

**Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus subtilis*  
Menggunakan Matriks Pasir Laut yang Diaktivasi NaOH**

**SKRIPSI**

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

oleh:

**FADILLAH MUFIDA**

**0910920009-92**



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

## LEMBAR PENGESAHAN

### Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus subtilis* Menggunakan Matriks Pasir Laut yang Diaktivasi NaOH

oleh:

**FADILLAH MUFIDA**  
**0910920009-92**

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

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana, M.App, Sc  
NIP. 19580711 199203 2 002

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS  
NIP. 19630404 198701 1 001

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS  
NIP. 19630404 198701 1 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Fadillah Mufida

NIM : 0910920009-92

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus subtilis* Menggunakan Matriks Pasir Laut yang Diaktivasi NaOH

Dengan ini menyatakan bahwa :

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Januari 2013

Yang menyatakan,

( Fadillah Mufida)

NIM. 0910920009-92

# Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus subtilis* Menggunakan Matriks Pasir Laut yang Diaktivasi NaOH

## ABSTRAK

Pektinase hasil isolasi dari *Bacillus subtilis* mempunyai sifat termofilik. Pektinase perlu diamobilisasi agar dapat dipakai secara berulang. Amobilisasi dapat dilakukan dalam berbagai matriks seperti silika, alumina, bentonit dan lain-lainnya. Amobilisasi pektinase dilakukan dengan metode adsorpsi fisik dan digunakan matriks pasir laut yang diaktivasi NaOH 0,0720 M. Pada penelitian ini ditentukan lama pengocokan dan konsentrasi pektinase optimum serta efisiensi pemakaian enzim amobil. Lama pengocokan yang digunakan berkisar antara (1; 2; 3; 4; 5) jam dan konsentrasi enzim sebesar (0,943; 1,887; 2,830; 3,774; 4,717) mg/mL. Kadar protein diuji dengan reagen Biuret dan aktivitas enzim ditentukan dari banyaknya asam galakturonat yang dihasilkan dari hidrolisis pektin oleh pektinase per menit. Efisiensi pektinase amobil dilakukan sebanyak lima kali pengulangan. Kadar protein pektinase bebas diperoleh sebesar 4,717 mg/mL dengan aktivitas 109,8 unit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum pektinase amobil pada pasir dicapai pada lama pengocokan 3 jam dan konsentrasi pektinase 3,774 mg/mL dengan aktivitas 1007,7 unit dan jumlah enzim teradsorpsi pada pasir sebesar 111,6 mg/g pasir. Aktivitas pektinase amobil menurun seiring dengan pengulangan pemakaian enzim amobil dan dihasilkan aktivitas enzim amobil sebesar 68,37% setelah empat kali pemakaian.

Kata kunci: aktivitas, amobilisasi, *Bacillus subtilis*, pasir laut, pektinase.

# Pectinase Immobilization from *Bacillus subtilis* Using The Sea Sand Matrix Which is Activated by NaOH

## ABSTRACT

Pectinase is isolated from *Bacillus subtilis*, that is included in thermophilic enzyme. Pectinase immobilization is carried out to be repeatable usage of enzyme. Immobilization can be done on various matrices, such as silica, alumina, bentonite, etc. Pectinase was immobilized by physical adsorption method using a matrix of sea sand, which is activated by 0.0720 M NaOH solution. This research will be determined optimum shaking time, enzyme concentration and efficiency of immobilized pectinase. Shaking time used in the range from (1; 2, 3, 4, 5) hour and the concentration of enzyme (0.943; 1.887; 2.830; 3.774; 4.717) mg/mL. Protein content was determined by using Biuret reagent and enzyme activity was determined by calculating galactouronic acid that resulted from hydrolyzed pectin by pectinase per minute. Efficiency of immobilized enzyme performed five repetitions. Initial protein content of free enzyme was 4.717 mg/mL and the activity was 109.8 units. The results showed that the optimum conditions for pectinase immobilization obtained on a shaking time of 3 hours and concentration of pectinase 3.774 mg/mL with 1007.7 units of immobilized pectinase activity and the amount of enzyme adsorbed on the sand at 111.6 mg/g. Immobilized pectinase activity decreases proportional to the use of repetition and the immobilized enzyme can be used up to four times within the activity of 68.37%.

Keywords: activity, immobilized, *Bacillus subtilis*, sea sand, pectinase.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kehadirat Allah SWT, karena hanya dengan rahmatNya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **“Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus subtilis* Menggunakan Matriks Pasir Laut yang Diaktivasi NaOH”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Penulisan tugas akhir ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Oleh sebab itu, penulis memberikan penghargaan dan ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada:

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc, selaku dosen pembimbing I yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, dukungan, serta nasehat dalam penyelesaian tugas akhir ini.
2. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS, selaku dosen pembimbing II dan Ketua Jurusan Kimia yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan, serta nasehat dalam penyelesaian tugas akhir ini.
3. Drs. Budi Kamulyan selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan, kritik dan saran kepada penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
4. Prof. Dr. Ir. Chandrawati C, MS, selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan, serta nasehat selama masa studi penulis.
5. Ayah, Ibu, Kakak dan seluruh keluarga yang selalu mendoakan, memberikan dukungan, semangat dan kasih sayang kepada penulis dalam mengerjakan tugas akhir ini.
6. Semua pihak yang telah banyak membantu hingga terselesaikannya tugas akhir ini.

Penulis mengharapkan kritik dan saran demi penyempurnaan tugas akhir ini. Akhirnya, penulis berharap agar tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, Januari 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b>	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b>	ii
<b>HALAMAN 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 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Amobilisasi Enzim	4
2.2 Pektinase sebagai Katalis Degradasi Pektin	4
2.3 <i>Bacillus subtilis</i>	5
2.4 Isolasi dan Pemurnian Enzim	5
2.5 Aktivitas Enzim	6
2.6 Amobilisasi Enzim	6
2.7 Pasir Laut	10
2.8 Hipotesis	12
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	13
3.2.1 Bahan penelitian	13
3.2.2 Bahan kimia	13
3.2.3 Alat penelitian	13
3.3 Tahapan Penelitian	14
3.4 Cara Kerja	14
3.4.1 Pembuatan akuades steril	14

3.4.2 Pembuatan media padat agar miring	15
3.4.3 Pembuatan media cair	15
3.4.4 Peremajaan biakan <i>B.subtilis</i>	15
3.4.5 Pembuatan kurva pertumbuhan	15
3.4.6 Pembuatan inokulum	16
3.4.7 Produksi dan isolasi pektinase	16
3.4.8 Pemurnian ekstrak kasar pektinase	16
3.4.9 Pembuatan kurva standar gula pereduksi	17
3.4.10 Pembuatan kurva standar larutan kasein	17
3.4.11 Uji kadar protein awal	18
3.4.12 Penentuan aktivitas pektinase bebas	18
3.4.13 Amobilisasi enzim	19
3.4.13.1 Preparasi matriks pasir laut	19
3.4.13.2 Aktivasi pasir laut	19
3.4.13.3 Variasi lama pengocokan	19
3.4.13.4 Variasi Konsentrasi	20
3.4.14 Uji kadar protein sisa	20
3.4.15 Uji aktivitas pektinase amobil	20
3.4.16 Efisiensi pemakaian pektinase amobil	20
3.5 Analisa Data	21
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Penentuan Kondisi Optimum Amobilisasi Pektinase menggunakan Pasir	22
4.1.1 Penentuan lama pengocokan optimum	22
4.1.2 Penentuan konsentrasi pektinase optimum	24
4.2 Efisiensi pemakaian pektinase amobil	26
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan	28
5.2 Saran	28
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	29
<b>LAMPIRAN</b>	35

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1: Molekul pektin	5
Gambar 2.2: Reaksi antara DNS dan asam galakturonat	6
Gambar 2.3: Ilustrasi skematik metode ikatan matriks	7
Gambar 2.4: Ikatan silang antara enzim yang terikat matriks	8
Gambar 2.5: Metode penjeratan tipe kisi	9
Gambar 2.6: Metode penjeratan tipe makrokapsul	9
Gambar 4.1: Grafik hubungan antara lama pengocokan terhadap jumlah pektinase teradsorpsi	23
Gambar 4.2: Grafik hubungan antara lama pengocokan terhadap aktivitas pektinase amobil	23
Gambar 4.3: Grafik hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap jumlah pektinase teradsorpsi	25
Gambar 4.4: Grafik hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap aktivitas pektinase amobil	26
Gambar L.D.1: Kurva pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i>	43
Gambar L.E.1: Kurva standar kasein	44
Gambar L.E.2: Kurva standar gula pereduksi	45

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1: Komposisi kimia pasir laut	10
Tabel 4.1: Pengaruh pengulangan pemakaian pektinase Amobil terhadap aktivitas pektinase amobil	27
Tabel L.D.1: Absorbansi waktu inkubasi <i>B.subtilis</i>	43
Tabel L.E.1: Absorbansi larutan standar Kasein $\lambda$ 559 nm	44
Tabel L.E.2: Absorbansi larutan standar gula pereduksi $\lambda$ 540 nm	45
Tabel L.G.1: Kadar protein pektinase bebas	48
Tabel L.G.2: Aktivitas pektinase bebas	49
Tabel L.H.1: Volume larutan pektinase setelah amobilisasi pada variasi lama pengocokan	50
Tabel L.H.2: Jumlah pektinase setelah amobilisasi	51
Tabel L.H.3: Jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam Pasir	52
Tabel L.I.1: Volume larutan pektinase setelah amobilisasi pada variasi konsentrasi pektinase	54
Tabel L.I.2: Jumlah pektinase setelah amobilisasi	55
Tabel L.I.3: Jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir	55
Tabel L.I.4: Massa pasir setelah amobilisasi	56
Tabel L.I.5: Jumlah pektinase dalam pasir+enzim	57
Tabel L.I.6: Konsentrasi pektinase sisa	57
Tabel L.J.1: Aktivitas pektinase amobil pada variasi lama pengocokan	58
Tabel L.J.2: Aktivitas pektinase amobil pada variasi konsentrasi	59
Tabel L.K: Efisiensi pemakaian pektinase amobil	60
Tabel L.L.1: Analisis pengaruh lama pengocokan terhadap pektinase teradsorpsi pada pasir	61
Tabel L.L.B: Data analisa varian satu arah	63
Tabel L.L.C: Data uji BNT 5 % terhadap variasi lama pengocokan	63
Tabel L.L.D: Analisis pengaruh konsentrasi larutan pektinase terhadap pektinase teradsorpsi pada pasir	64

Tabel L.L.E:	Data analisa varian satu arah	66
Tabel L.L.F:	Data uji BNT 5 % terhadap variasi konsentrasi pektinase	66
Tabel L.L.G:	Analisis pengaruh lama pengocokan terhadap aktivitas pektinase amobil	67
Tabel L.L.H:	Data analisa varian satu arah	69
Tabel L.L.I:	Data uji BNT 5 % terhadap variasi lama pengocokan	69
Tabel L.L.J:	Analisis pengaruh konsentrasi pektinase terhadap aktivitas pektinase amobil	70
Tabel L.L.K:	Data analisa varian satu arah	72
Tabel L.L.L:	Data uji BNT 5 % terhadap variasi konsentrasi pektinase	72
Tabel L.L.13:	Analisis pengaruh pengulangan pemakaian enzim amobil terhadap aktivitas	73
Tabel L.L.14:	Data analisa varian satu arah	75
Tabel L.L.15:	Data uji BNT 5 % terhadap pengulangan pemakaian enzim amobil	75

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Alur Penelitian	35
Lampiran B. Preparasi Larutan	36
L.B.1 Larutan Asam Sitrat 0,1 M	36
L.B.2 Larutan Dinatrium Hidrogen Fosfat 0,2 M	36
L.B.3 Larutan Buffer Sitrat Fosfat pH 7 0,2 M	36
L.B.4 Larutan Buffer Sitrat Fosfat pH 7 0,07 M	36
L.B.5 Larutan Stok Glukosa	36
L.B.6 Larutan Standar Gula Pereduksi	36
L.B.7 Larutan NaOH 1%	37
L.B.8 Reagen DNS	37
L.B.9 Larutan Stok Kasein 10000 ppm	37
L.B.10 Larutan Standar Kasein	37
L.B.11 Larutan NaOH 10%	37
L.B.12 Pereaksi Biuret	37
L.B.13 Larutan HCl 0,1 M	38
L.B.14 Larutan BaCl <sub>2</sub> 0,1 M	38
L.B.15 Larutan NaOH 0,1 M	38
L.B.16 Larutan NaOH 0,0720 M	38
Lampiran C. Perhitungan Preparasi Larutan	39
L.C.1 Larutan asam sitrat (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ) 0,1 M	39
L.C.2 Pembuatan larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M	39
L.C.3 Larutan buffer sitrat fosfat pH 7 0,2 M	39
L.C.4 Larutan buffer sitrat fosfat pH 7 0,07 M	40
L.C.5 Pembuatan larutan NaOH 0,1 M	40
L.C.6 Pembuatan larutan BaCl <sub>2</sub> 0,1 M	41
L.C.7 Pembuatan larutan NaOH 0,0720 M	41
L.C.8 Pembuatan larutan HCl 0,1 M	41
Lampiran D. Kurva Pertumbuhan <i>B.subtilis</i>	43
Lampiran E. Pembuatan Kurva Standar	44
Lampiran F. Pemurnian Pektinase	46
L.F.1 Pemurnian ekstrak kasar pektinase dengan ammonium sulfat	

	fraksi 20-60%	46
	L.F.2 Massa amonium sulfat (gram) yang ditambahkan dalam setiap liter larutan	47
Lampiran G.	Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Pektinase Bebas	48
	L.G.1 Perhitungan kadar protein pektinase bebas	48
	L.G.2 Perhitungan aktivitas pektinase bebas	49
Lampiran H.	Penentuan Jumlah Pektinase pada Variasi Lama Pengocokan	50
	L.H.1 Jumlah pektinase sebelum amobilisasi	50
	L.H.2 Jumlah pektinase setelah amobilisasi pada variasi lama pengocokan	50
	L.H.3 Penentuan jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir	51
Lampiran I.	Penentuan Jumlah Pektinase pada Variasi Konsentrasi Pektinase	53
	L.I.1 Jumlah pektinase sebelum amobilisasi	53
	L.I.2 Jumlah pektinase setelah amobilisasi pada variasi konsentrasi pektinase	54
	L.I.3 Penentuan jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir	55
	L.I.4 Penentuan konsentrasi pektinase sisa	57
Lampiran J.	Penentuan Aktivitas Pektinase Amobil	58
	L.J.1 Aktivitas pektinase amobil pada variasi lama pengocokan	58
	L.J.2 Aktivitas pektinase amobil pada variasi konsentrasi	58
Lampiran K.	Efisiensi Pemakaian Pektinase Amobil	60
Lampiran L.	Analisa Statistik	
	L.L.1 Jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir	61
	L.L.1.1 Pada variasi lama pengocokan	61
	L.L.1.2 Pada variasi konsentrasi pektinase	64
	L.L.2 Aktivitas pektinase amobil	67
	L.L.B.1 Pada variasi lama pengocokan	67

L.L.B.2 Pada variasi konsentrasi pektinase	70
L.L.3 Efisiensi pemakaian enzim amobil	73

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan senyawa protein yang berfungsi sebagai katalis biologis yang dapat mengendalikan berbagai reaksi biokimia yang terdapat di dalam jaringan makhluk hidup. Enzim dapat berasal secara alami di dalam bahan pangan, atau dapat pula berasal dari mikroba yang mencemari bahan pangan yang bersangkutan [1]. Enzim adalah biomolekul berupa protein. Fungsi suatu enzim adalah sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi di dalam sel maupun diluar sel [2].

Pektinase adalah enzim yang digunakan dalam proses degradasi molekul pektin [3]. Pektinase secara komersial dihasilkan dari *Aspergillus niger* [4]. Pektinase juga dapat diisolasi dari beberapa bakteri, salah satunya adalah bakteri *Bacillus Subtilis* [5]. Pektinase berperan dalam pembuatan *wine* untuk menghidrolisis pektin tak larut (protopektin) yang terdapat pada bubur kulit buah anggur. Enzim ini bekerja pada proses *maceration* (penghancuran buah) dan *clarification* (penjernihan) [6].

Sifat pektinase bebas adalah tidak stabil dan sulit untuk dipakai secara berulang. Sedangkan sifat pektinase yang teramobil adalah meningkatnya stabilitas pektinase serta enzim dapat digunakan digunakan secara berulang dan berkesinambungan [7].

Amobilisasi enzim adalah suatu proses di mana pergerakan molekul enzim ditahan pada tempat tertentu dalam suatu ruang reaksi kimia yang dikatalisnya [8]. Pada amobilisasi enzim, suatu enzim dilekatkan pada suatu bahan yang inert dan tidak larut dalam air. Dengan sistem ini, enzim dapat lebih tahan terhadap perubahan kondisi seperti pH atau temperatur [9].

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk amobilisasi pektinase. Berdasarkan penelitian amobilisasi pektinase dengan menggunakan resin penukar ion, dihasilkan temperatur optimum 40°C dengan pH optimum 5,5 dan jumlah pektinase amobil 0.75 mL/g dan konsentrasi glutaraldehid 0.1% [10]. Penelitian amobilisasi pektinase dari *Aspergillus niger* dengan menggunakan matriks kalsium alginat dihasilkan aktivitas sebesar 14,81% setelah tiga kali pemakaian [11].

Pasir laut memiliki lebih banyak kandungan unsur silika daripada unsur yang lain [12]. Kandungan unsur silika yang terdapat

dalam pasir dapat dilakukan proses adsorpsi yang dapat diaplikasikan untuk amobilisasi enzim atau protein [13]. Pasir perlu diaktivasi terlebih dahulu dengan NaOH untuk memperbesar pori-pori permukaan sebagai adsorben dan untuk menghilangkan pengotor yang terdapat pada pasir [14].

Amobilisasi enzim dipengaruhi oleh lama pengocokan dan konsentrasi enzim. Pada lama pengocokan dan konsentrasi enzim optimum, maka akan dihasilkan jumlah enzim yang teradsorpsi dan aktivitas enzim amobil yang maksimum [15]. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian amobilisasi pektinase dari *Bacillus subtilis* dengan matriks pasir laut yang diaktivasi NaOH dengan variasi lama pengocokan dan konsentrasi pektinase untuk mengetahui kondisi optimum dari pektinase amobil.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana kondisi optimum amobilisasi dengan pasir yang diaktivasi dengan basa, meliputi konsentrasi pektinase dan lama pengocokan?
2. Bagaimana pengaruh konsentrasi pektinase dan lama pengocokan terhadap jumlah pektinase yang teradsorpsi oleh pasir laut?
3. Bagaimana pengaruh massa pektinase teradsorpsi terhadap aktivitas pektinase amobil?
4. Bagaimana efisiensi pemakaian pektinase amobil?

## 1.3 Batasan Masalah

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

1. Pektinase diisolasi dari *Bacillus subtilis*.
2. Pektinase digunakan dalam industri minuman untuk membantu ekstraksi, menjernihkan dan memodifikasi jus.
3. Uji amobilisasi pektinase dilakukan dalam pH 7 dengan temperatur 35°C dan menggunakan matriks dari pasir laut yang telah diaktivasi dengan basa.
4. Pasir yang digunakan adalah pasir dari pantai Tanjung Aan, Lombok.

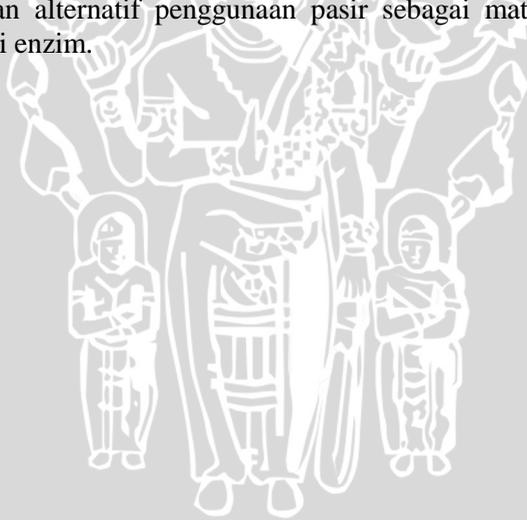
#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui kondisi optimum amobilisasi dengan pasir yang diaktivasi dengan basa, meliputi konsentrasi pektinase dan lama pengocokan.
2. Mengetahui pengaruh konsentrasi pektinase dan lama pengocokan terhadap jumlah pektinase yang teradsorpsi oleh pasir laut.
3. Mengetahui pengaruh massa pektinase teradsorpsi terhadap aktivitas pektinase amobil.
4. Mengetahui efisiensi pemakaian pektinase amobil.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai konsentrasi pektinase optimum dalam lama pengocokan optimum menggunakan matriks silika dari pasir laut yang diaktivasi NaOH dan hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan alternatif penggunaan pasir sebagai matriks pada amobilisasi enzim.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Enzim

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel yang berfungsi sebagai biokatalisator, yaitu dapat mempercepat suatu reaksi kimia atau biokimia tanpa mempengaruhi produk hasil reaksi [16]. Enzim bersifat spesifik terhadap substrat tertentu dan bekerja pada kisaran temperatur tertentu [17].

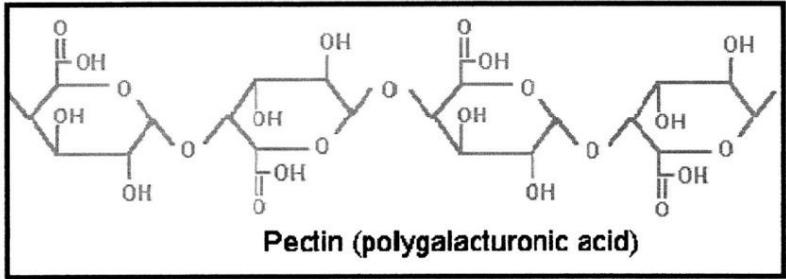
Enzim secara biokimia merupakan suatu kelompok protein yang berperan sangat penting dalam proses aktivitas biologis. Kerja enzim pada umumnya mempercepat reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasi [18].

Enzim mempunyai gugusan yang dapat terionisasi. Perubahan pH yang dilakukan dapat memberikan efek pada bagian katalitik dan konformasi enzim. Secara umum enzim hanya aktif pada selang pH yang terbatas dan sebagian besar dari keadaan itu ditemukan suatu pH optimum tertentu yang menyebabkan aktivitas enzim maksimal [19].

### 2.2. Pektinase sebagai Katalis Reaksi Degradasi Pektin

Salah satu jenis enzim adalah pektinase. Pektinase merupakan enzim yang dapat mengkatalisis proses degradasi senyawa pektin melalui reaksi de-polimerisasi dan de-esterifikasi [20]. Penggunaan pektinase secara umum terdapat dalam industri jus buah-buahan dan sayuran. Fungsi pektinase adalah untuk menjernihkan sari buah, menurunkan kekentalan, memudahkan penyaringan, mencegah presipitasi pektin selama penyimpanan serta meningkatkan efisiensi ekstraksi sari buah [21].

Pektin merupakan senyawa kompleks polisakarida yang terdiri dari asam D-Galakturonat yang dihubungkan dengan ikatan  $\alpha$ -(1,4)-Glukosida. Pektin banyak ditemukan dalam buah-buahan terutama jeruk, lemon, dan anggur. Pektin yang diperoleh dari kulit jeruk biasa disebut dengan citrus pektin [22].



**Gambar 2.1:** Molekul pektin

### 2.3. *Bacillus subtilis*

Terdapat beberapa jenis mikroorganisme yang mampu menghasilkan pektinase, seperti *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, dan *Botrytis cinerea* [23]. Pektinase juga dapat dihasilkan dari mikroorganisme *Bacillus subtilis* [24]. Penelitian ini menggunakan pektinase yang diisolasi dari bakteri *Bacillus subtilis*. Berikut ini adalah klasifikasi dari *Bacillus subtilis* [25]:

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Divisi	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Bacillales</i>
Famili	: <i>Bacillaceae</i>
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus subtilis</i>

*Bacillus subtilis* adalah bakteri yang umum ditemukan di tanah. *Bacillus subtilis* tidak tergolong bakteri patogen bagi manusia. Bakteri ini memiliki flagella yang massif sehingga dapat bergerak cepat untuk ukuran bakteri [26]. Enzim yang diisolasi dari *Bacillus subtilis* mempunyai temperatur optimum 35°C dan pH optimum 7. Dengan adanya pH dan temperatur optimum, maka dihasilkan produksi pektinase yang maksimal [27].

### 2.4. Isolasi dan Pemurnian Enzim

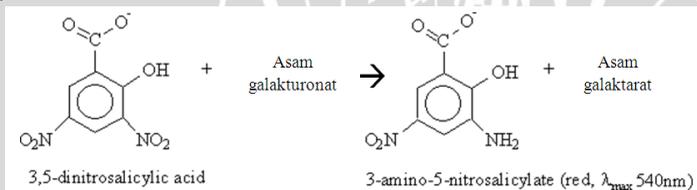
Proses isolasi enzim merupakan pelepasan enzim dari sel yang dapat dilakukan melalui mekanik, fisik, kimiawi dan enzimatis melalui penghancuran membran atau dinding sel. Setelah proses penghancuran sel dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan enzim dari sisa sel yang telah hancur agar didapatkan ekstrak kasar enzim

[28]. Keberhasilan isolasi enzim bergantung pada macam dan kondisi sumber enzim, proses produksi dan cara ekstraksinya [29].

Pemurnian enzim dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan enzim dari pengotor komponen lain [30]. Menurut Smith [31] proses pemurnian enzim dapat dilakukan dengan metode pengendapan, filtrasi membran, kromatografi serapan, afinitas dan filtrasi gel.

## 2.5 Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1  $\mu\text{g}$  substrat per menit pada keadaan pengukuran optimal. Aktivitas spesifik akan mencapai nilai maksimum dan konstan apabila enzim tersebut dalam keadaan murni. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH, temperatur dan waktu inkubasi [18]. Prinsip pengukuran aktivitas enzim menggunakan metode spektrofotometri UV-VIS dengan reagen DNS adalah gula pereduksi hasil hidrolisis enzim akan mereduksi asam dinitrosalisilat dan membentuk kompleks warna merah kecoklatan sebagai kompleks warna dari asam-3-amino-5-nitrosalisilat dalam suasana basa sedangkan glukosa akan teroksidasi menjadi asam galaktarat. Kompleks warna tersebut kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yaitu 540 nm [32].



**Gambar 2.2:** Reaksi antara DNS dan asam galakturonat

## 2.6 Amobilisasi Enzim

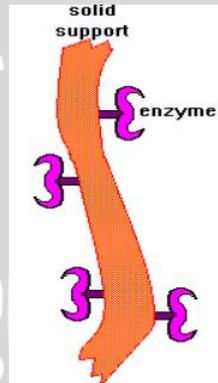
Amobilisasi enzim merupakan suatu proses di mana pergerakan molekul enzim ditahan pada tempat tertentu dalam suatu ruang reaksi kimia yang dikatalisnya [33]. Enzim teramobilisasi didefinisikan sebagai enzim yang dilokalisasi secara fisik dengan menahan aktivitas katalitiknya serta dapat digunakan berulang-ulang dan berkesinambungan [34].

Metode amobilisasi terbagi atas tiga kelompok yaitu metode pengikatan pada penyangga (*carrier binding*), metode pengikatan

silang (*crosslinking*) dan metode penjeratan (*entrapping*) [35]:

1. Metode Pengikatan pada Penyangga (*carrier binding*).

Pada metode *carrier binding*, enzim diikat pada matriks yang tidak larut dalam air. Luas permukaan diameter pori matriks merupakan muatan enzim.



**Gambar 2.3:** Ikatan enzim pada matriks

Terdapat tiga jenis metode pengikatan pada penyangga (*carrier binding*) yaitu:

a. Adsorpsi fisik

Pada metode adsorpsi fisik ini, enzim diadsorpsi pada permukaan matriks. Metode ini mudah untuk dilakukan, ekonomis, dapat diregenerasi dan pada kondisi lunak aktivitas enzim tetap tinggi. Akan tetapi, kelemahan dari metode ini adalah kekuatan ikatan lemah, pH atau kekuatan ikatan ion dapat berubah dan enzim dapat dirusak oleh enzim proteolitik.

b. Ikatan ionik

Pada metode ini, terjadi ikatan ionik antara enzim dengan matriks yang tidak dapat larut dalam air dan mengandung residu penukar ion sehingga terjadi interaksi antara gugus amina pada matriks yang bermuatan positif dengan gugus karboksil pada enzim yang bermuatan negatif.

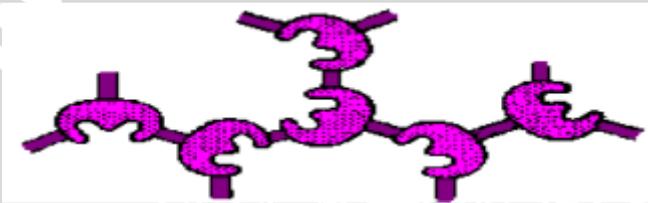
c. Ikatan kovalen

Pada metode ini, terbentuk ikatan kovalen antara enzim dengan matriks yang tidak larut dalam air. Ikatan yang terbentuk merupakan ikatan yang kuat tetapi jika konformasi berubah

maka akan menyebabkan hilangnya aktivitas enzim.

2. Metode Pengikatan Silang (*crosslinking*)

Metode pengikatan silang merupakan pembentukan ikatan melintang intermolekuler antara molekul enzim menggunakan pereaksi bifungsional atau multifungsional. Pereaksi yang dapat digunakan adalah glutaraldehid, diazobenzidine (atau turunannya), etil khloroformat dan N-N-hexamethylene bisiodoasetat. Pereaksi yang paling sering digunakan dalam metode ini adalah glutaraldehid. Pada metode *crosslinking* ini terjadi ikatan kimia, tetapi tidak digunakan matriks yang tidak larut dalam air.



**Gambar 2.4:** Ikatan silang antara enzim yang terikat pada matriks

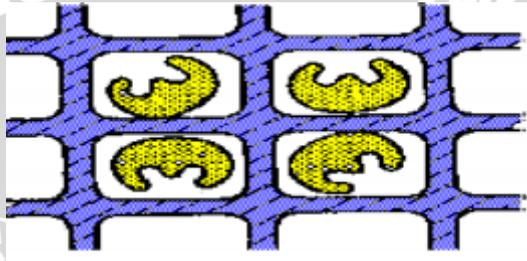
3. Metode Penjeratan (*entrapping*)

Metode penjeratan (*entrapping*) merupakan metode penjeratan enzim secara langsung ke dalam matriks polimer atau dibungkus dalam membran semipermeabel dengan erat sehingga enzim menjadi tidak bebas dan menjalankan fungsi katalitiknya di dalam kisi-kisi polimer tersebut. Pada metode ini, enzim diperangkap secara fisik bukan kimiawi sehingga penurunan aktivitas enzim lebih kecil dibandingkan pengikatan secara kimia. Sarana penempatan enzim dapat berbentuk gel, bentuk serabut kapiler atau suatu mikrokapsul. Metode penjeratan terbagi atas dua jenis, yaitu:

a. Kisi

Pada tipe kisi, enzim dicampur dengan larutan polimer pada konsentrasi tertentu. Campuran ditetaskan ke dalam larutan ion atau pelarut organik tergantung jenis polimernya. Tingkat porositas dan efektivitas metode amobilisasi tergantung pada konsentrasi polimer, ion logam penangkap

dan konsentrasi enzim sendiri. Amobilisasi enzim dengan polianion berupa Na-Alginat paling banyak disukai karena murah dan mudah dilakukan amobilisasi pada suhu kamar dengan menggunakan larutan  $\text{CaCl}_2$  sebagai ion penetral dan diperoleh pektinase amobil yang terperangkap dalam padatan Ca-Alginat. Komponen Ca penting dalam mempertahankan struktur padatan. Jika Ca terlarut oleh senyawa pengkelat atau digantikan oleh kation lain seperti  $\text{Mg}^{2+}$  atau  $\text{K}^+$ , struktur enzim amobil akan pecah atau rusak.



**Gambar 2.5:** Metode penjeratan tipe kisi

b. Mikrokapsul

Pada tipe mikrokapsul, enzim dibuat amobil dalam bentuk kapsul berukuran mikro yang dibuat dari polimer organik. Membran kapsul dibuat permeable terhadap substrat maupun produk terbatas pada enzim dengan substrat yang berukuran kecil. Polimer yang digunakan untuk membuat kapsul adalah nitroselulosa, polistiren dan polivinil asetat. Polimer dilarutkan di dalam pelarut organik kemudian diendapkan dengan pelarut lain yang tidak dapat bercampur dengan pelarut organik tersebut.



**Gambar 2.6:** Metode penjeratan tipe makrokapsul

Terdapat beberapa macam teknik amobilisasi yang dapat diaplikasikan. Masing- masing metode memiliki keunggulan dan kelemahan. Teknik amobilisasi enzim yang sering digunakan adalah metode adsorpsi fisik karena merupakan salah satu metode amobilisasi enzim yang sederhana dan efektif karena tidak menyebabkan perubahan konformasi enzim atau destruksi pada pusat aktif enzim [36]. Adsorpsi fisik disebabkan oleh adanya gaya *van der Waals*. Pada adsorpsi fisik, molekul-molekul teradsorpsi pada ikatan yang lemah dan umumnya terjadi pada temperatur yang rendah [37].

Hal penting yang harus diperhatikan dari proses amobilisasi enzim adalah sifat dari enzim bebas, jenis materi pendukung yang digunakan, dan metode aktivasi pendukung dan perekatan enzim [34]. Keuntungan enzim yang diamobilisasi dibandingkan dengan enzim bebas adalah dapat digunakan kembali, sesuai untuk aplikasi dalam operasi yang berkesinambungan, menghasilkan produk yang bebas enzim sehingga tidak perlu dilakukan proses lebih lanjut seperti penghilangan atau penginaktifan enzim, dan meningkatkan stabilitas dari aktivitas enzim [38].

## 2.7 Pasir Laut

Pasir laut terdapat di alam sebagai campuran magnetit ( $Fe_2O_4$ ), ilmenit ( $FeO.TiO_2$ ), limonit, biotit, dan feldspar ( $KAlSi_3O_8$ ) serta zat-zat organik hasil pelapukan sisa-sisa hewan dan tumbuhan. Sebagian besar kandungan unsur pasir pantai Bancar, Tuban merupakan unsur silika dengan presentase 69,3% [12].

**Tabel 2.1:** Komposisi kimia pasir laut

Senyawa Kimia	Komposisi (%)
SiO <sub>2</sub>	70-75
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,31
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,01-18,00
TiO <sub>2</sub>	0,01-0,49
CaO	0,01-0,26
MgO	0,01-0,26
K <sub>2</sub> O	0,01-17,00

Dari data tersebut dapat diketahui bahwa pasir laut memiliki kandungan silika >50%. Silika merupakan partikel adsorben alamiah, dimana zat ini akan menyerap air dengan batas tertentu. Kemampuan adsorpsi permukaan dan intra molekul silika gel telah terbukti secara luas, ukuran pori besar yang dimiliki silika digunakan sebagai

adsorben alami. Zat ini memiliki ruang pengunci (*interlocking cavities*) yang memberikan media dengan luas permukaan yang besar. Struktur inilah yang memberikan kemampuan silika sebagai media pengadsorb [39]. Adsorpsi adalah peristiwa penyerapan pada permukaan suatu adsorben misalnya adsorben zat padat terhadap gas atau zat cair [13].

Mineral silika merupakan mineral yang seluruhnya terdiri dari silika yang terdapat secara luas di alam. Partikel silika kasar banyak ditemukan pada pasir. Terdapat tiga kategori mineral silika yaitu kuarsa, tridimit dan kristobalit. Secara umum, kelarutan mineral silika berhubungan dengan kerapatan tumpukan tetrahedral silika. Kuarsa merupakan mineral silika yang paling sukar larut. Sedangkan silika amorf adalah bentuk yang paling mudah larut. Hal ini dapat dilihat berdasarkan deret kelarutan sebagai berikut [40]:

Kuarsa < kristobalit < opal < silika amorf

Kuarsa dapat larut dalam larutan NaOH 0,1 M pada suhu 400°C dan tekanan 1,7 kBar [41].

Pengaktifan adsorben dapat dilakukan melalui proses fisika dan kimia [42]:

#### 1. Aktivasi Pemanasan

Pengaktifan dengan cara pemanasan pada adsorben atau menguapkan molekul-molekul air sehingga bersifat mudah menyerap. Proses pemanasan akan menyebabkan dehidrasi yang bertujuan untuk meningkatkan aktivitas adsorben sebagai penyerap.

#### 2. Aktivasi dengan penggunaan zat kimia

Aktivasi ini dapat dilakukan dengan penambahan larutan asam maupun basa.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{FeO}\cdot\text{TiO}_2$  merupakan oksida logam yang larut dalam asam. Sedangkan  $\text{Al}_2\text{O}_3$  sebagai salah satu komponen penyusun pasir laut termasuk oksida amfoter yang larut dalam asam maupun basa [43]. Aktivasi secara kimia dilakukan dengan larutan basa NaOH dengan tujuan untuk membersihkan permukaan pori, membuang senyawa pengotor dan mengatur kembali letak atom yang dipertukarkan [44].

Pada penelitian ini, digunakan media amobilisasi pektinase dengan matriks pasir laut dari Pantai Tanjung Aan yang diaktivasi terlebih dahulu dengan NaOH.

## 2.8 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah:

1. Kondisi optimum amobilisasi pektinase dapat diperoleh pada kisaran lama pengocokan 1-5 jam dengan konsentrasi pektinase bebas yang sebanding dengan volume pektinase 1-5 mL.
2. Semakin besar konsentrasi pektinase dan lama pengocokan maka akan meningkatkan jumlah pektinase yang teradsorpsi oleh pasir laut yang diaktivasi dengan NaOH.
3. Semakin besar massa pektinase yang teradsorpsi maka akan meningkatkan aktivitas pektinase amobil.
4. Pektinase amobil dapat digunakan sebanyak tiga kali pemakaian.



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang pada bulan September-November 2012.

### 3.2. Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.2.1. Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni bakteri *Bacillus subtilis* yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang dan pasir laut sebagai matriks amobilisasi enzim yang diperoleh dari Pantai Tanjung Aan, Lombok.

#### 3.2.2. Bahan kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan mempunyai kualitas *for microbiology* antara lain, pektin (Merck), *bacto* agar (Merck), pepton (Oxoid), *yeast extract* (Difco), kasein (Merck) dan mempunyai derajat kemurnian pro analisis yang didapat dari produsen Merck antara lain,  $\text{CaCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , kristalin fenol, sodium sulfit, asam dinitrosalisilat (DNS),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$ , glukosa anhidrat, padatan  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , padatan NaOH, asam sitrat, HCl (37% w/w; bj 1,19 g/mL) dan akuades.

#### 3.2.3. Alat penelitian

Alat penelitian yang digunakan antara lain seperangkat alat gelas, inkubator (Heracus tipe B 50 Memmert), *autoclave* (Tipe LS-C35L), jarum ose, mortar, cawan porselen, sentrifuse dingin (Denley), *shaker* (Edmund Buhler SM 25), *magnetic stirrer*, pH meter (Inolab WTW), oven (Memmert), neraca analitik (Mettler Todelo AL 204), lemari pendingin, *spectronic* 20 (Bausch dan Lomb), kuvet, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1601 *double beam*), kantong selofan, ayakan 120 dan 150 mesh, kertas *Whatman* no. 40, aluminium foil, kapas steril, pH universal, tanur (Nabertherm), corong vakum buchner dan penangas listrik (Janke-Kunkel).

### 3.3. Tahapan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu pemurnian enzim menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-60% dan amobilisasi pektinase yang dilakukan dengan variasi pada waktu lama pengocokan (1,2,3,4,5) jam dan variasi konsentrasi pektinase (1,2,3,4,5) mL yang diencerkan dengan buffer sitrat fosfat pH 7 hingga volume 5 mL. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Pembuatan media padat
2. Pembuatan media cair
3. Peremajaan biakan *Bacillus subtilis*
4. Pembuatan kurva pertumbuhan
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi dan isolasi ekstrak kasar pektinase
7. Pemurnian ekstrak kasar pektinase
8. Pembuatan kurva standar gula pereduksi
9. Pembuatan kurva standar larutan kasein
10. Uji kadar protein awal
11. Penentuan aktivitas pektinase hasil pemurnian
12. Preparasi matriks pasir laut
13. Aktivasi pasir laut
14. Amobilisasi enzim meliputi :
  - Penentuan lama pengocokan optimum untuk adsorpsi pektinase amobil
  - Penentuan konsentrasi pektinase optimum untuk amobilisasi enzim
15. Penentuan kadar protein sisa
16. Penentuan aktivitas pektinase amobil
17. Efisiensi pemakaian pektinase amobil
18. Analisa Data

### 3.4. Cara Kerja

#### 3.4.1 Pembuatan akuades steril

Akuades steril dapat dipersiapkan dengan memasukkan akuades kedalam autoklaf. Akuades dipersiapkan sebanyak 250 mL yang selanjutnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas lalu disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121°C, 15 psi selama 15 menit.

### 3.4.2. Pembuatan media padat agar miring

Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah media padat agar miring untuk peremajaan kultur murni *Bacillus subtilis* yang terdiri dari 0,25 gram pepton, 0,02 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,03 gram  $\text{CaCl}_2$ , 0,14 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dan 0,03 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 gram *yeast extract* dan 0,5 gram pektin, kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia, setelah itu diatur pada pH 7 dengan ditambahkan larutan buffer sitrat pH 7 sebanyak 5 mL dan ditambahkan 1,5 gram *bacto* agar. Larutan dibuat sebanyak 100 mL. Campuran diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Lalu dipipet 4 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditutup kapas dan disterilkan dalam autoklaf pada temperatur  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 15 psi, selama 20 menit. Tabung kemudian diangkat dari autoklaf dan diletakkan pada posisi miring.

### 3.4.3. Pembuatan media cair

Media pertumbuhan *Bacillus subtilis* untuk menghasilkan pektinase dibuat dengan menimbang 1,25 gram pepton, 0,1 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,15 gram  $\text{CaCl}_2$ , 0,7 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dan 0,15 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 gram *yeast extract* dan 2,5 gram pektin, kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia, setelah itu diatur pada pH 7 dengan ditambahkan larutan buffer sitrat pH 7 sebanyak 25 mL. Larutan dibuat sebanyak 500 mL. Campuran diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Lalu dipipet 100 mL ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian ditutup kapas dan disterilkan dalam autoklaf pada temperatur  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 15 psi, selama 20 menit.

### 3.4.4. Peremajaan biakan *Bacillus subtilis*

Biakan murni *B. subtilis* diremajakan dalam media padat agar miring dengan cara menggoreskan jarum ose yang mengandung *B. subtilis* dengan mendekatkan mulut tabung pada nyala api saat menggoreskan jarum. Tabung ditutup kembali dengan kapas steril dan diinkubasi pada temperatur  $30^\circ\text{C}$  selama 48 jam yang akan dihasilkan subkultur biakan murni.

### 3.4.5. Pembuatan kurva pertumbuhan

Satu tabung subkultur bakteri hasil peremajaan ditambah 5 mL akuades dan diose serta ditanam dalam 100 mL media pertumbuhan, kemudian diinkubasi pada inkubator dan dikocok dengan kecepatan

150 rpm pada temperatur kamar selama dua hari. Setiap selang waktu dua jam diambil 1 mL dengan pipet steril dan diencerkan sampai volume 10 mL, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pertumbuhan sel pada panjang gelombang 620 nm dengan menggunakan *spectronic* 20 dengan filter merah. Setelah itu didapat grafik hubungan waktu inkubasi dengan absorbansi dan diperoleh kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis*.

#### **3.4.6. Pembuatan inokulum**

Bakteri yang telah tumbuh dalam media padat miring yang berumur satu hari diambil sebanyak satu mata ose dan dimasukkan ke dalam 25 mL media cair. Selanjutnya diinkubasi di atas *shaker* pada temperatur kamar dengan kecepatan putar 125 rpm selama fasa logaritmik yang diperoleh dari kurva pertumbuhan yaitu selama 20 jam.

#### **3.4.7. Produksi dan isolasi pektinase**

Erlenmeyer 250 mL yang telah berisi 250 mL media cair steril ditambahkan 10 mL larutan inokulum secara aseptis dan diinkubasi pada temperatur kamar selama fasa awal stasioner yang didapat dari kurva pertumbuhan yaitu 24 jam menggunakan *shaker* dengan kecepatan 125 rpm [45]. Selanjutnya, ditambahkan buffer sitrat pH 7 sebanyak 12,5 mL. Kemudian media pertumbuhan ini disentrifugasi dingin dengan kecepatan putar 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang merupakan ekstrak kasar pektinase kemudian dipisahkan dari endapannya dan digunakan untuk pemurnian ekstrak kasar pektinase.

#### **3.4.8. Pemurnian ekstrak kasar pektinase**

Ekstrak kasar pektinase dimurnikan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-60%. Terlebih dahulu dibuat fraksi 0-20% yaitu sebanyak 8,55 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dicampurkan dalam 75 mL larutan ekstrak kasar pektinase lalu diaduk hingga  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  larut semua. Selanjutnya disentrifugasi pada 3000 rpm, temperatur 4°C selama 30 menit. Supernatan yang didapat ditambah dengan 19,65 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  lalu disentrifugasi menghasilkan endapan dan supernatan fraksi 20-60%. Endapan yang terbentuk pada tiap fraksi dilakukan dialisis yaitu dengan menambahkan 10 mL buffer sitrat fosfat pH 7 dan dimasukkan dalam kantong selofan. Kemudian

direndam dalam 100 mL buffer sitrat fosfat 0,07 M pH 7 dalam beaker gelas 250 mL sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik pada temperatur rendah selama tiga jam. Kemudian larutan buffer perendam diganti dengan buffer perendam yang baru sampai semua garam terpisah. Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai, diuji dengan cara 5 mL buffer perendam diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah 1 mL larutan HCl 0,1 M dan ditambah lima tetes larutan BaCl<sub>2</sub> 0,1 M. Apabila tidak ada endapan, dialisis dihentikan. Larutan enzim yang diperoleh untuk selanjutnya dilakukan uji kadar protein awal dan aktivitas enzim bebas.

### **3.4.9. Pembuatan kurva standar gula pereduksi**

Disiapkan lima buah tabung reaksi, masing-masing diisi dengan stok glukosa 5000 ppm sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 500, 1000, 1500, 2000, dan 2500 mg/L. Kemudian masing-masing tabung ditambah 1 mL buffer sitrat pH 7 0,2 M dan 2 mL akuades. Mulut tabung ditutup dengan aluminium foil, diinkubasi pada 35°C selama 50 menit dan ditambahkan 2 mL reagen DNS. Kemudian dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Selanjutnya dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Untuk blanko digunakan akuades dengan perlakuan sama. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm dan kurva standar dibuat dengan memplot data konsentrasi glukosa (ppm) pada sumbu x dan absorbansinya pada sumbu y.

### **3.4.10. Pembuatan kurva standar larutan kasein**

Ditimbang sebanyak satu gram kasein, dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia. Kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 M. Lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan stok kasein 10000 ppm. Dipipet masing-masing (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) mL lalu dimasukkan labu ukur 10 mL yang berbeda. Ditambahkan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan kasein (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000) ppm. Tiap konsentrasi larutan kasein diambil 2 mL, dimasukkan pada tabung reaksi berbeda lalu ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer sitrat fosfat pH 7 lalu

dikocok dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Sebelum mengukur absorbansi larutan standar, ditentukan terlebih dahulu panjang gelombang maksimumnya pada konsentrasi 5000 ppm. Larutan standar diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum kasein. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar pada berbagai konsentrasi dibuat persamaan regresi linear sehingga dihasilkan kurva standar kasein.

#### 3.4.11. Uji kadar protein awal

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Biuret. Sebanyak 2 mL larutan enzim ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur 50°C. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum kasein ( $\lambda_{\max} = 559$  nm) sehingga kadar protein awal diketahui. Kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein. Sebagai larutan blanko dipipet 2 mL akuades, ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm selanjutnya diperlakukan sama seperti di atas.

#### 3.4.12. Penentuan aktivitas pektinase bebas

Penentuan aktivitas pektinase dilakukan dengan cara mengukur jumlah senyawa tereduksi yang dibebaskan dari substrat pektin [46]. Campuran terdiri dari 1,0 mL substrat pektin 1%, 1,0 mL buffer sitrat fosfat pH 7, 1,0 mL pektinase murni dan 1,0 mL akuades. Campuran ini diinkubasi pada 35°C selama 50 menit dan ditambahkan 2,0 mL reagen DNS. Kemudian dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Selanjutnya dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm.

Satu unit aktivitas enzim bebas (U) diartikan sebagai 1  $\mu$ g asam galakturonat yang dihasilkan per menitnya tiap mL enzim.. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh pada konsentrasi glukosa standar, sehingga dapat diketahui berapa konsentrasi glukosa yang diperoleh dari hasil hidrolisis pektin yang dikatalis pektinase. Untuk melihat besarnya satu unit aktivitas enzim tersebut digunakan rumus :

$$AE = \frac{\text{konsentrasi glukosa} (\mu\text{g/mL}) \times V \times fp}{p \times q} \times \frac{BM \text{ galakturonat}}{BM \text{ glukosa}}$$

dimana :

AE	= Aktivitas enzim (unit)
V	= volume total sampel dalam percobaan pada tiap tabung (mL)
BM glukosa	= Berat Molekul Glukosa (180 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ )
BM galakturonat	= Berat Molekul Galakturonat (194,14 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ )
q	= Waktu reaksi (menit)
p	= Volum ekstrak kasar pektinase (mL)
fp	= Faktor pengenceran

### **3.4.13. Amobilisasi enzim**

#### **3.4.13.1 Preparasi matriks pasir laut**

Pasir laut ditumbuk dan diayak menggunakan ayakan berukuran 120 mesh, padatan yang lolos kemudian diayak dengan ayakan 150 mesh. Setelah itu, padatan yang tidak lolos dicuci dengan akuades dan dikeringkan pada temperatur 105°C.

#### **3.4.13.2 Aktivasi pasir laut**

Pasir laut hasil preparasi ditimbang 10 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya ditambahkan 100 mL NaOH 0,0720 M dan dikocok dengan *shaker* selama tiga jam dengan kecepatan 100 rpm. Kemudian dicuci dengan akuades sampai pH filtrat netral dan dikeringkan pada temperatur 105°C. Pasir laut yang telah diaktivasi dipanaskan dalam tanur dengan temperatur 500°C selama empat jam.

#### **3.4.13.3 Penentuan lama pengocokan optimum**

Enzim hasil pemurnian dipipet sebanyak 2 mL, kemudian buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7 ditambahkan ke dalamnya hingga volume 5 mL sehingga didapatkan konsentrasi enzim 1,887 mg/mL. Larutan enzim dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 0,1 g pasir yang telah diaktivasi. Campuran diinkubasi dalam *shaker* pada temperatur ruang dengan kecepatan 100 rpm selama (1, 2, 3, 4, dan 5) jam. Hasil preparasi disaring dengan kertas *Whatman* no. 40. Endapan pektinase amobil yang tersaring ditentukan aktivitasnya, sedangkan untuk filtrat diuji kadar protein sisanya.

#### **3.4.13.4 Penentuan konsentrasi pektinase optimum**

Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi lama pengocokan (langkah 3.4.13.3). Perbedaannya terletak pada jumlah enzim hasil pemurnian yang digunakan yaitu (1, 2, 3, 4 dan 5) mL sehingga konsentrasi enzim menjadi (0,943; 1,887; 2,830 ; 3,774 ; 4,717) mg/mL, dan selanjutnya campuran diinkubasi selama lama pengocokan optimum dalam shaker (tiga jam) dengan kecepatan 100 rpm. Hasil preparasi disaring dengan kertas *Whatman* no. 40. Endapan pektinase amobil yang tersaring ditentukan aktivitasnya, sedangkan untuk filtrat diuji kadar protein sisanya.

#### **3.4.14. Uji kadar protein sisa**

Kadar protein tidak terjebak ditentukan dengan cara 2 mL filtrat dari enzim yang tidak teramobil ditambah dengan 2 mL larutan kasein 5000 ppm dan 8 mL reagen biuret kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur 50°C. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum kasein 559 nm. Kadar protein pektinase diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein.

#### **3.4.15. Uji aktivitas pektinase amobil**

Campuran terdiri dari 1 mL substrat pektin 1%, 1 mL buffer pH 7, dan 0,1 gram pektinase amobil serta 2 mL akuades. Campuran ini diinkubasi pada 35°C selama 50 menit dan ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Selanjutnya dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Satu unit aktivitas pektinase amobil (U) diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per menitnya tiap gram pektinase amobil. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva standar gula pereduksi.

#### **3.4.16. Efisiensi pemakaian pektinase amobil**

Uji efisiensi dilakukan pada enzim hasil amobilisasi pada lama pengocokan (tiga jam) dan konsentrasi pektinase optimum (3,774 mg/mL). Pektinase amobil disaring dengan kertas *Whatman* no. 40, kemudian 0,1 g pektinase amobil dimasukkan ke dalam

larutan uji yang terdiri dari 1 mL pektin, 1 mL buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7, 2 mL akuades dan diinkubasi pada 35<sup>0</sup>C selama 50 menit. Hasil dari inkubasi disaring dan filtrat yang didapatkan ditambahkan 2 mL reagen DNS dan diinkubasi kembali pada 100<sup>0</sup>C selama 15 menit serta diukur absorbansinya sebagai aktivitas enzim. Endapan pektinase amobil yang didapatkan dimasukkan kembali dalam larutan uji. Perlakuan ini dilakukan hingga lima kali dan dianalisis aktivitas enzim pada setiap pengulangan.

### **3.5. Analisa data**

Hasil dari variasi lama pengocokan, variasi konsentrasi berdasarkan perlakuan 3.4.13.3 dan 3.4.13.4 dilakukan penentuan kadar protein sisa dan penentuan aktivitas berdasarkan perlakuan 3.4.14 dan 3.4.15. Sedangkan hasil dari efisiensi pemakaian pektinase amobil berdasarkan perlakuan 3.4.16 dilakukan penentuan aktivitas berdasarkan perlakuan 3.4.15. Data tentang penentuan kondisi optimum pektinase amobil dan efisiensi pemakaian pektinase amobil dianalisis dengan uji F menggunakan Pola Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan perlakuan diulang tiga kali (Lampiran H, I, J dan K). Bila F hitung lebih besar dari F tabel ( $\alpha$  db) maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 5%) (Lampiran L).

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

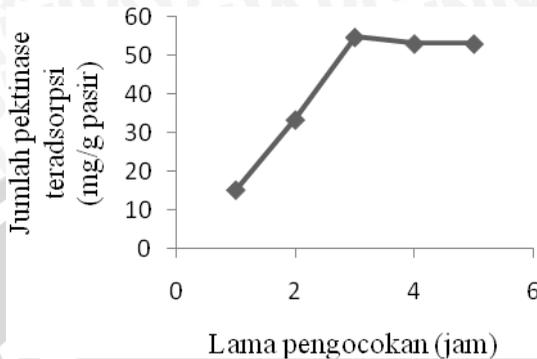
### 4.1. Penentuan kondisi optimum amobilisasi pektinase menggunakan pasir yang diaktivasi NaOH

Pektinase yang digunakan pada penelitian ini diisolasi dari *Bacillus subtilis* menggunakan metode pemurnian enzim pengendapan bertingkat melalui penambahan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-60% yang dilanjutkan dengan proses dialisis untuk memisahkan garam dan enzim. Pada penelitian ini kadar protein pektinase bebas yang digunakan adalah sebesar 4,717 mg/mL dengan aktivitas pektinase bebas sebesar 109,8 unit.

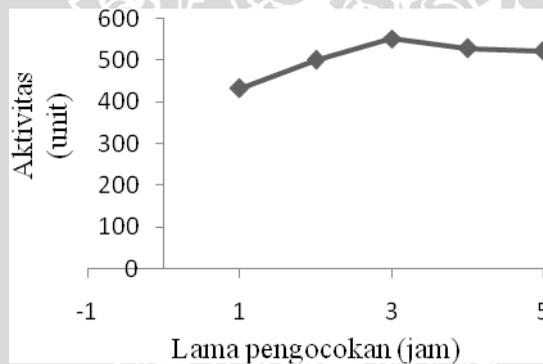
#### 4.1.1. Penentuan lama pengocokan optimum

Kondisi optimum amobilisasi pektinase ditentukan pada variasi lama pengocokan sehingga diketahui waktu yang dibutuhkan oleh enzim untuk berinteraksi dengan pasir dalam proses amobilisasi. Pasir yang diaktivasi dengan NaOH akan memiliki permukaan yang lebih luas dan daya adsorpsinya semakin besar karena kation-kation dalam struktur pasir tertukar oleh ion  $\text{Na}^+$ . Ukuran  $\text{Na}^+$  lebih kecil dari kation-kation logam pada pasir seperti  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  dan  $\text{Ca}^{2+}$  sehingga mobilitas dari ion  $\text{Na}^+$  lebih besar dan pengotor-pengotor yang berupa logam yang terdapat dalam pasir akan keluar. Gugus  $\text{SiO}_2$  pada pasir akan berikatan hidrogen dengan atom H dari gugus  $-\text{NH}_2$  dan  $-\text{COOH}$  pada enzim. Pektinase memiliki pI 9,8 sehingga bermuatan positif karena  $\text{pI} > \text{pH}$ . Adanya ikatan hidrogen mengakibatkan terjadinya interaksi elektrostatis antara muatan positif pada pektinase ( $-\text{NH}_3^+$ ) dengan atom oksigen bermuatan negatif pada gugus  $\text{Si}-\text{O}(\text{H})-\text{Si}$  [47].

Proses pengocokan menyebabkan laju difusi pektinase menuju pasir akan semakin cepat sehingga kesetimbangan adsorpsi akan semakin cepat tercapai. Pada penelitian ini, penentuan lama pengocokan optimum dilakukan dengan lima variasi waktu berbeda dengan konsentrasi pektinase (1,887 mg/mL) dan massa pasir (0,1g) serta dikondisikan seragam untuk tiap variasi waktu. Probabilitas kontak antara pektinase dan pasir berbanding lurus dengan peningkatan lama pengocokan sehingga semakin lama waktu pengocokan maka pektinase teradsorpsi semakin banyak dan aktivitas semakin tinggi hingga mencapai fasa kesetimbangan.



**Gambar 4.1:** Grafik hubungan antara lama pengocokan terhadap jumlah pektinase teradsorpsi



**Gambar 4.2:** Grafik hubungan antara lama pengocokan terhadap aktivitas pektinase amobil

Jumlah pektinase teradsorpsi meningkat secara signifikan seiring dengan peningkatan lama pengocokan pada 1 hingga 3 jam dan selanjutnya menunjukkan fasa kesetimbangan pada 3, 4 dan 5 jam sehingga pada lama pengocokan tiga jam telah tercapai kesetimbangan adsorpsi pektinase amobil (Gambar 4.1). Hal ini didukung oleh hasil uji statistik BNT 5% pada lampiran L.1.1 yang menunjukkan hasil tidak berbeda nyata untuk lama pengocokan 3

hingga 5 jam. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa lama pengocokan tiga jam merupakan lama pengocokan optimum untuk menghasilkan jumlah pektinase teradsorpsi maksimum sebesar 54,863 mg/g pasir.

Jumlah pektinase teradsorpsi berbanding lurus dengan aktivitas pektinase amobil. Semakin lama waktu pengocokan akan menyebabkan semakin meningkatnya aktivitas dari pektinase amobil (Gambar 4.2). Untuk mengetahui pengaruh lama pengocokan terhadap aktivitas dari pektinase amobil, maka dilakukan uji statistik yaitu dengan uji F dan BNT 5% yang terdapat pada lampiran L.2.1. Hasil analisa menunjukkan bahwa  $F_{hitung}$  mempunyai nilai yang lebih besar daripada  $F_{tabel}$ , sehingga untuk mengetahui konsentrasi mana saja yang memiliki pengaruh terhadap aktivitas pektinase, maka dilanjutkan dengan uji BNT 5%. Berdasarkan uji BNT 5% dapat diketahui bahwa pada lama pengocokan 3 hingga 5 jam memiliki pengaruh tidak berbeda nyata sehingga aktivitas optimum pektinase terdapat lama pengocokan tiga jam dengan aktivitas pektinase amobil sebesar 551,660 unit.

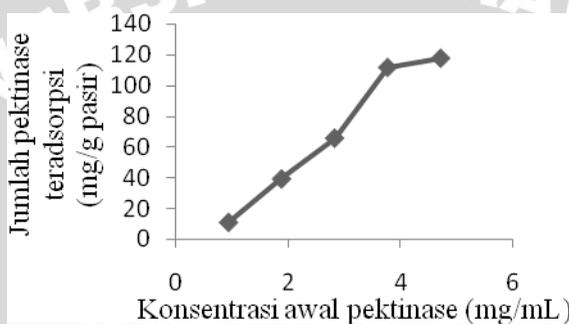
Dengan demikian, dapat diketahui bahwa waktu tiga jam merupakan lama pengocokan optimum untuk menghasilkan jumlah pektinase teradsorpsi dan aktivitas maksimum, yaitu sebesar 54,863 mg/g pasir dengan aktivitas 551,660 unit.

#### **4.1.2. Penentuan konsentrasi pektinase optimum**

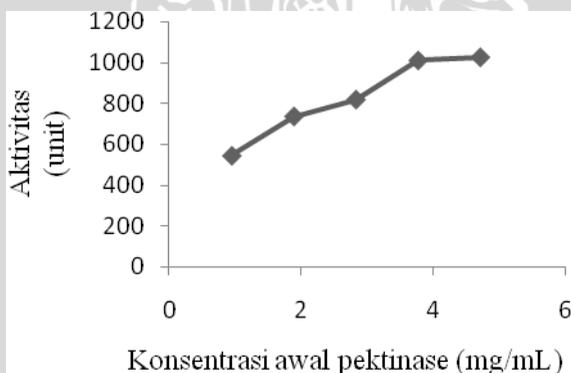
Peningkatan jumlah konsentrasi enzim menyebabkan peningkatan jumlah enzim yang diadsorpsi sampai batas optimumnya (Gambar 4.3).

Adsorpsi merupakan proses melekatnya molekul atau zat pada permukaan padatan atau cairan, yaitu dalam hal ini adsorpsi adalah melekatnya pektinase pada permukaan pasir. Pada saat konsentrasi awal yaitu dari 0,943 mg/mL hingga 3,774 mg/mL, jumlah pektinase yang teradsorpsi mengalami peningkatan cukup signifikan dikarenakan adanya perbedaan potensial kimia antara pektinase dengan permukaan pasir yang cukup tinggi. Adsorpsi dapat terjadi dengan baik apabila potensial dari larutan enzim lebih tinggi daripada potensial permukaan pasir. Semakin tinggi perbedaan potensial antara keduanya, maka laju difusi pektinase untuk teradsorpsi ke permukaan pasir akan semakin tinggi sehingga menyebabkan semakin banyak pektinase yang teradsorpsi. Proses

adsorpsi ini akan mencapai kesetimbangan, apabila laju dari adsorpsi sama dengan laju desorpsinya. Kesetimbangan ini dapat terjadi karena permukaan dari pektinase mengalami titik jenuh oleh pektinase sehingga konsentrasi optimumnya dapat diperoleh pada saat konsentrasi enzim yang menghasilkan jumlah pektinase teradsorpsi yang relatif konstan. Kesetimbangan ini tetap terjadi meskipun dilakukan penambahan konsentrasi pektinase secara lebih lanjut.



**Gambar 4.3:** Grafik hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap jumlah pektinase teradsorpsi



**Gambar 4.4:** Grafik hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap aktivitas pektinase amobil

Hal ini berbanding lurus dengan peningkatan aktivitas pektinase amobil (Gambar 4.4). Aktivitas enzim meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi pektinase dan jumlah pektinase teradsorpsi karena semakin banyak pektinase yang teradsorpsi maka enzim akan semakin mudah melakukan reaksi enzimatik. Pada saat reaksi enzimatik ini berlangsung, substrat dapat lebih mudah mencari sisi aktif pektinase untuk berikatan. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi awal pektinase terhadap aktivitas dari pektinase amobil, maka dilakukan uji statistik yaitu dengan uji F dan BNT 5% yang terdapat pada lampiran L.2.2. Berdasarkan uji BNT 5% dapat diketahui bahwa pada konsentrasi pektinase 3,774 mg/mL dan 4,717 mg/mL memiliki pengaruh tidak berbeda nyata sehingga aktivitas optimum pektinase terdapat pada konsentrasi pektinase 3,774 mg/mL dengan aktivitas pektinase amobil sebesar 1007,677 unit. Hal ini berbanding lurus dengan massa pektinase teradsorpsi pada variasi konsentrasi pektinase karena massa pektinase teradsorpsi optimum juga terdapat pada konsentrasi pektinase 3,774 mg/mL.

#### **4.2. Efisiensi pemakaian pektinase amobil**

Pektinase amobil merupakan enzim yang dapat dipakai secara berulang tetapi dapat menurunkan aktivitasnya. Semakin sering pektinase amobil dipakai maka aktivitas enzim akan semakin menurun (Tabel 4.1). Pektinase diamobil selama waktu optimum (tiga jam) dengan konsentrasi larutan pektinase sebanyak 4 mL dan diuji pemakaian pektinase amobil sebanyak lima kali pemakaian serta diuji aktivitas pektinase amobil setiap kali pengulangan pemakaian enzim. Penurunan aktivitas enzim setelah pemakaian berulang, kemungkinan disebabkan oleh penyusutan pori (*shrinkage*) sehingga terjadi perubahan konformasi enzim [47]. Pemakaian pektinase amobil ini dapat digunakan sebanyak empat kali pemakaian (Tabel 4.1) karena pektinase amobil masih baik digunakan jika efisiensinya masih di atas 50% [48]. Hasil penelitian ini lebih baik jika dibandingkan dengan pektinase dari *Aspergillus niger* yang diamobilkan dengan matriks kalsium alginat dihasilkan aktivitas sebesar 14,81% setelah tiga kali pemakaian [10].

**Tabel 4.1:** Pengaruh pengulangan pemakaian pektinase amobil terhadap aktivitas pektinase amobil

Pengulangan pemakaian pektinase amobil	Aktivitas (unit)	% Efisiensi
1	1067,881	100
2	977,788	91,56
3	898,369	84,13
4	730,139	68,37
5	513,659	48,10



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Kondisi optimum amobilisasi pektinase dicapai pada lama pengocokan tiga jam dan konsentrasi pektinase 3,774 mg/mL dengan aktivitas pektinase amobil 1007,7 unit dan jumlah pektinase teradsorpsi pada pasir sebesar 111,6 mg/g pasir.
2. Semakin lama waktu pengocokan dan semakin besar konsentrasi larutan enzim, maka akan meningkatkan massa pektinase teradsorpsi hingga mencapai fasa kesetimbangan.
3. Peningkatan massa pektinase teradsorpsi berbanding lurus dengan peningkatan aktivitas pektinase amobil.
4. Pektinase amobil dapat digunakan empat kali dengan aktivitas sebesar 68,37%.

#### 5.2. Saran

Untuk mengetahui interaksi yang terjadi pada saat amobilisasi pektinase, maka hasil penelitian ini dapat dilanjutkan dengan penelitian selanjutnya untuk menentukan jenis-jenis interaksi yang terjadi pada pasir dan pektinase.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Muchtadi D.S., Palupi N. S., dan Astawan M., 1992. **Enzim dalam Industri Pangan**, PAU Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.
- [2] Poedjiadi A., Supriyanti, 2006, **Dasar-Dasar Biokimia**, UI-Press, Jakarta.
- [3] Poliana dan MacCabe A. P., 2007, **Industrial Enzymes; Structure, Function, and Applications**. Dordrecht, Springer, hal 99-1.
- [4] Bickerstaff, Gordon F., 1999, **Enzyme in Industry and Medicine**, Edward Arnold, Scotland.
- [5] Shefali G., Mukesh K., Krishna K. S., Lavanya M. N., dan Ramesh C. K., 2008, **Production and Recovery of an Alkaline Exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under Solid-State Fermentation using Statistical Approach**, *Journal Bioresource Technology*, Vol 99, hal 937-945.
- [6] Whitaker, John R., 2003, **Principles of Enzymology for the Food Science Fifth Edition**, Marcel Dekker Inc, New York.
- [7] Pereira E. B., de Castro H. F., de Moraes F. F., dan Zanin G. M., 2002, **Esterification Activity and Stability of *Candida rugosa* Lipase Immobilized into Chitosan**, *Journal Applied Biochemistry Biotechnology*, Vol 20, hal 977-986.
- [8] Minovska, Vilma., Winkelhausen, Eleonora., dan Kuzmanova, Slobodan., 2005, **Lipase Immobilized by Different Terchiques in Various Support Material Applied in Oil Hydrolisis**, *J. Serb. Chem. Soc.*, Vol 70 (4), hal 609–624.
- [9] Swaisgood H. E., Huang X. L dan Walsh M. K, 1997, **Immobilization of Enzymes by Selective Adsorption on**

**Biotinylaminopropyl Celite or Glass**, Humana Press  
Totowa, New Jersey, hal 367.

- [10] Shan-shan, Chen, QIU Nong-xue, 2007, **Studies on Immobilized Pectinase and its Characteristics by anion-exchange Resin, Department of Food Engineering**, Shaanxi Normal University, hal 4-14.
- [11] Buga M. L., Ibrahim S., dan Nok A. J., 2010, **Physico-chemical Characteristics of Immobilized Polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6)**, *African Journal Biotechnology*, Vol. 9 (52), hal 8934-8943.
- [12] Hadi, S., 2011, **Sintesis Silika Berbasis Pasir Alam Bancar menggunakan Metode Kopersipitasi**, *Tesis*, ITS, Surabaya.
- [13] Nittaya T., Apinon N., 2008, **Preparation of Nanosilica Powder from Rice Husk Ash by Precipitation Method**, *Chiang Mai Journal Science*, Vol 35 (1), hal 206-211.
- [14] Henri J., 1998, **Pengaktifan Zeolit Lampung dengan Berbagai Perlakuan**, *Jurnal Sains dan Teknologi*, Vol.4(2), hal 173-180.
- [15] Agustiawan H., 2010, **Amobilisasi Lipase dari *Mucor Miehei* menggunakan Matriks Oxidized Polypropilene (OPP)**, *Skripsi*, Universitas Brawijaya, Malang.
- [16] Taufik E., 1992, **Fermentasi Media Padat Kulit Buah Coklat oleh *Aspergillus sp* untuk Produksi Pektinase**, *Skripsi*, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor.
- [17] Dharani dan Aiyer, 2004, **Effect of C:N Ratio on Alpha Amylase Production by *Bacillus Licheniformis* SPT 27**, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 3 (10), hal 519-522.

- [18] Lehninger A. L., 1993, **Dasar-dasar Biokimia Jilid I**, Erlangga, Jakarta, hal 235-241.
- [19] Wong D.W., 1995, **Food Enzymes**, Chapman & Hall, New York, hal 175-181.
- [20] Pedrolli, Danielle B., Alexandre C. M., Eleni G., dan Eleonora C. C., 2009, **Isolated Pectinase from Fruit Industrial Waste**, *Open Biotechnology Journal.*, Vol. 3, hal 9-18.
- [21] Reed G., 1995, **Enzymes in Food Processing Second Edition**, Academic Press Inc, New York.
- [22] Sharma B. R., Naresh L., Dhuldhoya N. C., Merchant S. U., dan U.C. Merchan, 2006, **An Overview on Pectins**, *Times Food Processing Journal*, hal 44-51.
- [23] Lang C., dan Dorenberg H., 2000, **Perspective in The Biological Function and The Technological Applications of Polygalacturonases**. *Application Microbiol Biotechnology*, Vol 53, hal 366–375.
- [24] Mukesh, Kumar D. J., Saranya G., Suresh K., Andal P. D., Rajakumar R. K. P. T., 2012, **Production and Optimization of Pectinase from Bacillus sp. MFW7 using Cassava Waste**, *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2012, Vol 2 (3), hal 369-375.
- [25] Todar K., 2005, **The Genus Bacillus**, <http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>, diakses 21 Juni 2012
- [26] Singleton P., dan Sainsbury D., 2006, **Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3<sup>rd</sup> Edition**, John Wiley and Sons, England.
- [27] Arpita D., Moumita K., Rina R. R., 2011, **Production, Mechanistic Characterization and Properties of Pectinases from Bacillus sps**. *Der Pharma Lett.*, Vol 3 (2),

hal 358–367.

- [28] Murray R. K., Granner D. K., Mayes P.A., dan Rodwell V.W., 2003, **Harper's Biochemistry** 25<sup>th</sup> ed, Appleton and Lange, America.
- [29] Rahayu K., 1996, **Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim**, PAU Pangan dan Gizi UGM, hal 79-89.
- [30] Othmer K., 1987, **Encyclopedia of Chemical Technology**, John Wiley and Sons Inc., New York, hal 180-216.
- [31] Smith J. C., 1993, **Prinsip Bioteknologi**, alih bahasa: A Dharma, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hal 66.
- [32] Chaplin M., 2008, **Enzymes and Enzyme Technology**, [www.lsbu.ac.uk/biology/enzyme/practical1.html](http://www.lsbu.ac.uk/biology/enzyme/practical1.html), diakses tanggal 10 Juli 2012.
- [33] Nugroho T. T., 1997, **Studi Perbandingan Amobilisasi Enzim Invertase dengan Karbon Aktif dan Kalsium Alginat**, *Jurnal Penelitian VII*, hal 1-49.
- [34] Worsfold P. J., 1995, **Classification and Chemical Characteristic of Immobilized Enzymes**, *Journal Pure & Applied Chemistry*, Vol 87 (4), hal 597-600.
- [35] Rai University, 2005, **Immobilization of Enzymes**, industrial biotechnology/lecture-notes/lecture-21.pdf, diakses 25 Juni 2012.
- [36] Kennedy J., dan Melo E. H. M., 1999, **Immobilized Enzyme and Cells**, University of Birmingham, United Kingdom.
- [37] Adamson A.W., 1999, **Physical Chemistry of Surface**, John Wiley&Sons.Inc, California.
- [38] Trivadila, 2006, **Aktivitas Glukosa Dehidrogenase pada Tiga Isolat Bakteri Indonesia Terpilih yang diimmobilisasi**

**untuk Pengembangan Biosensor Glukosa Darah**, *Skripsi*, Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB, Bogor.

- [39] Wulan, Praswasti., Muhammad T. J., Heri H., 2003, **Reaksi Hidrolisis Minyak Zaitun Menggunakan Lipase *Rhizopus oryzae* yang di Imobilisasi Melalui Metode Adsorpsi**, Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia Kampus UI Depok.
- [40] Tan K. H., 1991, **Dasar-dasar Kimia Tanah**, UGM Press, Yogyakarta.
- [41] West A. R., 1984, **Solid State Chemistry and Its Application**, John Willey and Sons, New York.
- [42] Anwar K. P., 1985, **Prospek Pemakaian Zeolit Bayah sebagai Penyerap  $NH_4^+$  dalam Limbah**, Laporan Teknik Pengembangan No. 69, Dirjen Pertambangan Umum PPTM, Bandung.
- [43] Lewis S. R., 1993, **Hawley's Condensed Chemical Dictionary Twelfth Edition**, Van Norstrand Reinhold Company, New York.
- [44] Rini, Dian K., Fendy A. L., 2010, **Optimasi Aktivasi Zeolit Alam untuk Dehumidifikasi**, *Skripsi*, Jurusan Teknik kimia Fakultas Teknik UNDIP, Semarang.
- [45] Ajay O. A., dan Fagade E. O., 2007, **Heat Activation And Stability Of Amylase From Bacillus Species**, *African Journal of Biotechnology*. Vol 6, hal 1181-1184.
- [46] Banu A. R., Devi M. K., Gnanaprabhal G. B., Pradeep B. V., dan Palaniswamy M., 2010, **Production and Characterization of Pectinase Enzyme from *Penicillium chrysogenum***, *Indian Journal of Science and Technology*, Vol. 3 (4), hal 377-381.

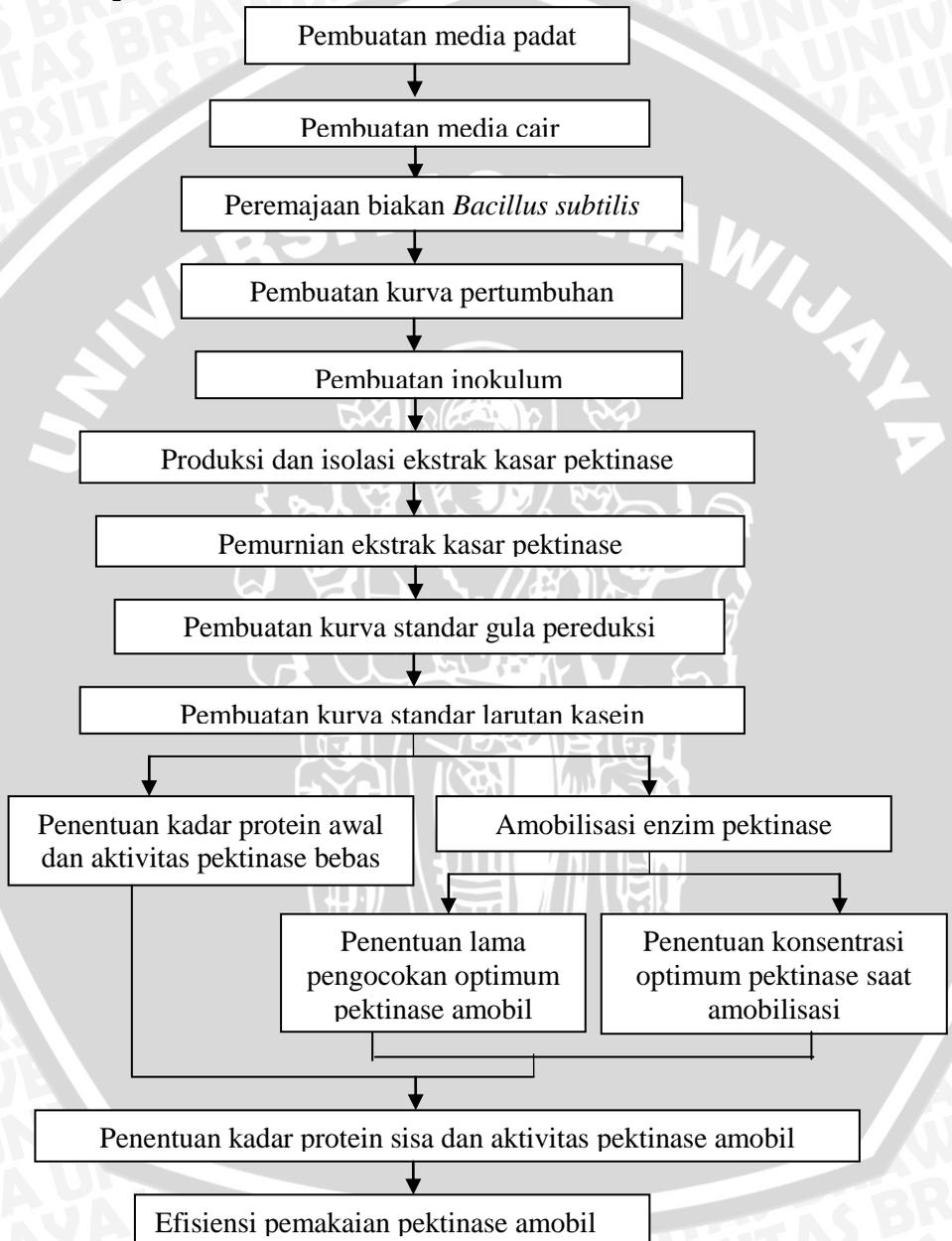
[47] Hindryawati N., 2010, **Stabilitas Enzim Dehidrogenase Laktat yang Teramobilisasi dalam Silika Gel dari Abu Sekam Padi**, *Mulawarman Scientific Journal*, Vol 9 (1), hal 170-175.

[48] Roosdiana A., Setianingsih T., Mardiana D., dan Suratmo, 2009, **Karakterisasi Lipase yang Diimmobilisasi dalam Aluminosilikat untuk Sintesis Laktosil Palmitat**, *Indonesian Journal Chemistry*, Vol 9 (2), hal 201- 205.



## LAMPIRAN

### Lampiran A. Alur Penelitian



## **Lampiran B. Preparasi Larutan**

### **L.B.1. Larutan Asam Sitrat 0,1 M**

Ditimbang 1,92 g asam sitrat kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

### **L.B.2. Larutan Dinatrium Hidrogen Fosfat 0,2 M**

Ditimbang 2,84 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

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

Sebanyak 100 mL larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M dimasukkan dalam gelas beaker, lalu ke dalamnya dimasukkan pengaduk magnetik. Elektroda pH dipasangkan dan dicelupkan dalam larutan. Dilakukan penambahan asam sitrat sedikit demi sedikit ke dalam larutan hingga mencapai pH 7.

### **L.B.4. Larutan Buffer Sitrat Fosfat pH 7 0,07 M**

Dipipet 35 mL larutan buffer sitrat fosfat pH 7 0,2 M, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diecerkan sampai tanda batas.

### **L.B.5. Larutan Stok Glukosa 5000 ppm**

Ditimbang 0,5000 gram glukosa anhidrat, kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia, kemudian dipindahkan secara kuantitatif dalam labu ukur 100 mL dan diecerkan sampai tanda batas.

### **L.B.6. Larutan Standar Gula Pereduksi**

Dibuat 100 mL larutan stok glukosa 5000 ppm. Kemudian larutan standar glukosa 5000 ppm tersebut dipipet berturut-turut 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 mL dimasukkan dalam labu ukur 10 mL kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan gula pereduksi dengan konsentrasi 500, 1.000,

1.500, 2.000 dan 2.500 ppm.

#### **L.B.7. Larutan NaOH 1%**

Ditimbang 1,001 gram NaOH dan dimasukkan dalam gelas kimia, kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades.

#### **L.B.8. Reagen DNS**

Ditimbang 1,0000 gram asam dinitrosalisilat, dimasukkan dalam gelas kimia dan ditambah 0,2 gram kristalin fenol serta 0,05 gram sodium sulfite. Kemudian dilarutkan dalam 100 mL NaOH 1% menggunakan stirer.

#### **L.B.9. Larutan Stok Kasein 10.000 ppm**

Ditimbang 1,0000 g kasein, kemudian dilarutkan dengan akuades 50 mL dalam gelas beaker dan ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 M hingga kasein larut, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

#### **L.B.10. Larutan Standar Kasein**

Disiapkan 9 buah labu ukur 10 mL, masing-masing labu ukur diisi dengan larutan stok kasein 10.000 ppm sebanyak 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; dan 9,0 mL kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, dan 9.000 ppm.

#### **L.B.11. Larutan NaOH 10%**

Ditimbang 10,001 gram NaOH dan dimasukkan dalam gelas kimia, kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades.

#### **L.B.12. Pereaksi Biuret**

Ditimbang 0,15 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dan 0,6 g  $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$ , dilarutkan dengan akuades sebanyak 30 mL dalam gelas beaker 100 mL. Kemudian ditambahkan 30 mL NaOH 10% sambil diaduk. Selanjutnya dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

### **L.B.13. Larutan HCl 0,1 M**

Dipipet 0,98 mL dari larutan HCl 37%, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

### **L.B.14. Larutan BaCl<sub>2</sub> 0,1 M**

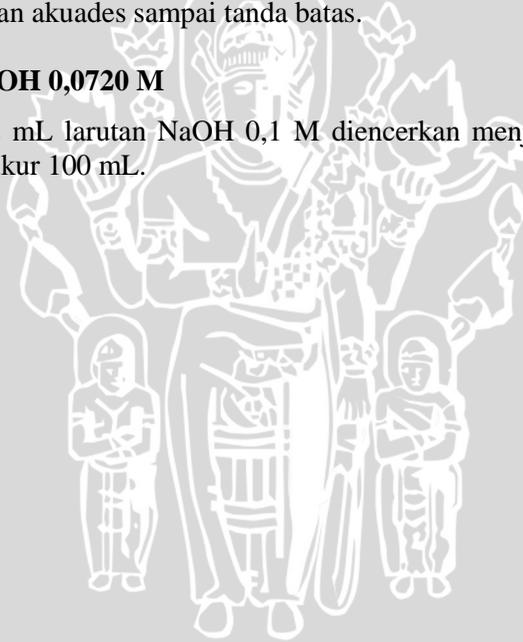
Ditimbang 2,4428 g BaCl<sub>2</sub>, lalu dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia lalu dipindah ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas.

### **L.B.15. Larutan NaOH 0,1 M**

Ditimbang 0,4 gram NaOH, dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia lalu dipindah ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas.

### **L.B.16. Larutan NaOH 0,0720 M**

Sebanyak 72 mL larutan NaOH 0,1 M diencerkan menjadi 100 mL dalam labu ukur 100 mL.



## Lampiran C. Perhitungan Preparasi Larutan

### L.C.1. Larutan asam sitrat ( $C_6H_8O_7$ ) 0,1 M

Larutan asam sitrat 0,1 M dibuat sebanyak 100 mL (Mr.  $C_6H_8O_7 = 192$  g/mol)

$$\begin{aligned}\text{mol } C_6H_8O_7 &= [C_6H_8O_7] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,01 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{massa } C_6H_8O_7 &= \text{mol } C_6H_8O_7 \times \text{Mr. } C_6H_8O_7 \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 192,06 \text{ g/mol} \\ &= 1,92 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi, asam sitrat yang harus ditimbang untuk membuat larutan asam sitrat 0,1 M adalah 1,92 g.

### L.C.2. Pembuatan larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M.

Larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M dibuat sebanyak 100 mL (Mr.  $Na_2HPO_4 = 142$  g/mol)

$$\begin{aligned}\text{mol } Na_2HPO_4 &= [Na_2HPO_4] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{massa } Na_2HPO_4 &= \text{mol } Na_2HPO_4 \times \text{Mr. } Na_2HPO_4 \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 142 \text{ g/mol} \\ &= 2,84 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi dinatrium hidrogen fosfat yang harus ditimbang untuk membuat larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M adalah 2,84 g.

### L.C.3. Larutan buffer sitrat fosfat pH 7 0,2 M

Untuk mendapatkan larutan buffer dengan pH yang

diharapkan, dibuat dengan mencampur larutan asam sitrat dan larutan dinatrium hidrogen fosfat berdasarkan persamaan dibawah ini:

$$pH = pK_a + \log \frac{[Garam]}{[Asam]}$$

Misalkan untuk membuat larutan buffer sitrat-fosfat dengan pH 5, larutan dinatrium hidogen fosfat 0,2 M yang dicampurkan sebanyak 100 mL, maka volume larutan asam sitrat yang ditambahkan adalah:

$$\begin{aligned}
 pK_a \text{ Asam sitrat} &= 4,62 \\
 7 &= 4,62 + \log \frac{(100 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mmol/mL})}{(V \text{ mL} \times 0,1 \text{ mmol/mL})} \\
 2,38 &= \log \frac{20}{0,1V} \\
 239,88 &= \frac{20}{0,1V} \\
 V &= 0,834 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

#### L.C.4. Pembuatan buffer sitrat fosfat pH 7 0,07 M

Larutan buffer sitrat fosfat pH 7 0,07 M dibuat dari larutan stok buffer sitrat fosfat pH 7 0,2 M dengan pengenceran dalam labu ukur 100 mL

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$0,2 \text{ M} \times V1 = 0,07 \text{ M} \times 100 \text{ mL}$$

$$V1 = 35 \text{ mL}$$

Jadi, volume larutan buffer sitrat fosfat pH 7 0,07 M yang dipipet adalah 35 mL.

#### L.C.5. Pembuatan larutan NaOH 0,1 M

Larutan NaOH 0,1 M dibuat sebanyak 100 mL (Mr. NaOH =

40 g/mol)

$$\begin{aligned}\text{mol NaOH} &= [\text{NaOH}] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} = 0,01 \text{ mol}\end{aligned}$$

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

Jadi, NaOH yang harus ditimbang untuk membuat larutan NaOH 0,1 M adalah 0,4 g.

#### **L.C.6. Pembuatan larutan BaCl<sub>2</sub> 0,1 M**

Larutan BaCl<sub>2</sub> 0,1 M dibuat sebanyak 100 mL (Mr. BaCl<sub>2</sub> = 244,24 g/mol)

$$\begin{aligned}\text{mol BaCl}_2 &= [\text{BaCl}_2] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} = 0,01 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{massa BaCl}_2 &= \text{mol BaCl}_2 \times \text{Mr. BaCl}_2 \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 244,24 \text{ g/mol} = 2,442 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi, BaCl<sub>2</sub> yang harus ditimbang untuk membuat larutan BaCl<sub>2</sub> 0,1 M adalah 2,442 g.

#### **L.C.7. Pembuatan larutan NaOH 0,0720 M**

Larutan NaOH 0,0720 M dibuat dari larutan stok NaOH 0,1 M dengan pengenceran dalam labu ukur 100 mL

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$0,1 \text{ M} \times V_1 = 0,0720 \text{ M} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 72 \text{ mL}$$

Jadi, volume larutan NaOH 0,1 M yang dipipet adalah 72 mL.

### L.C.8. Pembuatan larutan HCl 0,1 M

Larutan HCl 0,1 M dibuat dari larutan stok HCl 37%

$$37\% = 37 \text{ gram}/100 \text{ mL}$$

$$M = \frac{\text{massa}}{Mr} \times \frac{1000}{100}$$

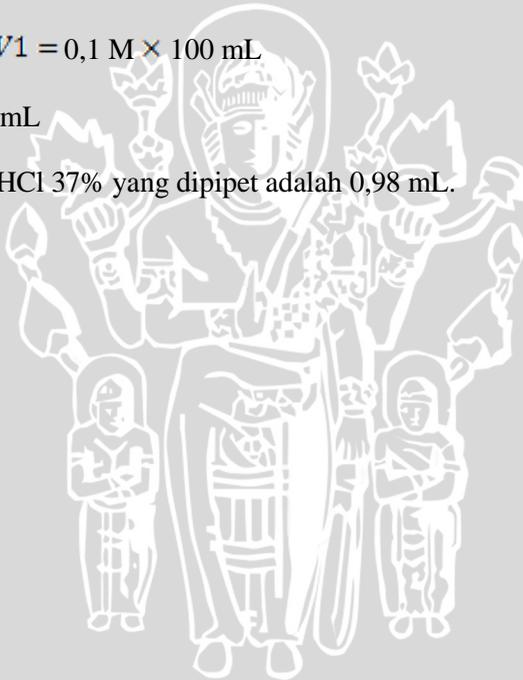
$$= \frac{37}{36,5} \times 10 = 10,137 \text{ M}$$

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$10,137 \text{ M} \times V1 = 0,1 \text{ M} \times 100 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,98 \text{ mL}$$

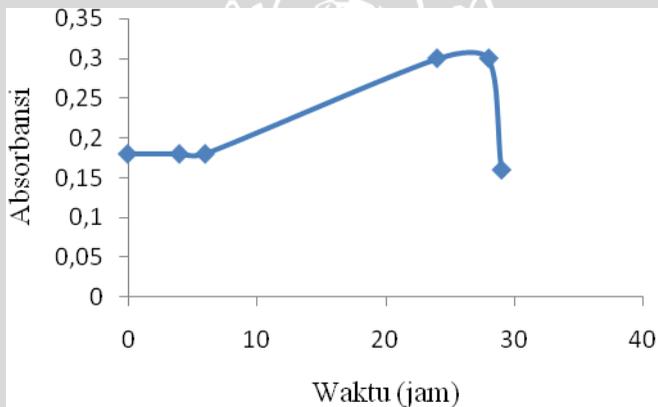
Jadi, volume larutan HCl 37% yang dipipet adalah 0,98 mL.



## Lampiran D. Kurva Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

Tabel L.D.1: Absorbansi waktu inkubasi *Bacillus subtilis*

Waktu inkubasi (jam)	Absorbansi
0	0,18
4	0,18
6	0,18
24	0,30
28	0,30
29	0,16

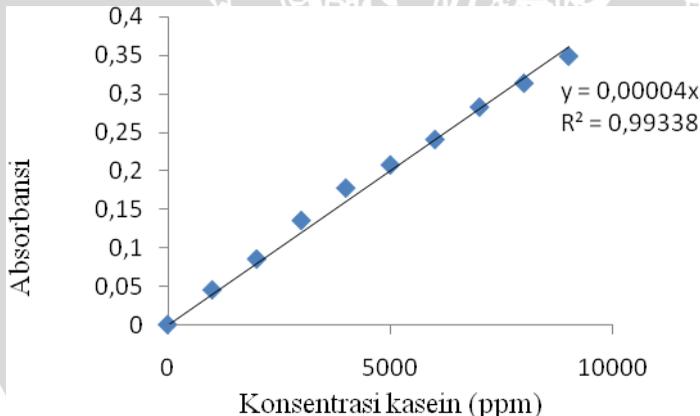


Gambar L.D.1: Kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis*

## Lampiran E. Pembuatan Kurva Standar

Tabel L.E.1: Absorbansi larutan standar Kasein  $\lambda$  559 nm

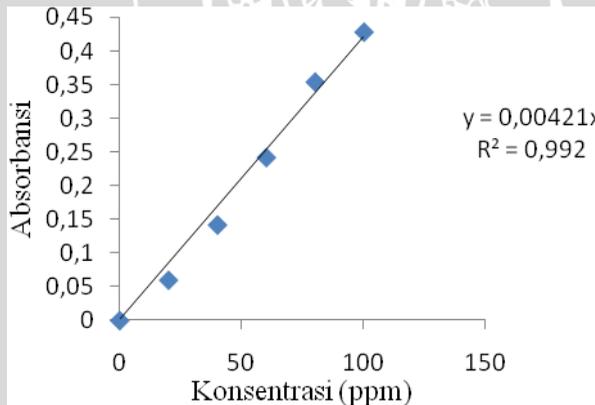
konsentrasi (ppm)	absorbansi			A rata-rata
	A1	A2	A3	
0	0	0	0	0
1000	0,045	0,045	0,044	0,045
2000	0,085	0,085	0,085	0,085
3000	0,135	0,135	0,135	0,135
4000	0,177	0,177	0,178	0,177
5000	0,207	0,207	0,206	0,207
6000	0,240	0,240	0,240	0,240
7000	0,282	0,282	0,281	0,282
8000	0,313	0,312	0,312	0,312
9000	0,348	0,343	0,348	0,348



Gambar L.E.1: Kurva standar kasein

**Tabel L.E.2:** Absorbansi larutan standar gula pereduksi  $\lambda$  540 nm

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			A rata- rata
	A1	A2	A3	
0	0	0	0	0
20	0,06	0,05	0,06	0,06
40	0,142	0,142	0,142	0,142
60	0,242	0,242	0,241	0,242
80	0,354	0,355	0,354	0,354
100	0,428	0,428	0,428	0,428



**Gambar L.E.2:** Kurva standar gula pereduksi

## Lampiran F. Pemurnian Pektinase

### L.F.1. Pemurnian ekstrak kasar pektinase dengan amonium sulfat fraksi 20-60%

Penambahan amonium sulfat ke dalam ekstrak kasar pektinase berdasarkan Tabel amonium sulfat yang ditambahkan pada setiap liter larutan pektinase (Lampiran L 6.2).

Contoh : fraksi 0-20%, maka perlu ditambahkan 113 g amonium sulfat pada 1000 mL larutan pektinase, sehingga pada 75 mL ekstrak kasar pektinase adalah :

$$\frac{114g}{1000mL} = \frac{w}{75mL}$$

$$w = 8,55g$$

w = banyaknya amonium sulfat yang ditambahkan



L.F.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 G. Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Pektinase Bebas

### L.G.1. Perhitungan kadar protein pektinase bebas

Perhitungan kadar protein yaitu melalui pengkonversian nilai absorbansi pektinase pada persamaan kurva standar Kasein menggunakan persamaan regresi kurva standar Kasein.

Diketahui persamaan Kasein :

$$Y = 4.10^{-5}X$$

Dimana : Y = Absorbansi

X = Konsentrasi

Volume pektinase 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

Konsentrasi total = Konsentrasi Protein Enzim + Kasein 5000 ppm

Contoh perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,387 adalah :

$$Y = 4.10^{-5}X$$

$$0,387 = 4.10^{-5}X$$

$$X = 9675 \text{ ppm}$$

Maka konsentrasi pektinase = konsentrasi protein total – konsentrasi kasein yang ditambahkan  
= 9675 ppm – 5000 ppm  
= 4675 ppm  
= 4,675 mg/mL

**Tabel L.G.1:** Kadar protein pektinase bebas

Fraksi %	Absorbansi			Kadar Protein(mg/mL)				Standar deviasi
	I	II	III	I	II	III	Rata-rata	
20-60	0,387	0,389	0,390	4,675	4,725	4,750	4,717	0,038

## L.G.2 Perhitungan aktivitas pektinase bebas

Konsentrasi gula pereduksi pada pektinase bebas ditentukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi pektinase bebas dengan persamaan regresi linear gula pereduksi.

Untuk perhitungan konsentrasi gula pereduksi pada pektinase bebas dengan nilai absorbansinya 0,854 adalah:

Diketahui persamaan regresi:

$$Y = 4,21 \cdot 10^{-3} X$$

$$0,854 = 4,21 \cdot 10^{-3} X$$

$$X = 202,850 \text{ ppm}$$

sehingga aktivitas enzim pektinase bebas:

$$\begin{aligned} AE &= \frac{\text{konsentrasi glukosa } (\mu\text{g/mL}) \times V \times fp}{p \times q} \times \frac{BM \text{ galakturonat}}{BM \text{ glukosa}} \\ &= \frac{202,850 \mu\text{g/mL} \times 6 \text{ mL} \times \frac{25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}}}{1 \text{ mL} \times 50 \text{ menit}} \times \frac{194,14 \mu\text{g}/\mu\text{mol}}{180 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} \\ &= 109,753 \text{ unit} \end{aligned}$$

**Tabel L.G.2:** Aktivitas pektinase bebas

Fraksi %	Absorbansi			Aktivitas (unit)				Standar deviasi
	I	II	III	I	II	III	Rata-rata	
20-60	0,854	0,854	0,855	109,753	109,753	109,882	109,796	0,074

**Lampiran H. Penentuan Jumlah Pektinase pada Variasi Lama Pengocokan**

**L.H.1. Jumlah pektinase sebelum amobilisasi**

Diketahui bahwa jumlah pektinase bebas setelah pemurnian yaitu 4,717 mg/mL pektinase sehingga jumlah pektinase sebelum amobilisasi dalam 5 mL larutan pektinase yang mengandung V mL pektinase dapat ditentukan dengan rumus berikut :

$$W = 4,717 \text{ mg/mL enzim} \times V \text{ ml enzim yang dicuplik}$$

Dimana :

V = volume pektinase murni yang dicuplik = 2 mL

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

sehingga :

$$W (2 \text{ mL}) \text{ pektinase} = 4,717 \text{ mg/mL pektinase} \times 2 \text{ mL} \\ = \mathbf{9,433 \text{ mg}}$$

Konsentrasi pektinase sebelum amobilisasi untuk 2 mL/5 mL adalah :

$$\frac{4,717 \text{ mg/mL} \times 2 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} = 1,887 \text{ mg/mL}$$

**L.H.2. Jumlah pektinase setelah amobilisasi pada variasi lama pengocokan**

**Tabel L.H.1:** Volume larutan pektinase setelah amobilisasi pada variasi lama pengocokan

Konsentrasi pektinase (mg/mL)	Lama pengocokan (jam)	Volume larutan pektinase (mL)			Volume larutan pektinase rata-rata (mL)	Standar deviasi	% deviasi
		I	II	III			
1,887	1	2,100	2,200	2,200	2,167	0,058	2,665
1,887	2	2,100	2,100	2,100	2,100	0,000	0,000
1,887	3	2,200	2,100	2,100	2,133	0,058	2,706
1,887	4	2,200	2,100	2,200	2,167	0,058	2,665
1,887	5	2,300	2,100	2,100	2,167	0,115	5,329

Volume pektinase 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 pektinase setelah amobilisasi ditentukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi pektinase yang tidak teramobil dengan persamaan regresi linear kasein.

Untuk perhitungan jumlah pektinase setelah amobilisasi pada lama pengocokan 1 jam dengan nilai absorbansinya 0,225 adalah:

Diketahui persamaan regresi:

$$Y = 4.10^{-5}X$$

$$0.225 = 4.10^{-5}X$$

$$X = 5625 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total = Konsentrasi Pektinase + konsentrasi Kasein 5000 ppm

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi pektinase} &= 5625 \text{ ppm} - 5000 \text{ ppm} \\ &= 625 \text{ ppm} \\ &= 0,625 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Diketahui volume larutan pektinase setelah amobilisasi adalah 2,167 mL sehingga jumlah pektinase setelah amobilisasi :

$$0,625 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 2,167 \text{ mL} = 8,125 \text{ mg}$$

**Tabel L.H.2:** Jumlah pektinase setelah amobilisasi

Lama pengocokan (jam)	Absorbansi			Jumlah enzim setelah teramobilisasi (mg)			Rata-rata (mg)	Standar deviasi	% deviasi
	I	II	III	I	II	III			
1	0,225	0,224	0,224	8,125	7,800	7,800	7,908	0,188	2,373
2	0,219	0,220	0,219	5,985	6,300	5,985	6,090	0,182	2,986
3	0,212	0,213	0,212	3,840	4,160	3,840	3,947	0,185	4,681
4	0,212	0,213	0,213	3,900	4,225	4,225	4,117	0,188	4,558
5	0,213	0,213	0,212	4,225	4,225	3,900	4,117	0,188	4,558

### L.H.3. Penentuan jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir

Untuk menentukan jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir, dilakukan dengan mengurangi jumlah pektinase sebelum

amobilisasi dengan jumlah pektinase setelah amobilisasi, dengan rumus:

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

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

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

**Tabel L.H.3: Jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir**

W awal (mg)	Lama pengocokan (jam)	Jumlah enzim setelah teramobilisasi (mg)			Jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 g pasir (mg)			Rata-rata (mg)	Standar deviasi	% deviasi
		I	II	III	I	II	III			
9,433	1	8,125	7,800	7,800	1,308	1,633	1,633	1,525	0,188	12,307
9,433	2	5,985	6,300	5,985	3,448	3,133	3,448	3,343	0,182	5,440
9,433	3	3,840	4,160	3,840	5,593	5,273	5,593	5,486	0,185	3,367
9,433	4	3,900	4,225	4,225	5,533	5,208	5,208	5,316	0,188	3,529
9,433	5	4,225	4,225	3,900	5,208	5,208	5,533	5,316	0,188	3,529

## Lampiran I. Penentuan Jumlah Pektinase pada Variasi Konsentrasi Pektinase

### L.I.1. Jumlah pektinase sebelum amobilisasi

Diketahui bahwa jumlah pektinase bebas setelah pemurnian yaitu 4,717 mg/mL pektinase sehingga jumlah pektinase sebelum amobilisasi dalam 5 mL larutan pektinase yang mengandung V mL pektinase dapat ditentukan dengan rumus berikut :

$$W = 4,717 \text{ mg/mL enzim} \times V \text{ ml enzim yang dicuplik}$$

Dimana :

V = volume pektinase murni yang dicuplik = 1 mL

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

Contoh :

W (1 mL) pektinase = 4,717 mg/mL pektinase x 1 mL = 4,717 mg

Dengan cara yang sama, maka jumlah pektinase sebelum amobilisasi yaitu: (4,717; 9,434; 14,151; 18,868; 23,585) mg.

Konsentrasi pektinase sebelum amobilisasi untuk 1 mL/5 mL adalah :

$$\frac{4,717 \text{ mg/mL} \times 1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} = 0,943 \text{ mg/mL}$$

Dengan cara yang sama diketahui konsentrasi larutan pektinase sebelum amobilisasi sebesar : (0,943; 1,887; 2,830 ; 3,774 ; 4,717) mg/mL.

**L.I.2. Jumlah pektinase setelah amobilisasi pada variasi konsentrasi pektinase**

**Tabel L.I.1:** Volume larutan pektinase setelah amobilisasi pada variasi konsentrasi pektinase

Konsentrasi Pektinase (mg/mL)	Volume larutan pektinase (mL)			Volume larutan pektinase rata-rata (mL)	Standar deviasi	% deviasi
	I	II	III			
0,943	2,200	2,300	2,300	2,267	0,058	2,547
1,887	2,400	2,300	2,500	2,400	0,100	4,167
2,830	2,200	2,500	2,300	2,333	0,153	6,547
3,774	2,200	2,400	2,200	2,267	0,115	5,094
4,717	2,600	2,500	2,700	2,600	0,100	3,846

Volume pektinase 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 pektinase setelah amobilisasi ditentukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi pektinase yang tidak terjebak dengan persamaan regresi kasein.

Untuk perhitungan jumlah pektinase setelah amobilisasi pada konsentrasi pektinase 4,717 mg/mL dengan nilai absorbansinya 0,230 adalah:

Diketahui persamaan regresi:

$$Y = 4.10^{-5}X$$

$$0,230 = 4.10^{-5}X$$

$$X = 5750 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total = Konsentrasi Pektinase + konsentrasi Kasein 5000 ppm

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi pektinase} &= 5750 \text{ ppm} - 5000 \text{ ppm} \\ &= 750 \text{ ppm} \\ &= 0,750 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Diketahui volume larutan pektinase setelah amobilisasi adalah 2,600 mL sehingga jumlah pektinase setelah amobilisasi :

$$0,750 \text{ mg/mL} \times \frac{12\text{mL}}{2\text{mL}} \times 2,600 \text{ mL} = 11,700 \text{ mg}$$

**Tabel L.I.2:** Jumlah pektinase setelah amobilisasi

konsentrasi pektinase (mg/mL)	Absorbansi			Jumlah enzim setelah teramobilisasi (mg)			Rata-rata (mg)	Standar deviasi	% deviasi
	I	II	III	I	II	III			
0,943	0,210	0,211	0,211	3,400	3,740	3,740	3,627	0,196	5,413
1,887	0,216	0,215	0,215	5,760	5,400	5,400	5,520	0,208	3,765
2,830	0,222	0,222	0,221	7,700	7,700	7,350	7,583	0,202	2,665
3,774	0,223	0,223	0,222	7,820	7,820	7,480	7,707	0,196	2,547
4,717	0,230	0,230	0,231	11,700	11,700	12,090	11,830	0,225	1,903

### L.I.3. Penentuan jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir

#### pasir

Untuk menentukan jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir dilakukan dengan mengurangi jumlah pektinase sebelum amobilisasi dengan jumlah pektinase setelah amobilisasi.

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

Dimana :

$W_{\text{sebelum amobilisasi}}$  = jumlah pektinase sebelum amobilisasi (mg)

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

**Tabel L.I.3:** Jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir

W awal (mg)	Jumlah enzim setelah teramobilisasi (mg)			Jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 g pasir(mg)			Rata-rata (mg)	standar deviasi	% deviasi
	I	II	III	I	II	III			
4,717	3,400	3,740	3,740	1,317	0,977	0,977	1,090	0,196	18,004
9,434	5,760	5,400	5,400	3,674	4,034	4,034	3,914	0,208	5,310
14,151	7,700	7,700	7,350	6,451	6,451	6,801	6,568	0,202	3,077
18,868	7,820	7,820	7,480	11,048	11,048	11,388	11,161	0,196	1,759
23,585	11,700	11,700	12,090	11,885	11,885	11,495	11,755	0,225	1,915

Diketahui : massa (pektinase + pasir) yang digunakan pada saat pengukuran aktivitas = 0,1 g, sedangkan massa pasir + pektinase seluruhnya setelah amobilisasi :

**Tabel L.I.4:** Massa pasir setelah amobilisasi

konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Massa pasir setelah amobilisasi (g)			Rata-rata (g)
	I	II	III	
0,943	0,300	0,200	0,200	0,233
1,887	0,250	0,250	0,250	0,250
2,830	0,350	0,300	0,350	0,333
3,774	0,300	0,340	0,350	0,330
4,717	0,370	0,370	0,360	0,367

sehingga jumlah pektinase dalam 0,1 g (pasir+pektinase) dapat ditentukan dengan rumus sebagai berikut :

Massa pektinase dalam 0,1 g (pasir+pektinase) :

$$= \frac{0,1g}{W_c} \times W_{\text{teradsorpsi}}$$

Dimana :  $W_{\text{teradsorpsi}}$  = jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam 0,1 g pasir

$W_c$  = massa pasir setelah amobilisasi (g)

Contoh :

Perhitungan jumlah pektinase setelah amobilisasi dalam 0,1 g (pektinase+pasir) dengan  $W_c$  sebesar 0,233 g :

$$= \frac{0,1g}{0,233g} \times 1,090 \text{ mg} = 0,467 \text{ mg}$$

**Tabel L.I.5:** Jumlah pektinase dalam pasir+enzim

konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Jumlah pektinase (mg) dalam 0,1 g pasir	Jumlah pektinase (mg) dalam 1 g pasir (mg/g)
0,943	0,467	4,673
1,887	1,566	15,656
2,830	1,970	19,703
3,774	3,382	33,822
4,717	3,206	32,059

**L.I.4. Penentuan konsentrasi pektinase sisa**

Konsentrasi pektinase sisa ditentukan dari jumlah pektinase setelah amobilisasi dengan volume filtrat.

Contoh:

Perhitungan konsentrasi pektinase sisa dengan jumlah pektinase setelah amobilisasi 3,627 mg dan volume filtrat 2,267 mL :

$$\text{Konsentrasi sisa} = \frac{3,627 \text{ mg}}{2,267 \text{ mL}} = 1,600 \text{ mg/mL}$$

**Tabel L.I.6:** Konsentrasi pektinase sisa

konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Jumlah pektinase setelah amobilisasi (mg)	Volume larutan pektinase rata-rata (mL)	Konsentrasi sisa pektinase (mg/mL)
0,943	3,627	2,267	1,600
1,887	5,520	2,400	2,300
2,830	7,583	2,333	3,250
3,774	7,707	2,267	3,400
4,717	11,830	2,600	4,550

## Lampiran J. Penentuan Aktivitas Pektinase Amobil

### L.J.1 Aktivitas pektinase amobil pada variasi lama pengocokan

Konsentrasi gula pereduksi pada pektinase amobil ditentukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi pektinase yang teramobil dengan persamaan regresi linear gula pereduksi.

Untuk perhitungan konsentrasi gula pereduksi pada pektinase amobil pada lama pengocokan 1 jam dengan nilai absorbansinya 0,323 adalah:

Diketahui persamaan regresi:

$$Y = 4.21.10^{-3}X$$

$$0,323 = 4,21.10^{-3}X$$

$$X = 76.722 \text{ ppm}$$

sehingga aktivitas pektinase amobil:

$$\begin{aligned} AE &= \frac{\text{konsentrasi glukosa } (\mu\text{g/mL}) \times V \times fp}{p \times q} \times \frac{EM \text{ galakturonat}}{EM \text{ glukosa}} \\ &= \frac{76,722 \mu\text{g/mL} \times 6 \text{ mL} \times \frac{25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}}}{0,1 \text{ g} \times 50 \text{ menit}} \times \frac{194,14 \mu\text{g}/\mu\text{mol}}{180 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} \\ &= 413,745 \text{ unit} \end{aligned}$$

**Tabel L.J.1:** Aktivitas pektinase amobil pada variasi lama pengocokan

Lama pengocokan (jam)	Absorbansi			Aktivitas (unit)			Rata-rata (unit)	Standar deviasi	% deviasi
	I	II	III	I	II	III			
1	0,323	0,350	0,341	413,745	448,331	436,802	432,959	17,610	4,067
2	0,396	0,391	0,386	507,254	500,849	494,445	500,849	6,405	1,279
3	0,427	0,428	0,437	546,963	548,244	559,773	551,660	7,055	1,279
4	0,415	0,410	0,413	531,592	525,187	529,030	528,603	3,224	0,610
5	0,409	0,403	0,410	523,906	516,221	525,187	521,772	4,850	0,929

### L.J.2. Aktivitas enzim pektinase amobil pada variasi konsentrasi

Penentuan aktivitas pektinase amobil pada variasi konsentrasi dilakukan dengan cara membuat variasi konsentrasi

larutan pektinase, yaitu dengan mengambil (1, 2, 3, 4, 5) mL larutan pektinase kemudian dilarutkan dengan buffer sitrat fosfat pH hingga volume 5 mL.

Konsentrasi gula pereduksi pada pektinase amobil ditentukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi pektinase yang teramobil dengan persamaan regresi linear gula pereduksi.

Untuk perhitungan konsentrasi gula pereduksi pada pektinase amobil pada konsentrasi 0,943 mg/mL dengan nilai absorbansinya 0,425 adalah:

Diketahui persamaan regresi:

$$Y = 4,21 \cdot 10^{-3} X$$

$$0,425 = 4,21 \cdot 10^{-3} X$$

$$X = 100,950 \text{ ppm}$$

sehingga aktivitas enzim pektinase amobil:

$$\begin{aligned} AE &= \frac{\text{konsentrasi glukosa } (\mu\text{g/mL}) \times V \times f_p}{p \times q} \times \frac{BM \text{ galakturonat}}{BM \text{ glukosa}} \\ &= \frac{100,950 \mu\text{g/mL} \times 6 \text{ mL} \times \frac{25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}}}{0,1 \text{ g} \times 50 \text{ menit}} \times \frac{194,14 \mu\text{g}/\mu\text{mol}}{180 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} \\ &= 544,402 \text{ unit} \end{aligned}$$

**Tabel L.J.2:** Aktivitas pektinase amobil pada variasi konsentrasi

konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Absorbansi			Aktivitas (unit)			Rata-rata (unit)	Standar deviasi	% deviasi
	I	II	III	I	II	III			
0,943	0,425	0,419	0,430	544,402	536,716	550,806	543,975	7,055	1,297
1,887	0,580	0,550	0,592	742,948	704,520	758,319	735,262	27,711	3,769
2,830	0,637	0,632	0,645	815,962	809,557	826,209	817,243	8,400	1,028
3,774	0,790	0,784	0,786	1011,946	1004,261	1006,823	1007,677	3,913	0,388
4,717	0,805	0,793	0,798	1031,161	1015,789	1022,194	1023,048	7,721	0,755

### Lampiran K. Efisiensi Pemakaian Pektinase Amobil

Efisiensi pemakaian enzim pektinase amobil dapat ditentukan dengan mengetahui aktivitas pektinase amobil pada setiap penggunaan (1, 2, 3, 4, 5) kali pektinase amobil.

Konsentrasi gula pereduksi pada pektinase amobil ditentukan dengan cara mengkonversi nilai absorbansi pektinase yang teramobil dengan persamaan regresi linear gula pereduksi.

Untuk perhitungan konsentrasi gula pereduksi pada pektinase amobil pada penggunaan 1 kali pektinase amobil dengan nilai absorbansinya 0,805 adalah:

Diketahui persamaan regresi:

$$Y = 4,21 \cdot 10^{-3} X$$

$$0,805 = 4,21 \cdot 10^{-3} X$$

$$X = 191,211 \text{ ppm}$$

sehingga aktivitas enzim pektinase amobil:

$$\begin{aligned}
 AE &= \frac{\text{konsentrasi glukosa } (\mu\text{g/mL}) \times V \times fp}{p \times q} \times \frac{BM \text{ galakturonat}}{BM \text{ glukosa}} \\
 &= \frac{191,211 \mu\text{g/mL} \times 6 \text{ mL} \times \frac{25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}}}{0,1 \text{ g} \times 50 \text{ menit}} \times \frac{194,14 \mu\text{g}/\mu\text{mol}}{180 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} \\
 &= 1031,161 \text{ unit}
 \end{aligned}$$

**Tabel L.K:** Efisiensi pemakaian pektinase amobil

Pengulangan Pemakaian Pektinase amobil	Absorbansi			Aktivitas (unit)			Rata-rata (unit)	Standar deviasi
	I	II	III	I	II	III		
1	0,805	0,836	0,860	1031,161	1070,870	1101,613	1067,881	35,321
2	0,736	0,777	0,777	942,775	995,294	995,294	977,788	30,322
3	0,701	0,702	0,701	897,942	899,223	897,942	898,369	0,740
4	0,561	0,576	0,573	718,610	737,824	733,981	730,139	10,167
5	0,401	0,401	0,401	513,659	513,659	513,659	513,659	0,000

## Lampiran L. Analisa Statistik

### L.L.1. Jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir

#### L.L.1.1. Pada variasi lama pengocokan

**Tabel L.L.1:** Analisis pengaruh lama pengocokan terhadap jumlah pektinase teradsorpsi pada pasir

Lama pengocokan (jam)	Jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,01 g pasir(mg)			Total	Rata-rata (mg)
	I	II	III		
1	1,308	1,633	1,633	4,574	1,525
2	3,448	3,133	3,448	10,029	3,343
3	5,593	5,273	5,593	16,459	5,486
4	5,533	5,208	5,208	15,949	5,316
5	5,208	5,208	5,533	15,949	5,316
Total	21,090	20,455	21,415	62,960	20,987

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n.p} = \frac{3963,962}{15} = 264,264$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK \\ = 300,726 - 264,264 = 36,264$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$\text{JKP} = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK$$
$$= 901,142/3 - 264,264 = 36,117$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$\text{JKG} = \text{JKT} - \text{JKP} = 36,264 - 36,117 = 0,346$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. KT Perlakuan =  $\frac{\text{JKP}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{36,117}{4} = 9,029$

b. KT Galat percobaan =  $\frac{\text{JKG}}{\text{dB percobaan}} = \frac{0,346}{10} = 0,035$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{9,029}{0,035} = 261,210$$

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

Karena  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi lama pengocokan berpengaruh terhadap jumlah pektinase teradsorpsi pada pasir. Untuk mengetahui variasi lama pengocokan mana saja yang berpengaruh terhadap jumlah pektinase teradsorpsi pada pasir, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 0,035/3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 0,148 = 0,338 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari kelima variasi lama pengocokan yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	264,264
JK total	36,462
JK perlakuan	36,117
JKG	0,346
dB perlakuan	4
KT perlakuan	9,029
dB galat	10
KT galat	0,035
F hitung	261,210

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

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	36,117	9,029	261,210	3,48
Galat percobaan	10	0,346	0,035		
Total	14	36,462	9,064		

**Tabel L.L.3:** Data Uji BNT 5% terhadap variasi lama pengocokan

Lama pengocokan (jam)	Rerata % Jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 g pasir (mg)	Lama pengocokan (jam)				
		1	2	4	5	3
		Rerata % Jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 g pasir (mg)				
		1,525	3,343	5,316	5,316	5,486
1	1,525	-				
2	3,343	<b>1,818</b>	-			
4	5,316	<b>3,792</b>	<b>1,973</b>	-		
5	5,316	<b>3,792</b>	<b>1,973</b>	-	-	
3	5,486	<b>3,962</b>	<b>2,143</b>	0,170	0,170	-

**Ket: blok hitam** = berbeda nyata

### L.L.1.2 Pada variasi konsentrasi pektinase

**Tabel L.L.4:** Analisis pengaruh konsentrasi larutan pektinase terhadap jumlah pektinase teradsorpsi pada pasir

konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 g pasir (mg)			Total	Rata-rata (mg)
	I	II	III		
0,943	1,317	0,977	0,977	3,271	1,090
1,887	3,674	4,034	4,034	11,742	3,914
2,830	6,451	6,451	6,801	19,703	6,568
3,774	11,048	11,048	11,388	33,484	11,161
4,717	11,885	11,885	11,495	35,265	11,755
Total	34,375	34,395	34,695	103,465	34,488

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{10705,006}{15} = 713,667$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$$

$$= 967,617 - 713,667 = 253,950$$

- b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK$$

$$= 2901,581 / 3 - 713,667 = 253,526$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$\begin{aligned} \text{JKG} &= \text{JKT} - \text{JKP} = 253,950 - 253,526 \\ &= 0,424 \end{aligned}$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{a. KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{253,526}{4} = 63,382$$

$$\begin{aligned} \text{b. KT Galat percobaan} &= \frac{\text{JKG}}{\text{dB percobaan}} \\ &= \frac{0,424}{10} = 0,042 \end{aligned}$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{63,382}{0,042} = 1496,261$$

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

Karena  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi konsentrasi larutan pektinase berpengaruh terhadap jumlah pektinase teradsorpsi pada pasir. Untuk mengetahui variasi konsentrasi larutan pektinase mana saja yang berpengaruh terhadap jumlah pektinase teradsorpsi pada pasir, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .

$$\begin{aligned} \text{BNT}_{5\%} &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2\text{KTG}/n)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 0,168 = 0,374 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari kelima variasi konsentrasi larutan pektinase yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	713,667
JK total	253,950
JK perlakuan	253,526
JK galat	0,424
dB perlakuan	4
KT perlakuan	63,382
dB galat	10
KT galat	0,042
F hitung	1496,261

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

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	253,526	63,382	1496,261	3,48
Galat percobaan	10	0,424	0,042		
Total	14	253,950	63,424		

**Tabel L.L.6:** Data uji BNT 5 % terhadap variasi konsentrasi pektinase

konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Rerata % Jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 g pasir (mg)	konsentrasi awal pektinase (mg/mL)				
		0,943	1,887	2,830	3,774	4,717
		Rerata % Jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 g pasir (mg)				
		1,090	3,914	6,568	11,161	11,755
0,943	1,090	-				
1,887	3,914	<b>2,824</b>	-			
2,830	6,568	<b>5,478</b>	<b>2,654</b>	-		
3,774	11,161	<b>10,071</b>	<b>7,247</b>	<b>4,593</b>	-	
4,717	11,755	<b>10,665</b>	<b>7,841</b>	<b>5,187</b>	<b>0,594</b>	-

**Ket: blok hitam** =berbeda nyata

## L.L.2 Aktivitas Pektinase Amobil

### L.L.2.1 Pada variasi lama pengocokan

Untuk mengetahui pengaruh jumlah pektinase teradsorpsi terhadap aktivitas pektinase amobil maka harus dianalisis dengan menggunakan pola RAL sebagai berikut:

**Tabel L.L.7:** Analisis pengaruh lama pengocokan terhadap aktivitas pektinase amobil

Lama pengocokan (jam)	Aktivitas (unit)			Total	Rata-rata (unit)
	I	II	III		
1	413,745	448,331	436,802	1298,878	432,959
2	507,254	500,849	494,445	1502,548	500,849
3	546,963	548,244	559,773	1654,981	551,660
4	531,592	525,187	529,030	1585,810	528,603
5	523,906	516,221	525,187	1565,315	521,772
Total	2523,461	2538,833	2545,237	7607,531	2535,844

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{57874534,104}{15} = 3858302,274$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$$
$$= 3883769,327 - 3858302,274 = 25467,053$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK$$

$$= 11648699,076/3 - 3858302,274 = 24597,418$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP$$

$$= 25467,053 - 24597,418 = 869,634$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. KT Perlakuan =  $\frac{JKP}{\text{dB perlakuan}} = \frac{24597,418}{4} = 6149,355$

b. KT Galat percobaan =  $\frac{JKG}{\text{dB percobaan}} = \frac{869,634}{10}$   
 $= 86,963$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{6149,355}{86,963} = 70,712$$

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

Karena  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi lama pengocokan berpengaruh terhadap aktivitas pektinase amobil. Untuk mengetahui variasi lama pengocokan mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas pektinase amobil, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .

$$\begin{aligned} BNT_{5\%} &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 86,963/3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 7,614 \\ &= 16,964 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari kelima variasi lama pengocokan yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	3858302,274
JK total	25467,053
JK perlakuan	24597,418
JKG	869,634
dB perlakuan	4
KT perlakuan	6149,355
dB galat	10
KT galat	86,963
F hitung	70,712

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

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	24597,418	6149,355	70,712	3,48
Galat percobaan	10	869,634	86,963		
Total	14	25467,053	6236,318		

**Tabel L.L.9:** Data Uji BNT 5% terhadap variasi lama pengocokan

Lama pengocokan (jam)	Rerata % aktivitas enzim (unit)	Lama pengocokan (jam)				
		1	2	5	4	3
		Rerata % aktivitas enzim (unit)				
		432,959	500,849	521,772	528,603	551,660
1	432,959	-				
2	500,849	<b>67,890</b>	-			
5	521,772	<b>88,812</b>	<b>20,922</b>	-		
4	528,603	<b>95,644</b>	<b>27,754</b>	6,832	-	
3	551,660	<b>118,701</b>	<b>50,811</b>	<b>29,889</b>	<b>23,057</b>	-

**Ket: blok hitam** = berbeda nyata

**L.L.2.2 Pada variasi konsentrasi**

Untuk mengetahui pengaruh jumlah pektinase teradsorpsi terhadap aktivitas pektinase amobil maka harus dianalisis dengan menggunakan pola RAL sebagai berikut:

**Tabel L.L.10:** Analisis pengaruh konsentrasi larutan pektinase terhadap aktivitas pektinase amobil

konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Aktivitas (unit)			Total	Rata-rata (unit)
	I	II	III		
0,943	544,402	536,716	550,806	1631,924	543,975
1,887	742,948	704,520	758,319	2205,787	735,262
2,830	815,962	809,557	826,209	2451,728	817,243
3,774	1011,946	1004,261	1006,823	3023,030	1007,677
4,717	1031,161	1015,789	1022,194	3069,144	1023,048
total	4146,418	4070,843	4164,352	12381,613	4127,204

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n.p} = \frac{153304336,188}{15} = 10220289,079$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$$

$$= 10701258,615 - 10220289,079 = 480969,536$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK \\ &= 32097996,879/3 - 10220289,079 = 479043,214 \end{aligned}$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$\begin{aligned} \text{JKG} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 480969,536 - 479043,214 = 1926,322 \end{aligned}$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{a. KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{479043,214}{4} = 119760,803$$

$$\begin{aligned} \text{b. KT Galat percobaan} &= \frac{\text{JKG}}{\text{dB percobaan}} = \frac{1926,322}{10} \\ &= 192,632 \end{aligned}$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{119760,803}{192,632} = 621,707$$

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

Karena  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi konsentrasi larutan pektinase berpengaruh terhadap aktivitas pektinase amobil. Untuk mengetahui variasi konsentrasi larutan pektinase mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas pektinase amobil, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 192,632/3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 11,332 \\ &= 25,248 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari kelima variasi konsentrasi larutan pektinase yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	10220289,079
JK total	480969,536
JK perlakuan	479043,214
JKG	1926,322
dB perlakuan	4
KT perlakuan	119760,803
dB galat	10
KT galat	192,632
F hitung	621,707

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

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan Galat percobaan	4	479043,214	119760,803	621,707	3,48
Total	10	1926,322	192,632		
	14	480969,536	119953,435		

**Tabel L.L.12:** Data Uji BNT 5% terhadap variasi konsentrasi pektinase

Konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Rerata % aktivitas enzim (unit)	konsentrasi awal pektinase (mg/mL)				
		0,943	1,887	2,830	3,774	4,717
		Rerata % aktivitas enzim (unit)				
		543,975	735,262	817,243	1007,677	1023,048
0,943	543,975	-	-	-	-	-
1,887	735,262	<b>191,288</b>	-	-	-	-
2,830	817,243	<b>273,268</b>	<b>81,980</b>	-	-	-
3,774	1007,677	<b>463,702</b>	<b>272,414</b>	<b>190,434</b>	-	-
4,717	1023,048	<b>479,073</b>	<b>287,786</b>	<b>205,805</b>	15,371	-

**Ket: blok hitam** = berbeda nyata

### L.L.3 Efisiensi pemakaian pektinase amobil

Untuk mengetahui pengaruh pengulangan pemakaian pektinase amobil terhadap aktivitas pektinase amobil maka harus dianalisis dengan menggunakan pola RAL sebagai berikut:

**Tabel L.L.13:** Analisis pengaruh pengulangan pemakaian pektinase amobil terhadap aktivitas pektinase amobil

Pengulangan Pemakaian Pektinase amobil	Aktivitas (unit)			Total	Rata-rata (unit)
	I	II	III		
1	1031,161	1070,870	1101,613	3203,643	1067,881
2	942,775	995,294	995,294	2933,364	977,788
3	897,942	899,223	897,942	2695,108	898,369
4	718,610	737,824	733,981	2190,416	730,139
5	513,659	513,659	513,659	1540,977	513,659
Total	4104,147	4216,870	4242,489	12563,507	4187,836

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{157841707,987}{15} = 10522780,530$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$$

$$= 11105904,439 - 10522780,530 = 583123,907$$

- b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right] - FK$$

$$= 33304087,951/3 - 10522780,530 = 578582,118$$

- c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP$$

$$= 583123,907 - 578582,118 = 4541,789$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$a. \text{KT Perlakuan} = \frac{JKP}{\text{dB perlakuan}} = \frac{578582,118}{4} = 144645,529$$

$$b. \text{KT Galat percobaan} = \frac{JKG}{\text{dB percobaan}} = \frac{4541,789}{10} = 454,179$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{144645,529}{454,179} = 318,477$$

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

Karena  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi waktu amobilisasi berpengaruh terhadap aktivitas pektinase amobil. Untuk mengetahui variasi waktu amobilisasi mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas pektinase amobil, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .

$$\begin{aligned} \text{BNT}_{5\%} &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 454,179/3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 17,007 \\ &= 38,769 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari kelima variasi waktu amobilisasi yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut:

FK	10522780,53
JK total	583123,907
JK perlakuan	578582,118
JK galat	4541,789
dB perlakuan	4
KT perlakuan	144645,529
dB galat	10
KT galat	454,179
F hitung	318,477

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

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan Galat percobaan	4	578582,118	144645,529	318,477	3,48
Total	14	583123,907	145099,708		

**Tabel L.L.15:** Data Uji BNT 5% terhadap pengulangan pemakaian pektinase amobil

Pengulangan Pemakaian Pektinase amobil	Rerata % aktivitas enzim (unit)	Pengulangan Pemakaian Pektinase amobil				
		5	4	3	2	1
		Rerata % aktivitas enzim (unit)				
		513,659	730,139	898,369	977,788	1067,881
5	513,659	-				
4	730,139	<b>216,480</b>	-			
3	898,369	<b>384,710</b>	<b>168,231</b>	-		
2	977,788	<b>464,129</b>	<b>247,649</b>	<b>79,419</b>	-	
1	1067,881	<b>554,222</b>	<b>337,742</b>	<b>169,512</b>	<b>90,093</b>	-

**Ket: blok hitam** = berbeda nyata