
4,200	4,200	1,800	2,400	1,800	2,000	0,346	17,30

## I.5 Penentuan Aktivitas Urease Amobil

### I.5.1 Penentuan aktivitas urease variasi konsentrasi kitosan

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva standar ammonia. Untuk melihat besarnya satu unit aktivitas enzim maka digunakan rumus:

$$AE = \frac{x \times V}{Mr \text{ amonia}} \times \frac{fp}{p \times q}$$

Dimana:

Volume total larutan produk hidrolisis = 10 mL  
 Jumlah urease amobil (p) = 0,5 gram  
 Waktu reaksi (q) = 20 menit  
 Faktor pengenceran (fp) = 2,5 kali  
 Mr ammonia = 17 µg/µmol

Contoh perhitungan:

Perhitungan aktivitas urease amobil pada pH 7, temperatur 45°C, waktu inkubasi 20 menit dengan absorbansi 0,226 adalah:

Diketahui persamaan regresi ammonia:

$$y = 0,156x$$

Kadar ammonia :

$$Y = 0,156x$$

$$0,226 = 0,156x$$

$$X = 1,4487 \mu\text{g/mL}$$

Aktivitas urease amobil :

$$\text{Aktivitas} = \frac{1,4487(\mu\text{g} / \text{mL}) \times 10\text{mL}}{17(\mu\text{g} / \mu\text{mol})} \times \frac{2,5}{0,5 \text{ g} \times 20\text{menit}}$$

$$= 0,21 \mu\text{mol/g menit}$$

**Tabel I.9 :** Aktivitas urease variasi konsentrasi kitosan

[kitosan (%)	Absorbansi			Aktivitas urease ( $\mu\text{mol.gr}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ )			Rata- rata	SD	SD (%)
	I	II	III	I	II	III			
1,5	0,226	0,220	0,230	0,21	0,21	0,22	0,21	0,01	4,76
2,0	0,258	0,253	0,256	0,24	0,24	0,24	0,24	0	0
2,5	0,293	0,315	0,292	0,28	0,30	0,28	0,29	0,01	3,45
3,0	0,281	0,277	0,274	0,26	0,26	0,26	0,26	0	0
3,5	0,269	0,267	0,260	0,25	0,25	0,24	0,25	0,01	4,00

### I.5.2 Penentuan aktivitas urease variasi konsentrasi urease

**Tabel I.10:** Aktivitas urease variasi konsentrasi urease

[urease] (mg/mL)	Absorbansi			Aktivitas urease ( $\mu\text{mol.gr}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ )			Rata- rata	SD	SD (%)
	I	II	III	I	II	III			
0,840	0,400	0,396	0,399	0,38	0,37	0,38	0,38	0,01	2,63
1,680	0,418	0,412	0,415	0,39	0,39	0,39	0,39	0	0
2,520	0,602	0,604	0,610	0,57	0,57	0,58	0,57	0,01	1,75
3,360	0,483	0,485	0,490	0,46	0,46	0,46	0,46	0	0
4,200	0,433	0,438	0,432	0,41	0,41	0,41	0,41	0	0

## I.6 Penentuan Aktivitas Efisiensi Penggunaan Ulang Urease Amobil

**Tabel I.11:** Aktivitas urease amobil penggunaan ulang (efisiensi)

Pen gu naa n Ke-	Absorbansi			Aktivitas urease ( $\mu\text{mol.gr}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ )			Rata- rata	SD	SD (%)
	I	II	III	I	II	III			
I	0,529	0,524	0,540	0,50	0,49	0,51	0,50	0,01	2,00
II	0,479	0,415	0,500	0,45	0,39	0,47	0,44	0,04	9,09
III	0,339	0,335	0,338	0,32	0,32	0,32	0,32	0	0
IV	0,218	0,216	0,221	0,21	0,20	0,21	0,21	0,01	4,76
V	0,108	0,103	0,111	0,10	0,10	0,10	0,10	0	0

**Tabel I.12:** Persen (%) efisiensi

Penggunaan Ke-	Aktivitas Rata- rata (unit)	% Efisiensi
I	0,50	100
II	0,44	88,00
III	0,32	72,73
IV	0,21	65,62
V	0,10	47,62

## Lampiran J. Analisa Statistika

### J.1 Analisa Data Urease yang Terjebak Pada Variasi Konsentrasi Kitosan

Untuk mengetahui pengaruh jumlah urease terjebak pada variasi konsentrasi kitosan maka dilakukan analisis menggunakan pola RAL sebagai berikut:

**Tabel J.1:** Jumlah urease yang terjebak pada variasi konsentrasi kitosan

[kitosan] %(w/v)	Jumlah enzim yang terjebak dalam 0,5 gr kitosan- natrium tripolifosfat			Rata- Rata	Total
	I	II	III		
1,5	0,420	0,420	0,420	0,420	1,260
2,0	0,420	0,525	0,525	0,490	1,470
2,5	1,980	2,040	2,040	2,020	6,060
3,0	1,800	1,950	1,950	1,900	5,700
3,5	1,950	1,500	1,500	1,650	4,950
<b>Total</b>					19,440

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh tiap-tiap perlakuan, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{377,9136}{5 \times 3} = 25,1942$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

$$\begin{aligned} JKT &= \left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK \\ &= 0,420^2 + 0,420^2 + 0,420^2 + \dots + 1,500^2 - FK \\ &= 32,6480 - 25,1942 \\ &= 7,4538 \end{aligned}$$



b. JK Perlakuan (JKP)

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK \\ &= \frac{1,260^2 + 1,470^2 + \dots + 4,950^2}{3} - 25,1942 \\ &= 32,4882 - 25,1942 \\ &= 7,2940 \end{aligned}$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$\text{JKG} = \text{JKT} - \text{JKP} = 7,4538 - 7,2940 = 0,1598$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{a. KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{7,2940}{4} = 1,8235$$

$$\text{b. KT Galat percobaan} = \frac{\text{JKG}}{\text{dB percobaan}} = \frac{0,1598}{10} = 0,01598$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}} = \frac{1,8235}{0,01598} = 114,1114$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,48$$

Karena  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi konsentrasi kitosan berpengaruh terhadap jumlah urease yang terjebak pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat. Untuk mengetahui variasi konsentrasi kitosan mana saja yang berpengaruh terhadap jumlah urease terjebak, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .

$$\begin{aligned} \text{BNT}_{5\%} &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2\text{KTG}/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 0,01598/3)^{0,5} \\ &= 2,2282 \times 0,1032 \\ &= 0,2300 \end{aligned}$$

FK	25,1942
JK total	7,4538
JK perlakuan	7,2940
JK galat	0,1598
dB perlakuan	4
KT perlakuan	1,8235
dB galat	10
KT galat	0,01598
F hitung	114,1114

**Tabel J.2:** Data analisa varian satu arah

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	7,2940	1,8235	114,1114	3,48
Galat percobaan	10	0,1598	0,01598		
Total	14	7,4538			

**Tabel J.3:** Data uji BNT urease yang terjebak pada variasi konsentrasi kitosan

[kitosan] (%)	[kitosan] (%)	1,5	2,0	2,5	3,5	3,0	Notasi
	Rataan	0,420	0,525	1,650	1,900	2,020	
1,5	0,420	0					A
2,0	0,525	0,105	0				B
2,5	1,650	1,230	1,125	0			C
3,5	1,900	1,480	1,375	0,250	0		D
3,0	2,020	1,600	1,495	0,370	0,120	0	E

Notasi: A, B, C, D, E = beda nyata

## J.2 Analisa Data Aktivitas Urease Variasi Konsentrasi Kitosan

Untuk mengetahui pengaruh aktivitas pada variasi konsentrasi kitosan maka dilakukan analisis menggunakan pola RAL sebagai berikut:

**Tabel J.4 :** Aktivitas urease pada variasi konsentrasi kitosan

[kitosan] (%)	Aktivitas enzim ( $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ )			Rata-Rata	Total
	I	II	III		
1,5	0,21	0,21	0,22	0,21	0,64
2,0	0,24	0,24	0,24	0,24	0,72
2,5	0,28	0,30	0,28	0,29	0,86
3,0	0,26	0,26	0,26	0,26	0,78
3,5	0,25	0,25	0,24	0,25	0,74
<b>Total</b>					3,74

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh tiap-tiap perlakuan, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n.p} = \frac{13,9876}{5 \times 3} = 0,9325$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

$$\begin{aligned} JKT &= \left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK \\ &= 0,21^2 + 0,21^2 + \dots + 0,24^2 - 0,9325 \\ &= 0,9416 - 0,9325 \\ &= 0,0091 \end{aligned}$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \left[ \frac{\sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2}{n_i} \right] - FK \\ &= \frac{0,64^2 + 0,72^2 + \dots + 0,74^2}{3} - 0,9325 \\ &= 0,9412 - 0,9325 \\ &= 0,0087 \end{aligned}$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$\text{JKG} = \text{JKT} - \text{JKP} = 0,0091 - 0,0087 = 0,0004$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{a. KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{0,0087}{4} = 0,0022$$

$$\text{b. KT Galat percobaan} = \frac{\text{JKG}}{\text{dB percobaan}} = \frac{0,0004}{10} = 0,00004$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}} = \frac{0,0022}{0,00004} = 55$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,48$$

Karena  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi konsentrasi kitosan berpengaruh terhadap aktivitas urease pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat. Untuk mengetahui variasi konsentrasi kitosan mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas urease, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2\text{KTG}/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 0,00004/3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 0,00516 \\ &= 0,0115 \end{aligned}$$

FK	0,9325
JK total	0,0091
JK perlakuan	0,0087
JK galat	0,0004
dB perlakuan	4
KT perlakuan	0,0022
dB galat	10
KT galat	0,00004
F hitung	55

**Tabel J.5:** Data analisa varian satu arah

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	0,0087	0,0022	55	3,48
Galat percobaan	10	0,0004	0,00004		
Total	14	0,0091			

**Tabel J.6:** Data uji BNT aktivitas urease variasi konsentrasi kitosan

[kitosan] (%)	[kitosan] (%)	1,5	2,0	3,5	2,5	3,0	Notasi
	Rataan	0,21	0,24	0,25	0,26	0,29	
1,5	0,21	0					A
2,0	0,24	0,03	0				B
3,5	0,25	0,04	0,01	0			C
2,5	0,26	0,05	0,02	0,01	0		D
3,0	0,29	0,08	0,06	0,04	0,03	0	E

Notasi: A, B, C, D, E = beda nyata



### J.3 Analisa Data Urease yang Terjebak Pada Variasi Konsentrasi Urease

Untuk mengetahui pengaruh jumlah urease terjebak pada variasi konsentrasi urease maka dilakukan analisis menggunakan pola RAL sebagai berikut:

**Tabel J.7:** Jumlah urease yang terjebak pada variasi konsentrasi urease

[urease] (mg/mL)	Jumlah enzim yang terjebak dalam 0,5 gr kitosan-natrium tripolifosfat			Rata-Rata	Total
	I	II	III		
0,840	0,840	0,840	0,840	0,840	2,520
1,680	1,125	1,680	1,680	1,495	4,485
2,520	2,520	2,520	1,980	2,340	7,020
3,360	1,830	2,340	2,340	2,170	6,510
4,200	1,800	2,400	1,800	2,000	6,000
<b>Total</b>					26,535

FK	46,9404
JK total	5,2481
JK perlakuan	4,4350
JK galat	0,8131
dB perlakuan	4
KT perlakuan	1,1088
dB galat	10
KT galat	0,0813
F hitung	13,6384
F <sub>tabel 5%</sub>	3,48
BNT <sub>5%</sub>	0,5187

Karena  $F_{hitung} > F_{tabel}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi konsentrasi urease berpengaruh terhadap jumlah urease yang terjebak pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat. Untuk mengetahui variasi konsentrasi urease mana saja yang berpengaruh terhadap jumlah urease terjebak, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .

**Tabel J.8:** Data analisa varian satu arah

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	4,4350	1,1088	13,6384	3,48
Galat percobaan	10	0,8131	0,0813		
Total	14	5,2481			

**Tabel J.9:** Data uji BNT urease yang terjebak pada variasi konsentrasi urease

[urease] (mg/mL)	[urease] (mg/mL)	0,840	1,680	2,520	3,360	4,200	Notasi
	Rataan	0,840	1,495	2,000	2,170	2,340	
0,840	0,840	0					A
1,680	1,495	0,655	0				B
2,520	2,000	1,500	0,505	0			C
3,360	2,170	1,330	0,675	0,170	0		D
4,200	2,340	1,500	0,845	0,340	0,170	0	D

Notasi: A, B, C = beda nyata

D = tidak beda nyata

#### J.4 Analisa Data Aktivitas Urease Variasi Konsentrasi Urease

Untuk mengetahui pengaruh aktivitas pada variasi konsentrasi urease maka dilakukan analisis menggunakan pola RAL sebagai berikut:

**Tabel J.10 :** Aktivitas urease pada variasi konsentrasi urease

[urease] (mg/mL)	Aktivitas enzim ( $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ )			Rata- Rata	Total
	I	II	III		
0,840	0,38	0,37	0,38	0,38	1,13
1,680	0,39	0,39	0,39	0,39	1,17
2,520	0,57	0,57	0,58	0,57	1,72
3,360	0,46	0,46	0,46	0,46	1,38
4,200	0,41	0,41	0,41	0,41	1,23
<b>Total</b>					6,63

FK	2,9305
JK total	0,0768
JK perlakuan	0,0767
JK galat	0,0001
dB perlakuan	4
KT perlakuan	0,0192
dB galat	10
KT galat	0,00001
F hitung	1920
F <sub>tabel 5 %</sub>	3,48
BNT <sub>5 %</sub>	0,0058

**Tabel J.11:** Data analisa varian satu arah

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	0,0767	0,0192	1920	3,48
Galat percobaan	10	0,0001	0,00001		
Total	14	0,0768			

Karena  $F_{hitung} > F_{tabel}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi konsentrasi urease berpengaruh terhadap aktivitas urease pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat. Untuk mengetahui variasi konsentrasi urease mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas urease, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .

**Tabel J.12:** Data uji BNT aktivitas urease variasi konsentrasi urease

[urease] (mg/mL)	[urease] (mg/mL)	0,840	1,680	2,520	3,360	4,200	Notasi
	Rataan	0,38	0,39	0,41	0,46	0,57	
0,840	0,38	0					A
1,680	0,39	0,01	0				B
2,520	0,41	0,03	0,02	0			C
3,360	0,46	0,08	0,07	0,05	0		D
4,200	0,57	0,19	0,18	0,16	0,11	0	E

Notasi: A, B, C, D, E = beda nyata

### J.5 Analisa Data Efisiensi Penggunaan Ulang Urease Amobil

Untuk mengetahui pengaruh aktivitas pada efisiensi urease amobil maka dilakukan analisis menggunakan pola RAL sebagai berikut:

**Tabel J.13 :** Aktivitas urease amobil penggunaan ulang (efisiensi)

Penggunaan Ke-	Aktivitas enzim ( $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ )			Rata-Rata	Total
	I	II	III		
1	0,50	0,49	0,51	0,50	1,50
2	0,45	0,39	0,47	0,44	1,31
3	0,32	0,32	0,32	0,32	0,96
4	0,21	0,20	0,21	0,21	0,62
5	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30
<b>Total</b>					4,69

FK	1,4664
JK total	0,3247
JK perlakuan	0,3210
JK galat	0,0037
dB perlakuan	4
KT perlakuan	0,0802
dB galat	10
KT galat	0,00037
F hitung	216,7568
F <sub>tabel 5 %</sub>	3,48
BNT <sub>5 %</sub>	0,0350

**Tabel J.14:** Data analisa varian satu arah

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	0,3216	0,0804	223,33	3,48
Galat percobaan	10	0,0036	0,00036		
Total	14	0,3252			

Karena  $F_{hitung} > F_{tabel}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya efisiensi urease amobil berpengaruh terhadap aktivitas urease pada matrik kitosan-natrium tripolifosfat. Untuk mengetahui efisiensi urease amobil mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas urease, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .



**Tabel J.15:** Data uji BNT aktivitas urease amobil penggunaan ulang (efisiensi)

Penggunaan Ke-	Penggunaan Ke-	1	2	3	4	5	Notasi
	Rataan	0,10	0,21	0,32	0,44	0,50	
1	0,10	0					A
2	0,21	0,11	0				B
3	0,32	0,22	0,11	0			C
4	0,44	0,34	0,23	0,12	0		D
5	0,50	0,40	0,29	0,18	0,06	0	E

Notasi: A, B, C, D, E = beda nyata



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

