

**Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus subtilis*
Menggunakan Matriks Pasir Laut Teraktivasi HCl**

SKRIPSI

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

oleh:

MARTA WIDYANTI

0910920015 - 92



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2013

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus subtilis*
Menggunakan Matriks Pasir Laut Teraktivasi HCl**

oleh:

**MARTA WIDYANTI
0910920015 - 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

Drs. Sutrisno, M.Si

NIP. 19580711 199203 2 002

NIP. 19620318 199002 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 : Marta Widyanti

NIM : 0910920015

Jurusan : Kimia

Penulisan skripsi berjudul :

Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus subtilis*
Menggunakan Matriks Pasir Laut Teraktivasi HCl

Dengan ini menyatakan bahwa :

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Januari 2013

Yang menyatakan,

(Marta Widyanti)

NIM. 0910920015

Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus subtilis* Menggunakan Matriks Pasir Laut Teraktivasi HCl

ABSTRAK

Amobilisasi pektinase dengan metode adsorpsi fisik pada matriks pasir laut teraktivasi HCl, digunakan untuk mendegradasi senyawa pektin. Pektinase perlu diamobilkan untuk meningkatkan efisiensi pemakaian enzim sehingga dapat dipakai berulang kali. Pektinase diisolasi dari *Bacillus subtilis* dan dimurnikan dengan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20–60%. Penelitian ini bertujuan mengetahui waktu pengocokan, konsentrasi pektinase optimum, serta efisiensi pemakaian ulang pektinase amobil. Pada penelitian ini dilakukan variasi waktu pengocokan (1, 2, 3, 4, 5) jam dan variasi konsentrasi pektinase (0,943; 1,887; 2,830; 3,774; 4,717) mg/mL pada 0,1 g pasir pada temperatur ruang. Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan reagen Biuret, sedangkan kadar asam galakturonat menggunakan reagen DNS. Pektinase yang digunakan untuk amobilisasi mempunyai kadar protein 4,717 mg/mL dengan aktivitas 109,8 unit. Penentuan efisiensi pektinase amobil dilakukan dengan uji aktivitas sebanyak lima kali pengulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum amobilisasi pektinase dicapai pada waktu pengocokan 4 jam dan konsentrasi pektinase 3,774 mg/mL dengan jumlah pektinase teradsorpsi 140,680 mg/g pasir dan aktivitas 1049,9 unit. Pektinase amobil dapat digunakan sebanyak lima kali pengulangan dengan aktivitas sebesar 50,90%.

Kata Kunci: aktivitas, Bacillus subtilis, pasir laut teraktivasi HCl, pektinase.

Pectinase Immobilization from *Bacillus subtilis* Using HCl-Activated Sea Sand Matrix

ABSTRACT

Immobilization of pectinase by physical adsorption method on a matrix of HCl activated sand is used to degrade pectin compounds. Pectinase immobilization was necessary to improve the efficiency of the enzyme so it can be used repeatedly. Pectinase isolated from *Bacillus subtilis* was purified by using ammonium sulphate at 20-60% saturation level. This study aimed to determine the shaking time, optimum concentration of pectinase, and the efficiency of immobilized pectinase. In this research, the shaking time (1, 2, 3, 4, 5) hours and variation of pectinase concentration (0.943; 1.887; 2.830; 3.774; 4.717) mg / mL at 0.1 g of sand, at room temperature. Determination of protein content is done by using Biuret reagent, whereas galacturonic acid amount used DNS reagent. Initial protein content of free enzyme was 4.717 mg/mL and the activity was 109.8 units. Determination of the efficiency of immobilized pectinase activity assay performed with five repetitions. The results showed that the optimum condition of immobilization pectinase is achieved on shaking time 4 hours and pectinase concentration of 3.774 mg/mL yielding in 140.680 mg adsorbed pectinase/g sand within activity of 1049.9 units. Immobilized pectinase can be use until five repetition with 50.90% activity.

Keywords: activities, Bacillus subtilis, HCl-activated sea sand, pectinase.

KATA PENGANTAR

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

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Oleh sebab itu, penulis memberikan penghargaan dan 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 skripsi ini.
2. Drs. Sutrisno, M.Si, selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan, serta nasehat selama masa studi penulis dan dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Dr. Soebiantoro, Apt.MSc selaku dosen pembimbing akademik yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan serta dukungan.
4. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS, selaku Ketua Jurusan Kimia, serta segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia untuk semua perhatian yang telah diberikan pada penulis.
5. Ayah, Ibu, Adik dan seluruh keluarga yang selalu mendoakan, memberikan dukungan, semangat dan kasih sayang kepada penulis dalam mengerjakan skripsi ini.
6. Semua pihak yang telah banyak membantu hingga terselesaikannya skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun. Akhirnya, penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, Januari 2013

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Enzim	4
2.2 Pektinase	4
2.3 <i>Bacillus subtilis</i>	5
2.4 Isolasi Enzim dan Pemurnian Enzim	6
2.5 Pasir Laut	7
2.6 Silika	8
2.7 Aktivasi Pasir Laut	9
2.8 Amobilisasi Enzim	10
2.9 Adsorpsi	13
2.10 Kadar Protein Enzim	13
2.11 Aktivitas Enzim	14
2.12 Hipotesis	14
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	15
3.2.1 Bahan penelitian	15
3.2.2 Bahan kimia	15
3.2.3 Alat penelitian	15
3.3 Tahapan Penelitian	16

3.4 Cara Kerja	17
3.4.1 Pembuatan akuades steril	17
3.4.2 Pembuatan media padat	17
3.4.3 Pembuatan media cair	17
3.4.4 Peremajaanbiakan <i>Bacillus subtilis</i>	18
3.4.5 Pembuatan kurva pertumbuhan	18
3.4.6 Pembuatan inokulum	18
3.4.7 Produksi dan isolasi pektinase	18
3.4.8 Pemurnian ekstrak kasar pektinase	19
3.4.9 Pembuatan kurva baku larutan kasein	19
3.4.10 Uji kadar protein awal	20
3.4.11 Pembuatan kurva baku gula pereduksi	20
3.4.12 Uji aktivitas pektinase bebas	20
3.4.13Amobilisasi enzim	21
3.4.13.1 Preparasi matriks pasir laut	21
3.4.13.2 Aktivasi pasir laut	21
3.4.13.3 Variasi lama pengocokan	22
3.4.13.4 Variasi konsentrasi	22
3.4.14 Uji kadar protein sisa	23
3.4.15Uji aktivitas pektinase amobil	23
3.4.16 Efisiensi penggunaan pektinase amobil	23
3.5Analisa Data	23
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi dan Aktivasi Pasir Laut	25
4.2 Penentuan Kondisi Optimum Amobilisasi Pektinase Menggunakan Pasir Laut	25
4.2.1 Penentuan Waktu Pengocokan Optimum	26
4.2.2 Penentuan Konsentrasi Pektinase Optimum	28
4.3 Efisiensi Penggunaan Pektinase Amobil	30
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	32
5.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 :	Struktur pektin	5
Gambar 2.2 :	Struktur pasir kuarsa α	8
Gambar 2.3 :	Enzim yang terikat secara adsorpsi fisik	11
Gambar 2.4 :	Ikatan ionik antara enzim dan matriks	11
Gambar 2.5 :	Ikatan kovalen antara enzim dan matriks	11
Gambar 2.6 :	Ikatan silang antara enzim dan matriks	12
Gambar 2.7 :	Enzim terikat secara pengebakkan	12
Gambar 2.8 :	Reaksi antara rantai polipeptida dengan Cu^{2+}	13
Gambar 2.9 :	Reaksi antara 3,5-dinitrosalisilat dengan asam galakturonat	14
Gambar 4.1 :	Kurva hubungan antara waktu pengocokan terhadap pektinase teradsorpsi	27
Gambar 4.2 :	Kurva hubungan antara waktu pengocokan terhadap aktivitas pektinase	28
Gambar 4.3 :	Kurva hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap pektinase teradsorpsi	29
Gambar 4.4 :	Kurva hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap aktivitas pektinase	30
Gambar D.1 :	Kurva pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i>	48
Gambar E.1 :	Kurva baku gula pereduksi	49
Gambar E.2 :	Kurva baku kasein	50

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 :	Komposisi pasir laut	8
Tabel 4.1 :	Persentase aktivitas dari efisiensi pektinase amobil	31
Tabel D.1 :	Pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i>	48
Tabel E.1 :	Pembuatan kurva baku gula pereduksi	49
Tabel E.2 :	Pembuatan kurva baku kasein λ 559 nm	50
Tabel G.1 :	Kadar protein enzim bebas	53
Tabel G.2 :	Aktivitas pektinase bebas	54
Tabel H.1 :	Volume larutan pektinase setelah amobilisasi pada variasi waktu pengocokan	55
Tabel H.2:	Jumlah pektinase setelah amobilisasi	56
Tabel H.3:	Jumlah pektinase yang teradsorpsi pada pasir	56
Tabel H.4:	Absorbansi aktivitas pada variasi waktu pengocokan	57
Tabel H.5:	Aktivitas pektinase pada variasi waktu pengocokan	57
Tabel I.1 :	Volume larutan pektinase setelah amobilisasi pada variasi konsentrasi pektinase	59
Tabel I.2 :	Jumlah pektinase setelah amobilisasi	60
Tabel I.3 :	Jumlah pektinase yang teradsorpsi pasir	60
Tabel I.4 :	Massa pasir setelah amobilisasi	61
Tabel I.5 :	Jumlah pektinase dalam pasir	62
Tabel I.6 :	Konsentrasi pektinase sisa	62
Tabel I.7 :	Absorbansi aktivitas variasi konsentrasi	63
Tabel I.8 :	Aktivitas variasi konsentrasi pektinase	63
Tabel J.1 :	Absorbansi efisiensi	63
Tabel J.2 :	Aktivitas efisiensi	64
Tabel K.1:	Analisis pengaruh waktu pengocokan terhadap jumlah pektinase teradsorpsi	65
Tabel K.2:	Data analisa varian satu arah pektinase teradsorpsi variasi waktu pengocokan	67
Tabel K.3:	Data uji BNT 5% jumlah pektinase teradsorpsi terhadap variasi waktu pengocokan	67

Tabel K.4:	Analisis pengaruh konsentrasi pektinase terhadap pektinase teradsorpsi pasir	67
Tabel K.5:	Data analisa varian satu arah Pektinase teradsorpsi variasi konsentrasi pektinase	69
Tabel K.6:	Data uji BNT 5% pektinase teradsorpsi terhadap variasi konsentrasi pektinase	70
Tabel K.7:	Analisa pengaruh waktu pengocokan terhadap aktivitas pektinase amobil	70
Tabel K.8:	Data analisa varian satu arah aktivitas pektinase amobil terhadap variasi waktu pengocokan	72
Tabel K.9:	Data uji BNT 5% aktivitas terhadap variasi waktu pengocokan	72
Tabel K.10:	Analisis pengaruh konsentrasi pektinase terhadap aktivitas pektinase amobil	73
Tabel K.11:	Data analisa varian satu arah aktivitas pektinase amobil variasi konsentrasi	75
Tabel K.12:	Data uji BNT 5% aktivitas pektinase amobil terhadap variasi konsentrasi pektinase	75
Tabel K.13:	Analisis pengaruh pengulangan pektinase amobil terhadap aktivitas	75
Tabel K.14:	Data analisa variasi satu arah pengulangan pektinase amobil	77
Tabel K.15:	Data uji BNT 5% aktivitas terhadap pengulangan pektinase amobil	77

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A.	Alur Penelitian	40
Lampiran B.	Preparasi Larutan	41
B.1	Larutan Asam Sitrat 0,1 M	41
B.2	Larutan Dinatrium Hidrogen Fosfat 0,2 M	41
B.3	Larutan Buffer Sitrat Fosfat 0,2 M pH 7	41
B.4	Larutan Buffer Sitrat Fosfat 0,07 M pH 7	41
B.5	Larutan NaOH 0,1 M	41
B.6	Larutan Stok Kasein 10000 ppm	42
B.7	Larutan Stok Kasein	42
B.8	Larutan NaOH 10%	42
B.9	Pereaksi Biuret	42
B.10	Larutan HCl 0,1 M	42
B.11	Larutan HCl 0,4 M	43
B.12	Larutan BaCl ₂ 0,1 M	43
B.13	Larutan Stok Glukosa 5000 ppm	43
B.14	Larutan Stok Gula Pereduksi	43
B.15	Larutan NaOH 1%	43
B.16	Reagen DNS	44
B.17	Substrat Pektin	44
Lampiran C.	Perhitungan Preparasi Larutan	45
C.1	Larutan Asam Sitrat (C ₆ H ₈ O ₇) 0,1 M	45
C.2	Larutan Dinatrium Hidrogen fosfat 0,2 M	45
C.3	Larutan Buffer Sitrat Fosfat pH 7	46
C.4	Larutan NaOH 0,1 M	46
C.5	Larutan BaCl ₂ 0,1 M	47
C.6	Larutan HCl ₂ 0,4 M	47
C.7	Larutan HCl ₂ 0,1 M	47
Lampiran D.	Pembuatan Kurva Pertumbuhan	48
Lampiran E.	Pembuatan Kurva Baku	49
Lampiran F.	Pemurnian Pektinase	51
F.1	Pemurnian Ekstrak Kasar Pektinase dengan Amonium Sulfat Fraksi 20-60%	51
F.2	Massa Ammonium sulfat (gram) yang Ditambahkan Dalam Setiap Liter Larutan	52

Lampiran G.	Perhitungan Kadar Protein dan Aktivitas Pektinase Bebas	53
	G.1 Perhitungan Kadar Protein Pektinase Bebas	53
	G.2 Perhitungan Aktivitas Pektinase Bebas	54
Lampiran H.	Penentuan Waktu Pengocokan Optimum	55
	H.1 Jumlah Pektinase Setelah Amobilisasi Pada Variasi Waktu Pengocokan	55
	H.2 Penentuan Jumlah Pektinase yang Teradsorpsi Pasir	56
	H.3 Aktivitas Pektinase Variasi Waktu Pengocokan	57
Lampiran I.	Penentuan Konsentrasi Pektinase Optimum	58
	I.1 Jumlah Pektinase Sebelum Amobilisasi	58
	I.2 Jumlah Pektinase Setelah Amobilisasi Pada Variasi Konsentrasi Pektinase	59
	I.3 Penentuan Jumlah Pektinase yang Teradsorpsi Pasir	60
	I.4 Penentuan Konsentrasi Pektinase Sisa	62
	I.5 Aktivitas Pektinase Pada Variasi Konsentrasi	63
Lampiran J.	Efisiensi Pektinase Amobil	64
Lampiran K.	Analisa Statistik	65
	K.1 Jumlah Pektinase Teradsorpsi Pasir	65
	K.1.1 Pada Variasi Waktu Pengocokan	65
	K.1.2 Pada Variasi Konsentrasi Pektinase	67
	K.2 Aktivitas Pektinase Amobil	70
	K.2.1 Pada Variasi Waktu Pengocokan	70
	K.2.2 Pada Variasi Konsentrasi Pektinase	73
	K.3 Efisiensi Pektinase Amobil	75

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim adalah biomolekul protein yang memiliki fungsi sebagai katalis untuk reaksi biokimia yang terjadi di dalam maupun di luar sel. Enzim dapat mempercepat reaksi antara 10^8 - 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi tanpa enzim. Enzim dapat berfungsi sebagai katalis yang efisien karena dapat menurunkan energi aktivasi dari reaksi kimia [1].

Salah satu enzim yang memiliki banyak manfaat adalah pektinase. Pektinase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat mendegradasi pektin. Pektinase digolongkan menjadi dua kelompok besar yaitu pektinesterase atau polimetil galakturonat esterase yang mendesterifikasi pektin dan enzim yang melakukan depolimerisasi dengan menguraikan ikatan α -1,4 glikosidik. Golongan depolimerase dibedakan menurut jenis substrat (asam pektat, pektin, atau oligo-D-galakturonat), jenis reaksi pemecahan (transeliminasi atau hidrolisis) dan pola degradasi (endo atau ekso) [2]. Pektinase dibagi menjadi pektinase asam dan pektinase alkalin [3]. Pektinase asam banyak digunakan dalam produksi jus buah. Pektinase jenis ini juga penting dalam maserasi dan solubilisasi jus buah [4]. Pektinase alkalin digunakan untuk *retting* dan *degumming* tanaman serat, pabrik tekstil, kopi dan fermentasi teh, industri kertas dan ekstraksi minyak [5].

Kegunaan pektinase sangat bermacam-macam, sehingga perlu diamobilkan untuk meningkatkan efisiensi pemakaian enzim agar dapat dipakai berulang kali. Enzim dapat diamobilisasi dengan melekatkan pada penyangga padat. Penyangga ini dapat berupa butiran, serat, lembaran berongga, tabung ataupun membran semipermeabel. Saat ini penggunaan enzim amobil memperoleh perhatian besar karena amobilisasi membuat enzim menjadi stabil, lebih tahan terhadap serangan protease, dan lebih mudah dipisahkan dari campuran pada akhir reaksi untuk reaksi selanjutnya [6]. Enzim amobil dapat stabil terhadap pH, temperatur dan ion logam jika dibandingkan enzim bebas, sehingga lebih mudah untuk pemulihan dan digunakan kembali [7].

Salah satu metode amobilisasi enzim yang sederhana adalah metode adsorpsi. Metode ini menggunakan permukaan padat untuk menyerap ataupun menempelkan enzim di permukaannya. Padatan yang umum digunakan sebagai matriks pengadsorpsi adalah zeolit, alumina dan silika [8]. Jumlah enzim teradsorpsi dipengaruhi waktu pengocokan dan konsentrasi enzim, semakin lama waktu pengocokan dan semakin besar konsentrasi enzim maka jumlah enzim yang teradsorpsi akan semakin banyak [9].

Penggunaan pasir laut untuk matriks amobilisasi dikarenakan pasir laut sangat mudah didapatkan di Indonesia, karena Indonesia adalah negara maritim yaitu negara yang dikelilingi oleh laut. Pasir ini umumnya dalam bentuk kuarsa [10] dan digolongkan dalam kuarsa α [11], dengan kandungan 70–75% silika, sehingga baik jika dimanfaatkan sebagai matriks amobilisasi. Jika ditinjau dari proses perlakuan pasir laut relatif lebih mudah dan lebih ekonomis jika dibandingkan dengan matriks amobilisasi lainnya. Dalam penelitian ini pasir laut yang digunakan berasal dari Pantai Tanjung Aan.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana pengaruh waktu pengocokan terhadap jumlah pektinase teradsorpsi dan aktivitas pektinase amobil?
2. Bagaimana pengaruh konsentrasi pektinase terhadap jumlah pektinase teradsorpsi dan aktivitas pektinase amobil?
3. Bagaimana efisiensi pektinase amobil saat digunakan secara berulang?

1.3 Batasan Masalah

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

1. Enzim yang digunakan adalah pektinase hasil fraksinasi amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-60%.
2. Amobilisasi dilakukan pada pH 7, temperatur ruang dan waktu pengocokan 1, 2, 3, 4, 5 jam dengan konsentrasi pektinase yang sebanding dengan volume pektinase 1 hingga 5 mL.

3. Pektinase digunakan untuk mendegradasi senyawa pektin.
4. Pengukuran absorbansi pada uji kadar protein dan asam galakturonat dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh waktu pengocokan terhadap jumlah pektinase teradsorpsi dan aktivitas pektinase amobil.
2. Mengetahui pengaruh konsentrasi pektinase terhadap jumlah pektinase teradsorpsi dan aktivitas pektinase amobil.
3. Mengetahui seberapa besar efisiensi penggunaan ulang pektinase amobil.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kondisi optimum yang meliputi waktu pengocokan, konsentrasi pektinase, serta efisiensi penggunaan ulang pektinase amobil dengan metode adsorpsi pada matriks pasir laut. Pektinase amobil diharapkan dapat digunakan secara berulang kali sehingga dapat meminimalisir biaya dalam aplikasinya di berbagai bidang industri, serta dapat memanfaatkan salah satu Sumber Daya Alam yang melimpah sehingga dapat meningkatkan nilai guna dari pasir pantai Tanjung Aan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

Enzim merupakan biokatalisator yang sering digunakan pada berbagai industri seperti produk pertanian, kimia, dan medis [12] yang dapat mempercepat suatu reaksi [13].

Enzim memiliki sifat-sifat yang spesifik dan menguntungkan, yaitu efisien, selektif, dapat dikontrol, proses reaksi tanpa produk samping serta ramah lingkungan [12].

Kemampuan enzim dalam mengkatalisis reaksi kimia dipengaruhi kondisi lingkungan yang meliputi pH, temperatur, waktu inkubasi, dan konsentrasi substrat [14].

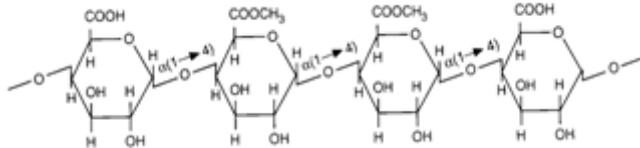
Penggunaan enzim dalam bioteknologi modern semakin berkembang secara cepat. Banyak industri-industri yang telah memanfaatkan kerja enzim, meliputi industri pangan dan non pangan [15].

2.2 Pektinase

Pektinase dapat dihasilkan oleh berbagai jenis mikroorganisme, sel tumbuhan atau sel hewan [16]. Pektinase sering digunakan untuk reaksi biokatalis dalam proses perombakan senyawa pektin dalam industri sari buah ataupun industri teh [4]. Pektinase ini juga sering dimanfaatkan dalam pengolahan limbah cair, pemutihan kertas ataupun pada industri minuman beralkohol dan industri makanan lainnya [17].

Dalam industri jus buah, umumnya pektinase dimanfaatkan untuk membantu proses ekstraksi, maserasi, likuifikasi dan penjernihan jus buah. Manfaat lain yang didapat dari pektinase adalah membantu meningkatkan rasa dari jus buah yang dihasilkan. Banyak sekali penelitian tentang pektinase untuk meningkatkan kualitas jus buah yang dihasilkan. Penelitian mengenai pengaruh pektinase terhadap kualitas jus buah diantaranya pada jus pisang [18], jus sirsak [19], jus jambu biji [20], jus mosambi [21], serta jus sapodila [22].

utama pektin adalah molekul asam galakturonat yang dihubungkan dengan unit-unit yang sama melalui ikatan α -1,4 glikosidik [23].



Gambar 2.1: Struktur pektin

Pektinase ada tiga jenis, yaitu pektin lyase (PL), pektin metil esterase (PME), dan poligalakturonase (PG). Selama proses pematangan, kandungan PME meningkat dan enzim akan memecah gugus metil dari rantai poligalakturonat sehingga pektin menjadi pektat. Ketika gugus metil hilang, maka PL tidak bisa mengenali substratnya. PG akan mengambil alih karena PG dapat mengenali asam galakturonat tanpa gugus metil yang terikat pada pektat [24].

2.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis adalah salah satu bakteri gram positif yang memiliki bentuk seperti batang dan sering ditemukan di tanah dan vegetasi. Bakteri ini hanya memiliki satu molekul DNA yang berisi seperangkat kromosom. DNA yang dimiliki berukuran BP 4214814 (4,2 Mbp) (TIGR CMR) 4,100 kode gen protein [25].

Berikut adalah klasifikasi *Bacillus subtilis* [26]:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Bacillales
Family	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Species	: <i>Bacillus subtilis</i>

Bacillus subtilis membutuhkan kondisi optimum agar dapat tumbuh. Berikut adalah kondisi optimum agar *Bacillus subtilis* dapat tumbuh [27]:

1. *Optical Density* : bakteri ini adalah jenis aerob obligat, makin tinggi *Optical Density* maka makin baik untuk

- pertumbuhan optimalnya. Minimal ialah pada kisaran 2 mg/L
2. Temperatur : temperatur optimum untuk tumbuh bagi *Bacillus subtilis* adalah antara 25–35 °C
 3. pH : pH optimal antara 7–8.

2.4 Isolasi Enzim dan Pemurnian Enzim

Isolasi enzim merupakan pelepasan enzim dari sel yang dilakukan melalui mekanik, fisik, kimiawi dan enzimatik melalui penghancuran membran atau dinding sel [28]. Enzim yang diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain metode ekstraksi, presipitasi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi dan kromatografi [29].

Teknik pemisahan enzim dari sel dan komponen lainnya ditentukan oleh keberadaan enzim tersebut. Ekstraksi dan isolasi enzim ekstraseluler lebih mudah, karena enzim berada di luar sel, sehingga tidak perlu proses pemecahan dinding sel, sedangkan enzim intraseluler adalah enzim yang melekat pada membran dan dilindungi oleh dinding sel yang kuat, sehingga proses pemisahan enzim harus memperhatikan metode-metode pemecahan sel agar enzim dapat dikeluarkan [30]. Proses pengrusakan dan penghancuran dinding sel dapat dilakukan baik secara fisik, mekanis maupun kimia. Pada proses kimiawi menambahkan gula, gliserol, asam, basa maupun bahan organik lainnya. Bahan dipilih yang sesuai untuk menghasilkan pH dimana stabilitas enzim tetap maksimal [31].

Pemurnian enzim adalah proses yang dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan enzim dari pengotornya. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan senyawa lain yang dapat mengganggu sisi aktif enzim [31]. Tahapan awal yang sering digunakan dalam pemurnian enzim adalah pengendapan protein. Pengendapan ini dilakukan dengan mengubah kekuatan ionik, pH, penambahan pelarut organik, polimer serta garam. Garam-garam yang efektif digunakan untuk mengendapkan enzim adalah garam multi anionik seperti sulfat, fosfat, dan sitrat [32]. Pemurnian dengan metode pengendapan dilakukan dengan menambahkan amonium sulfat ke dalam larutan protein sehingga mempengaruhi kelarutan enzim di dalam air karena adanya efek salting out. Amonium sulfat adalah garam dengan kelarutan tinggi, sehingga dapat dengan mudah menarik molekul air

yang mensolvasi protein [33]. Protein dengan berat molekul kecil akan mengendap pada konsentrasi amonium sulfat yang pekat [34].

Setelah enzim diendapkan dengan garam sulfat dan dilarutkan dengan buffer, maka larutan tersebut mengandung residu amonium yang melekat pada enzim. Salah satu cara memisahkan kelebihan garam amonium sulfat dari larutan enzim adalah dengan proses dialisis menggunakan buffer dengan konsentrasi lebih rendah [35]. Penggantian fasa air di luar beberapa kali dapat menurunkan konsentrasi garam sampai jumlah sedikit [36]. Selama proses dialisis, molekul berukuran kecil akan berdifusi melalui kantong dialisis hingga konsentrasi di luar dan di dalam membran semipermeabel sama [35].

2.5 Pasir Laut

Pasir laut terdiri atas campuran magnetit (Fe_2O_3), ilmenit (FeO.TiO_2), limonit ($\text{Fe}_2(\text{OH})_6 \text{Fe}_2\text{O}_3$), biotit [$\text{K}(\text{MgFe})(\text{OH})_2\text{SiO}$], dan feldspar (KAlSi_2O_3) serta zat-zat organik hasil dari pelapukan sisa-sisa hewan dan tumbuh-tumbuhan. Senyawa Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , FeO.TiO_2 merupakan oksida logam yang larut dalam larutan asam [10].

Kandungan utama pasir laut yang berada di daratan benua dan pesisir pantai adalah silika (oksida silikon atau SiO_2). Pasir ini umumnya dalam bentuk kuarsa [10].

Umunya pasir kuarsa berasal dari pelapukan batuan yang mengandung kuarsa [37]. Kuarsa berupa massa padat atau butiran seperti pasir [38]. Pasir laut merupakan kuarsa stabil dalam temperatur di bawah 573°C , sehingga dapat digolongkan dalam kuarsa α [11].

Ditinjau dari strukturnya, kuarsa tergolong mineral dengan struktur jaringan atau tektosilikat [39]. Karakteristik dari kristal kuarsa adalah modifikasi silika yang selalu dikelilingi empat atom oksigen yang akan membentuk struktur tetrahedral. Keempat atom oksigen dari masing-masing tetrahedral saling berhubungan langsung dengan silika yang ada di sebelahnya dan menghasilkan koordinasi lipat empat. Rumus umum dari mineral pasir kuarsa ini adalah $n(\text{SiO}_2)$. Struktur dasar dari kuarsa yang mengandung rantai spiral (heliks) dari tiga atau enam lipat tetrahedral [11].

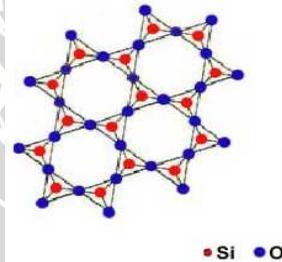
Tabel 2.1: Komposisi kimia pasir laut menurut Departemen Pertambangan dan Industri Sumatra Utara

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

Kuarsa adalah komponen yang sukar larut, sedangkan silika amorf adalah bentuk yang paling mudah larut. Hal ini dapat dilihat berdasarkan deret kelarutan di bawah ini [39]:

Kuarsa < Kristalinit < Opal < Silika amorf

Kuarsa dapat larut dalam larutan NaOH 0,1 M pada temperatur 400 °C dan tekanan 1,7 kBar [40].



Gambar 2.2: Struktur polihedral pasir kuarsa α

Sifat fisik pasir laut [41]:

- Berwarna putih bening tetapi kadang-kadang berwarna lain tergantung oksida pengotornya, misalkan kuning mengandung Fe-oksida atau merah mengandung Cu-oksida
- Kekerasan : 7 (skala Mohs)
- Bentuk Kristal : heksagonal
- Berat jenis : 2,65 g/cm³
- Titik Lebur : 1715 °C

2.6 Silika

Silika merupakan mineral yang tersebar secara luas di alam. Partikel silika kasar umumnya ditemukan dalam bentuk debu dan pasir.

Ada tiga macam kategori mineral silika yaitu kuarsa, tridimit dan krosbalit [39].

Silika tidak reaktif terhadap Cl_2 , H_2 ataupun asam-asam dan sebagian besar logam pada temperatur $25\text{ }^\circ\text{C}$ ataupun pada temperatur yang sedikit lebih tinggi, tetapi silika dapat larut dalam F_2 , larutan HF, hidroksida alkali dan leburan karbonat [42].

2.7 Aktivasi Pasir Laut

Untuk meningkatkan kualitas penyerapan pada pasir laut perlu dilakukan proses aktivasi. Pengaktifan ini dapat dilakukan secara fisik ataupun kimia [43]:

1. Aktivasi Fisik

Pengaktifan secara fisik dapat dilakukan melalui proses pemanasan, untuk menguapkan molekul-molekul air yang terdapat di pasir laut. Proses ini disebut dengan dehidrasi yang bertujuan untuk meningkatkan aktivitas adsorben sebagai penyerap [44].

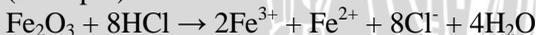
2. Aktivasi Kimia

Pengaktifan ini dibantu dengan penambahan zat kimia. Salah satu zat kimia yang dapat digunakan adalah HCl, dimana akan melarutkan pengotor seperti Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , FeO.TiO_2 [10]. Alumina (Al_2O_3) sebagai salah satu komponen penyusun pasir laut termasuk dalam oksida amfoter yang larut dalam asam dan basa [45], sementara itu silika (SiO_2) bersifat inert terhadap halogen fluorin dan inert terhadap semua asam kecuali asam fluorin (HF) [46].

Reaksi mineral pengotor pada pasir laut dengan HCl [47]:



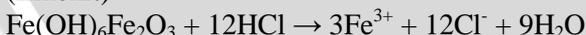
(Feldspar)



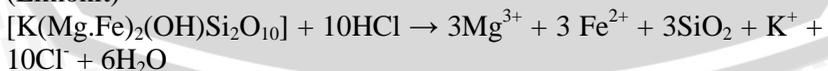
(Magnetit)



(Ilmenit)



(Limonit)



(Biotit)

2.8 Amobilisasi Enzim

Proses dan analisa yang melibatkan enzim umumnya menggunakan metode batch, yaitu dengan mereaksikan substrat dan enzim yang telah dilarutkan dalam air, sehingga enzim akan bercampur dengan substrat [12]. Metode ini memiliki kekurangan karena enzim hanya dapat digunakan sekali saja. Secara teknis proses pemisahan untuk mendapatkan enzim yang aktif di akhir produksi sangatlah sulit. Pada umumnya setelah reaksi selesai, enzim dinonaktifkan dengan pemanasan yang tinggi, pH yang ekstrim, atau cara lain yang dapat menyebabkan enzim terdenaturasi [48].

Enzim yang teramobilisasi didefinisikan sebagai enzim yang secara spesifik berada dalam suatu matriks namun tetap memiliki aktivitas katalitiknya serta dapat digunakan secara berulang atau terus-menerus [49]. Amobilisasi enzim merupakan upaya untuk memisahkan antara enzim dengan produk sehingga terdapat dua sistem selama proses reaksi yaitu antara sistem yang mengandung enzim dan sistem yang mengandung produk, sehingga mengurangi kontaminasi antara enzim dan produk [50].

Enzim teramobilisasi memiliki banyak manfaat, diantaranya adalah [51]:

1. Dapat digunakan kembali selama enzim masih aktif
2. Dapat menjaga aktivitas enzim dari kondisi yang tidak baik
3. Pemisahan dan pembentukkan kembali enzim mudah karena enzim terpisah dari produk
4. Aplikasi dari amobilisasi enzim dalam dunia industri dapat menurunkan biaya operasi.

Pada amobilisasi enzim terdapat beberapa metode, diantaranya adalah metode ikatan dengan matriks yang terdiri dari adsorpsi fisik, ikatan ionik, dan ikatan kovalen, metode pengebakkan dan metode ikatan silang.

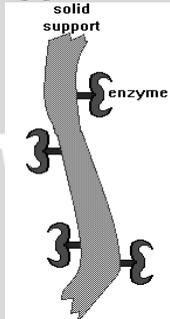
1. Ikatan dengan matriks

Metode dimana enzim diikatkan pada matriks yang tidak larut air, jenis-jenis ikatan dengan matriks yaitu adsorpsi fisik, ikatan ionik, dan ikatan kovalen.

- a. Adsorpsi fisik

Metode ini menggunakan permukaan padat untuk menyerap ataupun menempelkan enzim di permukaannya dengan memanfaatkan bahan padatan sebagai penyerap enzim. Pada metode ini enzim teradsorpsi pada permukaan

matriks dengan ikatan yang lemah. Adsorpsi ini umumnya terjadi pada temperatur rendah, kelebihan dari metode ini adalah aktivitas enzim yang dihasilkan tinggi dan enzim dapat diregenerasi [8].



Gambar 2.3: Enzim terikat secara adsorpsi fisik

b. Ikatan ionik

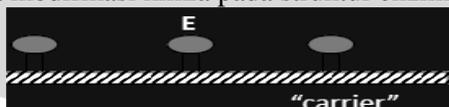
Metode ini terjadi karena adanya ikatan ionik antara protein enzim dengan matriks tidak larut air yang mengandung pusat pertukaran ion, ikatan antara enzim dan matriks sangat mudah terbentuk namun dapat menyebabkan sedikit perubahan pada konformasi dan sisi aktif enzim.



Gambar 2.4: Ikatan ionik antara enzim dan matriks

c. Ikatan kovalen

Metode ini harus dipertimbangkan gugus fungsional yang cocok untuk berikatan kovalen dan penggabungan reaksi enzim. Metode ini dapat mengikat enzim lebih kuat [52], namun metode ini mengakibatkan denaturasi enzim karena adanya modifikasi kimia pada struktur enzim [53].



Gambar 2.5: Ikatan kovalen antara enzim dan matriks

2. Ikatan silang

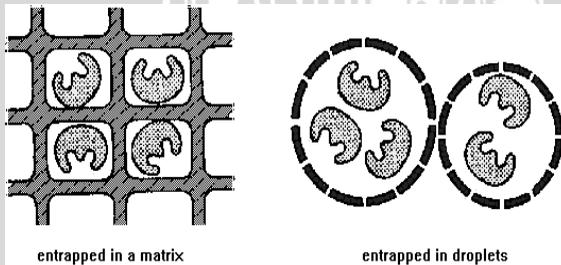
Metode ini terjadi melalui ikatan kimia, namun tidak digunakan untuk matriks yang tidak larut air. Metode ini adalah perpaduan dari metode adsorpsi dan multifungsi pengikatan lain, sehingga akan terbentuk ikatan silang yang lebih baik. Kelebihan dari metode ini adalah tidak mudah larut dan tahan terhadap panas. Kekurangannya adalah relatif mahal, prosedur rumit dan tidak efisien karena beberapa molekul enzim dijadikan sebagai matriks sehingga aktivitasnya akan menurun, situs aktif mengalami modifikasi [54].



Gambar 2.6: Ikatan silang antara enzim dan matriks

3. Penjebakan

Metode ini didasarkan atas lokalisasi dari suatu enzim dalam kisi-kisi dari matriks yang digunakan sebagai media amobilisasi. dan ukuran antara substrat, produk dan enzim. Enzim akan tertahan pada matriks, sementara substrat dan produk bergerak bebas. Kelebihan dari metode ini adalah konsentrasi enzim akan lebih tinggi dan mudah untuk memisahkan antara enzim yang satu dengan yang lain secara fisik, kekurangannya yaitu hilangnya aktivitas enzim yang dihasilkan selama polimerisasi enzim yang terjebak dalam matriks.



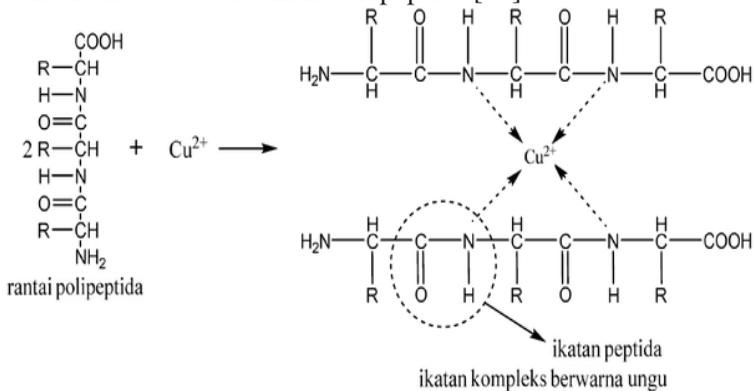
Gambar 2.7: Enzim terikat secara penjebakan

2.9 Adsorpsi

Adsorpsi dapat diartikan proses penyerapan suatu zat oleh zat lain yang hanya terjadi pada permukaan [55]. Adsorben adalah zat yang memiliki sifat mengikat molekul pada permukaan dan sifat ini menonjol pada padatan berpori. Syarat yang penting untuk adsorben adalah memiliki luas permukaan besar serta memiliki pori dan tidak berinteraksi dengan adsorbat [56]. Adsorpsi fisik terjadi akibat adanya interaksi antara adsorben dengan adsorbat akibat adanya Gaya Van Der Waals atau ikatan hidrogen [57]. Pada adsorpsi ini adsorbat tidak diikat secara kuat sehingga mudah diganti adsorbat lain. Adsorpsi fisik biasanya bersifat reversibel (dapat balik), dapat dilepas kembali akibat adanya penurunan tekanan dan konsentrasi larutan. Adsorpsi fisik berlangsung cepat, reversible dan membutuhkan panas yang kecil, kira-kira 15-20 kkal/mol (62-84 kJ/mol) [58].

2.10 Kadar Protein Enzim

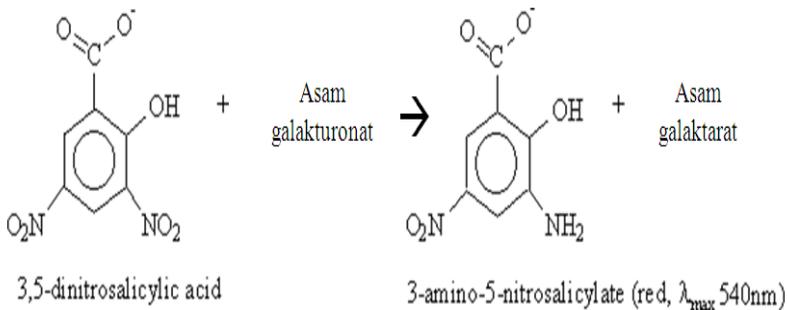
Protein dapat ditetapkan kadarnya dengan metode biuret. Prinsip dari metode biuret ini adalah ikatan peptida dapat membentuk senyawa kompleks berwarna ungu dengan penambahan garam kupri dalam suasana basa [59]. Reaksi biuret terdiri dari campuran protein dengan sodium hidroksida (berupa larutan) dan tembaga sulfat. Warna violet adalah hasil dari reaksi ini. Reaksi ini positif untuk dua atau lebih ikatan peptida [60].



Gambar 2.8: Reaksi antara rantai polipeptida dengan Cu^{2+}

2.11 Aktivitas Enzim

Metode DNS atau TRS (*Total Reducing Sugar*) digunakan untuk mengukur gula pereduksi dengan teknik kolorimetrik. Glukosa merupakan gula pereduksi karena memiliki gugus aldehida sehingga dapat dioksidasi menjadi gugus karboksil. Bentuk hemiasetal siklik glukosa berada dalam kesetimbangan dengan bentuk aldehida rantai terbuka. Gugus aldehida pada C1 glukosa akan dioksidasi oleh asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi gugus karboksil dan menghasilkan 3-amino-5-nitrosalisilat, reaksi ini berlangsung pada kondisi basa dengan temperatur 90-100 °C. Senyawa ini memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 540 nm bila diukur absorbansinya dengan spektrofotometer [61].



Gambar 2.9: Reaksi antara 3,5-dinitrosalisilat dengan asam galakturonat

2.12 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah:

1. Kondisi optimum amobilisasi pektinase dapat diperoleh pada kisaran waktu pengocokan 1-5 jam dan dipengaruhi oleh jumlah pektinase teradsorpsi serta aktivitas pektinase amobil.
2. Kondisi optimum amobilisasi pektinase dapat diperoleh pada konsentrasi pektinase yang sebanding dengan volume pektinase 1 hingga 5 mL dan dipengaruhi oleh jumlah pektinase teradsorpsi serta aktivitas pektinase amobil.
3. Pektinase amobil dapat digunakan sebanyak lima kali pengulangan.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

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

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni bakteri jenis *Bacillus subtilis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang dan pasir laut 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 bahan yang mempunyai kualitas pro analisis yang didapat dari produsen Merck antara lain, 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, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, glukosa anhidrat, padatan BaCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_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 dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, inkubator (Heraus tipe B 50 Memmert), autoklav (Tipe LS-C35L), jarum ose, mortar, cawan porselen, tanur (Nabertherm), sentrifuse dingin (Denley), shaker (Edmund Buhler SM 25 24B), *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, alumunium foil, kertas *Whatman* no. 40, kapas steril, pH universal, corong vakum buchner dan penangas air (Memmert W 200), ayakan 120 dan 150 mesh.

3.3 Tahapan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu RAL (Rancangan Acak Lengkap), terdiri dari tahapan proses isolasi dan amobilisasi pektinase dari dua variasi, yaitu variasi pada waktu pengocokan (1, 2, 3, 4, 5) jam dan variasi konsentrasi pektinase (0,943; 1,887; 2,830; 3,774 dan 4,717) mg/mL dan ditambah dengan buffer sirat fosfat 0,2 M pH 7 hingga volume total 5 mL. Tahapan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut :

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

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan akuades steril

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

3.4.2 Pembuatan media padat

Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah media padat agar miring untuk peremajaan kultur murni *Bacillus subtilis* yang terdiri dari 0,25 g pepton, 0,02 g KH_2PO_4 , 0,03 g CaCl_2 , 0,14 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan 0,03 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g *yeast extract* dan 0,5 g pektin, kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia, setelah itu dikondisikan pada pH 7 dengan ditambahkan larutan buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7 sebanyak 5 mL, ditambahkan 1,5 g *bacto agar*. Larutan dibuat sebanyak 100 mL, diaduk dan dipanaskan hingga mendidih lalu dipipet 4 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditutup kapas dan disterilkan dalam autoklav pada 121 °C, tekanan 15 psi selama 20 menit. Tabung reaksi yang berisi media diangkat dari autoklav dan diletakkan pada posisi miring.

3.4.3 Pembuatan media cair

Media pertumbuhan *Bacillus subtilis* untuk menghasilkan pektinase dibuat dengan menimbang 1,25 g pepton, 0,1 g KH_2PO_4 , 0,15 g CaCl_2 , 0,7 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan 0,15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g *yeast extract* dan 2,5 g pektin. Dimasukkan dalam gelas kimia, setelah itu dikondisikan pada pH 7 dengan ditambah larutan buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7 sebanyak 25 mL. Larutan dibuat sebanyak 500 mL. Campuran diaduk dan dipanaskan hingga mendidih lalu dipipet 100 mL dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian ditutup kapas dan disterilkan dalam autoklav pada temperatur 121 °C, tekanan 15 psi, selama 20 menit dan disimpan dalam lemari pendingin.

3.4.4 Peremajaan biakan *Bacillus subtilis*

Biakan *Bacillus subtilis* digoreskan pada media padat agar miring dengan ujung jarum ose secara aseptik, yaitu dengan mendekatkan mulut tabung pada nyala api saat menggoreskan jarum ose, tabung reaksi ditutup dengan kapas steril, diinkubasi pada 35 °C selama 48 jam. Disimpan dalam lemari pendingin dan setiap bulannya diremajakan.

3.4.5 Pembuatan kurva pertumbuhan

Satu tabung subkultur bakteri hasil peremajaan ditambah dengan 5 mL akuades kemudian bakteri di ose agar terpisah dari media padat kemudian dipipet sebanyak 1 mL dan ditanam dalam 100 mL media pertumbuhan, kemudian diinkubasi pada inkubator goyang dengan kecepatan 125 rpm pada temperatur ruang selama dua hari. Setiap selang waktu dua jam diambil 1 mL dan diencerkan sampai volume 10 mL, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pertumbuhan sel pada panjang gelombang 620 nm menggunakan *spectronic 20*. Setelah itu dibuat kurva hubungan waktu inkubasi dengan absorbansi dan diperoleh kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis*.

3.4.6 Pembuatan inokulum

Satu tabung subkultur biakan murni *Bacillus subtilis* yang berumur satu hari diambil sebanyak tiga ose dan dibiakkan dalam 25 mL media cair kemudian diinkubasi dalam inkubator goyang dengan kecepatan 125 rpm pada temperatur ruang selama fase logaritmik (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 ruang selama awal fase stasioner (24 jam) menggunakan shaker dengan kecepatan 125 rpm, ditambahkan buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7 sebanyak 12,5 mL, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan putar 3000 rpm selama 20 menit pada temperatur 4 °C. Supernatan yang merupakan ekstrak kasar pektinase kemudian dipisahkan dari endapannya dan diukur volumenya.

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 8,550 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dicampurkan dalam 75 mL larutan ekstrak kasar pektinase sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ larut semua. Disentrifugasi pada temperatur 4 °C dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang didapat ditambah dengan 19,650 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lalu disentrifugasi kembali. Endapan yang terbentuk dilakukan dialisis dengan menambahkan 10 mL buffer sitrat fosfat pH 7 dan dimasukkan dalam kantong selofan. Direndam dalam 100 mL buffer sitrat fosfat 0,07 M pH 7 dalam gelas kimia 250 mL sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik pada temperatur rendah selama tiga jam. Larutan buffer perendam diganti dengan buffer perendam yang baru sampai semua garam terpisah. Untuk mengetahui bahwa dialisis selesai, diuji dengan cara 5 mL buffer perendam diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah 1 mL larutan HCl 0,1 M, ditambah lima tetes larutan BaCl_2 0,1 M. Apabila tidak ada endapan, dialisis dihentikan. Larutan enzim yang diperoleh untuk selanjutnya dilakukan uji kadar protein dan aktivitas bebasnya.

3.4.9 Pembuatan kurva baku larutan kasein

Ditimbang sebanyak 1,002 g kasein, dilarutkan dalam 50 mL akuades dalam gelas kimia, ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 M, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas, dikocok hingga homogen sehingga didapat larutan stok kasein 10000 ppm. Dipipet masing-masing (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mL) lalu dimasukkan ke dalam 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 kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, ditambahkan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7 dan diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 30 menit. Sebelum mengukur absorbansi larutan baku ditentukan terlebih dahulu panjang gelombang maksimumnya. Hasil pengukuran absorbansi dibuat kurva baku dengan memplot data konsentrasi kasein (ppm)

pada sumbu x dan absorbansinya pada sumbu y, sehingga didapatkan persamaan regresi kurva baku kasein.

3.4.10 Uji kadar protein awal

Penentuan kadar protein dilakukan dengan penambahan reagen Biuret. Sebanyak 2 mL enzim, ditambah 8 mL reagen Biuret, 2 mL larutan kasein 5000 ppm, diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 50 °C. Diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum kasein (559 nm) sehingga kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva baku kasein. Sebagai blanko dipipet 2 mL akuades dan ditambah 8 mL reagen Biuret serta 2 mL buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7 selanjutnya diperlakukan sama seperti di atas.

3.4.11 Pembuatan kurva baku gula pereduksi

Disiapkan 5 buah tabung reaksi, masing-masing diisi dengan larutan baku glukosa 1 mL dengan konsentrasi 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppm, ditambah 1 mL buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7 dan 2 mL akuades, ditambahkan 2 mL reagen DNS, mulut tabung ditutup dengan alumunium foil dan dipanaskan pada 100 °C selama 15 menit, kemudian didinginkan dengan air mengalir hingga dingin. Dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambah akuades hingga tanda batas. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm dan kurva baku dibuat dengan memplot data konsentrasi gula pereduksi pada sumbu x dan absorbansinya pada sumbu y, sehingga didapatkan persamaan regresi linier.

3.4.12 Uji aktivitas pektinase bebas

Disiapkan campuran yang terdiri dari 1 mL substrat pektin 1%, 1 mL buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7, 1 mL pektinase dan 1 mL akuades dimasukkan dalam tabung reaksi dan mulut tabung ditutup dengan alumunium foil kemudian diinkubasi pada temperatur 35 °C selama 50 menit, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan pada temperatur 100 °C selama 15 menit, kemudian didinginkan dengan air mengalir hingga dingin. Dimasukkan dalam labu ukur

25 mL dan ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

Satu unit aktivitas enzim (U) diartikan sebagai 1µgram dari asam galakturonat yang dilepaskan tiap menitnya per mL enzim, sedangkan untuk aktivitas pektinase amobil volume enzim (mL) diganti dengan berat (gram) enzim amobil.

$$AE = \frac{x \times V \times fp}{p \times q} \times \frac{Mr \text{ galakturonat}}{Mr \text{ glukosa}} \quad (3.1)$$

Keterangan:

AE	= Aktivitas enzim (Unit)
V	= Volume total sampel dalam percobaan pada tiap tabung (mL)
x	= Konsentrasi gula pereduksi (ppm)
q	= Waktu reaksi (menit)
p	= Volume ekstrak kasar pektinase (mL) untuk pektinase bebas dan untuk pektinase amobil menggunakan massa pektinase amobil (gram)
fp	= Faktor pengenceran
Mr galakturonat	= 194,14 g/mol
Mr glukosa	= 180 g/mol

3.4.13 Amobilisasi enzim

3.4.13.1 Preparasi matriks pasir

Pertama-tama pasir ditumbuk halus, kemudian diayak dengan ayakan 120 mesh. Padatan yang lolos diayak kembali dengan ayakan 150 mesh. Pasir laut yang tertahan pada ayakan 150 mesh digunakan sebagai matriks amobilisasi, dihomogenkan dan dicuci dengan akuades, setelah itu pasir disaring dan dikeringkan dalam oven pada temperatur 105 °C.

3.4.13.2 Aktivasi matriks pasir

Pasir ditimbang sebanyak 10 g dan direndam dalam 200 mL larutan HCl 0,4 M pada temperatur ruang selama empat jam dengan kecepatan pengocokan 100 rpm. Pasir hasil perendaman disaring dengan kertas *Whatman* no. 40 dan dicuci dengan akuades hingga air pencuci netral. Pasir laut dikeringkan pada temperatur 105 °C hingga

berat konstan. Pasir laut hasil aktivasi dikalsinasi pada temperatur 500 °C selama empat jam.

3.4.13.3 Penentuan kondisi optimum waktu pengocokan

Enzim hasil pemurnian dipipet sebanyak 2 mL, ditambah buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7 hingga volume 5 mL sehingga didapatkan konsentrasi pektinase 1,887 mg/mL. Larutan enzim dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL yang telah berisi 0,1 g pasir laut yang telah diaktivasi. Campuran diinkubasi dalam shaker pada temperatur ruang dengan kecepatan 100 rpm selama (1, 2, 3, 4, 5) jam agar diketahui waktu pengocokan optimum dari enzim yang teradsorpsi pada pasir. Hasil amobilisasi disaring dengan kertas *Whatman* no. 40 sehingga dihasilkan filtrat dan endapan. Filtrat diuji kadar protein sisanya sesuai prosedur 3.4.14 sedangkan untuk endapan yang tersaring diuji aktivitasnya sesuai dengan prosedur 3.4.15. Jumlah pektinase teradsorpsi dan aktivitas pektinase amobil dapat ditentukan berdasarkan persamaan (3.1). Untuk mengetahui waktu pengocokan optimum, dibuat kurva hubungan antara waktu pengocokan dan jumlah pektinase teradsorpsi serta kurva hubungan antara waktu pengocokan dan aktivitas pektinase amobil.

3.4.13.4 Penentuan kondisi optimum konsentrasi pektinase

Tahapan amobilisasi pada variasi konsentrasi enzim dilakukan seperti langkah amobilisasi variasi waktu pengocokan, perbedaannya terletak pada konsentrasi pektinase yang digunakan yaitu (0,943; 1,887; 2,830; 3,774; 4,717) mg/mL, selanjutnya campuran diinkubasi selama waktu pengocokan optimum dalam shaker dengan kecepatan 100 rpm. Hasil amobilisasi disaring dengan kertas *Whatman* no. 40 sehingga dihasilkan filtrat dan endapan. Filtrat diuji kadar protein sisanya sesuai prosedur 3.4.14 sedangkan untuk endapan yang tersaring diuji aktivitasnya sesuai dengan prosedur 3.4.15. Jumlah pektinase teradsorpsi dan aktivitas pektinase amobil dapat ditentukan berdasarkan persamaan (3.1). Untuk mengetahui konsentrasi pektinase optimum, dibuat kurva hubungan antara konsentrasi pektinase dan jumlah pektinase teradsorpsi serta kurva hubungan antara konsentrasi pektinase dan aktivitas pektinase amobil.

3.4.14 Uji kadar protein sisa

Kadar protein yang tidak teradsorp ditentukan dengan cara 2 mL filtrat dari enzim yang tidak teramobilkan ditambahkan 2 mL larutan kasein 5000 ppm dan 8 mL reagen Biuret, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 50 °C. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum kasein (559 nm) sehingga kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva baku kasein.

3.4.15 Uji aktivitas pektinase amobil

Untuk uji aktivitas pektinase amobil disiapkan campuran yang terdiri dari 1 mL substrat pektin 1%, 1 mL buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7, 0,1 g pektinase amobil dan 2 mL akuades didalam tabung reaksi dan mulut tabung ditutup dengan alumunium foil kemudian diinkubasi pada temperatur 35 °C selama 50 menit, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan pada 100 °C selama 15 menit, kemudian didinginkan dengan air mengalir hingga dingin. Dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambah akuades hingga tanda batas. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh, pada persamaan regresi linier kurva baku gula pereduksi sehingga dapat diketahui berapa konsentrasi gula pereduksi kemudian dikonversikan ke dalam persamaan (3.1).

3.4.16 Efisiensi penggunaan pektinase amobil

Pektinase amobil pada kondisi optimum duji aktivitasnya selama lima kali penggunaan. Pektinase amobil yang telah digunakan pada uji yang pertama disaring, endapannya digunakan untuk pengujian yang kedua dan seterusnya. Pektinase amobil masih efisien digunakan apabila aktivitasnya menunjukkan hasil di atas 50% [62].

3.5 Analisa Data

Data tentang penentuan pektinase amobil dianalisis dengan uji F menggunakan Pola Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan perlakuan

diulang 3 kali yang dapat dilihat pada lampiran. Bila F hitung lebih besar dari F tabel (α db) maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 5%).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi dan Aktivasi Pasir laut

Dalam penelitian ini pasir laut sebelum digunakan sebagai matriks amobilisasi pektinase perlu dilakukan aktivasi agar pengotor dapat larut.

Mengacu pada jenis-jenis pengotor yang terdapat pada pasir laut maka dapat diperkirakan adanya proses aktivasi dengan HCl akan melarutkan oksida Al, oksida Fe dan oksida Ti selama proses aktivasi, sedangkan oksida Si tidak dapat larut dalam HCl, dan digunakan sebagai matriks amobilisasi. Melalui pelarutan mineral-mineral pengotor tersebut maka akan memperluas permukaan pasir laut, sehingga memungkinkan enzim untuk dapat masuk dan tertahan di dalam rongga pori.

Aktivasi dilakukan dengan penambahan HCl 0,4 M dan dikocok selama empat jam dengan kecepatan 100 rpm agar pendistribusian ion-ion maksimal. Dari 10 g pasir laut yang telah diaktivasi menghasilkan massa pasir sebanyak 5,2 g. Proses selanjutnya adalah kalsinasi, perlu dilakukan kalsinasi agar kristal (hidrat) dalam butiran dapat hilang, selain itu membentuk oksida SiO₂ dengan melakukan pemanasan pada temperatur 500 °C selama empat jam, temperatur ini digunakan karena temperatur masih di bawah temperatur leleh pasir yaitu 1715 °C, sehingga tidak mengubah atau merusak struktur dari pasir dan menghasilkan massa pasir sebanyak 4,8 g.

4.2 Penentuan Kondisi Optimum Amobilisasi Pektinase Menggunakan Matriks Pasir

Pektinase yang digunakan diperoleh dari *Bacillus subtilis* dengan metode pemurnian enzim pengendapan bertingkat dengan tingkat kejenuhan 20-60%, kemudian didialisis menggunakan kantong selofan, setelah didapatkan pektinase murni dilakukan uji kadar protein awal dengan reagen Biuret dan aktivitas dengan reagen DNS, dari uji tersebut didapatkan hasil kadar protein pektinase bebas 4,717 mg/mL serta aktivitas pektinase bebas 109,8 unit.

4.2.1 Penentuan waktu pengocokan optimum

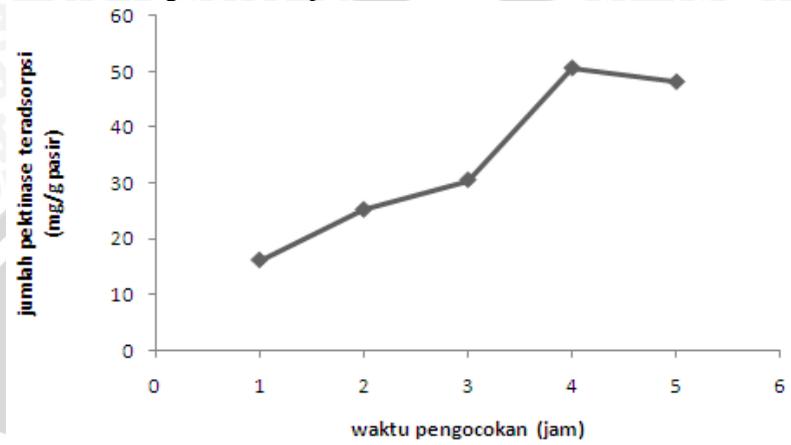
Untuk menentukan kondisi optimum dari pektinase dapat ditentukan berdasarkan waktu pengocokan. Waktu pengocokan adalah waktu yang dibutuhkan enzim untuk berinteraksi dengan matriks pengadsorpsi pada saat proses amobilisasi berlangsung. Pengocokan akan menyebabkan laju difusi pektinase menuju pasir akan semakin cepat, sehingga kesetimbangan adsorpsi juga akan cepat tercapai. Waktu pengocokan optimum merupakan waktu yang paling baik untuk pektinase melakukan proses adsorpsi ke dalam pasir, semakin lama waktu pengocokan maka akan meningkatkan jumlah pektinase teradsorpsi hingga mencapai titik jenuh. Titik jenuh akan tercapai saat laju adsorpsi sama dengan laju desorpsi. Pada penelitian ini untuk waktu pengocokan optimum digunakan variasi waktu yang berbeda-beda, konsentrasi pektinase (1,887 mg/mL), massa matriks pasir (0,1 g) dan temperatur ruang dengan kondisi yang sama untuk tiap variasi waktu pengocokan. Waktu pengocokan optimum didapat dari jumlah pektinase teradsorpsi maksimum dan aktivitas maksimum.

Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa terjadi peningkatan jumlah pektinase yang diadsorpsi secara signifikan seiring dengan peningkatan waktu pengocokan 1-4 jam (Gambar 4.1), hal ini terjadi dimungkinkan karena probabilitas kontak antara pektinase dengan pasir semakin tinggi, sehingga pektinase yang teradsorpsi semakin banyak hingga mencapai kesetimbangan. Penurunan terjadi pada waktu pengocokan 5 jam, dimungkinkan karena adsorpsi secara fisik yang bersifat reversibel dan ikatan antara pektinase dengan pasir cukup lemah sehingga pektinase mudah lepas.

Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa waktu pengocokan optimum terjadi pada 4 jam, karena pada waktu tersebut telah terjadi kesetimbangan dengan menghasilkan jumlah pektinase teradsorpsi maksimum 50,606 mg/g pasir. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa waktu pengocokan berpengaruh terhadap massa pektinase yang teradsorpsi, karena $F_{hitung} (182,409) > F_{tabel} (3,480)$. Dari uji BNT 5% juga menunjukkan bahwa pada waktu pengocokan antara 4-5 jam tidak berbeda nyata.

Interaksi yang terjadi antara pasir dengan pektinase adalah ikatan hidrogen yang diakibatkan adanya kontak antara atom oksigen pada pasir (Si-O-Si) dengan atom H dari gugus amino pada rantai samping residu asam amino penyusun pektinase ($-NH_2$), selain

itu ikatan hidrogen juga dapat terjadi antara atom oksigen pada pasir (Si-O-Si) dengan atom H pada residu asam amino (-COOH).

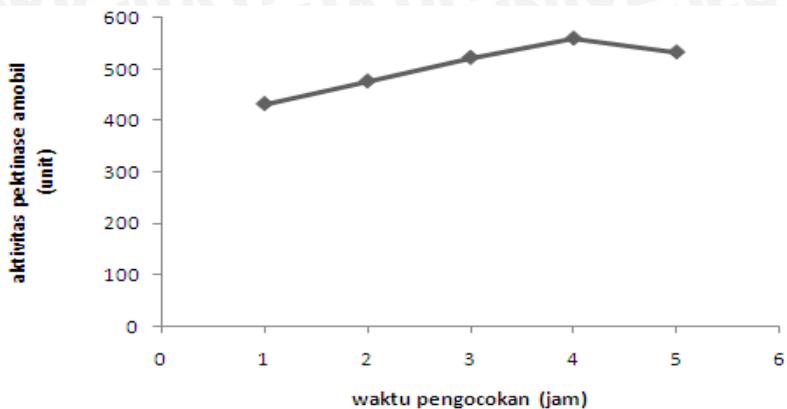


Gambar 4.1: Kurva hubungan antara waktu pengocokan terhadap jumlah pektinase teradsorpsi

Pektinase amobil dapat digunakan untuk reaksi degradasi senyawa pektin yaitu dengan memecah ikatan α -(1,4) glikosidik pada pektin sehingga menjadi monomer asam D-galakturonat. Aktivitas dari pektinase dapat ditentukan dengan menghitung absorbansi dan mengkonversi ke dalam persamaan (3.1).

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pada jumlah pektinase yang teradsorpsi maksimum akan menghasilkan aktivitas pektinase amobil yang maksimum (Gambar 4.2), hal ini dimungkinkan karena banyaknya jumlah pektinase yang teradsorpsi sehingga aktivitasnya juga akan semakin tinggi, penurunan pektinase teradsorpsi pada waktu pengocokan 5 jam juga menyebabkan turunnya aktivitas dari pektinase amobil.

Dari hasil penelitian, dapat disimpulkan pada variasi waktu pengocokan didapatkan aktivitas optimum pada waktu pengocokan 4 jam sebesar 560,5 unit, hal ini berbanding lurus dengan jumlah pektinase teradsorpsi. Waktu pengocokan berpengaruh terhadap aktivitas pektinase amobil, hal ini diperkuat pada perhitungan uji F dimana $F_{hitung} (2154,7) > F_{tabel} (3,480)$.

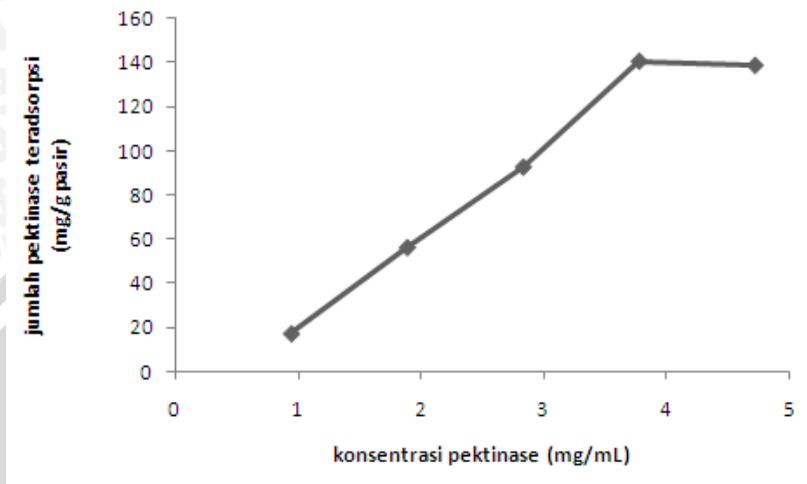


Gambar 4.2: Kurva hubungan antara waktu pengocokan terhadap aktivitas pektinase amobil

4.2.2 Penentuan konsentrasi pektinase optimum

Adsorpsi adalah proses penyerapan suatu zat oleh zat lain dimana hanya terjadi pada permukaan zat tersebut. Adsorpsi akan mencapai kesetimbangan jika laju adsorpsi sama dengan laju desorpsinya. Proses adsorpsi dapat terjadi jika potensial kimia pektinase pada fase ruah lebih tinggi dibandingkan dengan potensial kimia pektinase pada permukaan pasir, semakin tinggi perbedaan potensial antara keduanya akan mengakibatkan laju difusi yang semakin tinggi. Konsentrasi pektinase optimum didapat dari jumlah enzim teradsorpsi maksimum dan aktivitas maksimum.

Konsentrasi pektinase akan berpengaruh terhadap jumlah pektinase teradsorpsi dalam matriks pasir, semakin besar konsentrasi pektinase maka akan menyebabkan jumlah pektinase yang teradsorpsi semakin banyak dan akan konstan pada titik tertentu. Penentuan konsentrasi pektinase optimum digunakan variasi konsentrasi 0,943; 1,887; 2,830; 3,774; 4,717 mg/mL, massa matriks pasir (0,1 g) dan pengocokan selama 4 jam yang diperoleh dari waktu pengocokan optimum dan temperatur ruang.



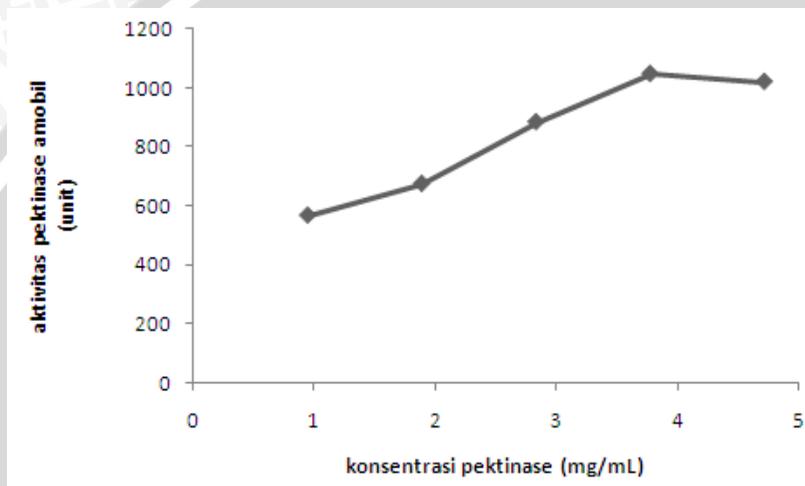
Gambar 4.3: Kurva hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap jumlah pektinase teradsorpsi

Dari hasil penelitian terjadi peningkatan jumlah pektinase teradsorpsi terjadi pada konsentrasi pektinase 0,943 hingga 3,774 mg/mL (Gambar 4.3), hal ini dapat terjadi dimungkinkan karena laju difusi pektinase ke permukaan pasir semakin tinggi, sehingga akan menyebabkan meningkatnya jumlah pektinase yang teradsorpsi. Penurunan terjadi pada konsentrasi 4,717 mg/mL, hal ini dimungkinkan ada pektinase yang terlepas dari pasir karena proses adsorpsi telah mencapai titik jenuh. Konsentrasi optimum terjadi pada 3,774 mg/mL, karena pada konsentrasi tersebut telah terjadi kesetimbangan.

Konsentrasi optimum ini menghasilkan jumlah pektinase yang teradsorpsi sebanyak 140,680 mg/g pasir. Hasil uji statistik menunjukkan konsentrasi pektinase berpengaruh terhadap jumlah pektinase teradsorpsi, karena $F_{hitung} (2183,657) > F_{tabel} (3,480)$. Penurunan ini tidak begitu berpengaruh karena sesuai dengan hasil perhitungan uji statistika pada uji BNT 5% yang ditunjukkan bahwa nilai yang tidak berbeda nyata antara konsentrasi 3,774 dan 4,717 mg/mL.

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pada jumlah pektinase yang teradsorpsi maksimum maka akan menghasilkan aktivitas pektinase amobil yang maksimum, hal ini dikarenakan

banyaknya jumlah pektinase yang teradsorpsi sehingga aktivitasnya juga akan semakin tinggi. Penurunan terjadi pada konsentrasi 4,717 mg/mL (Gambar 4.4), hal ini sesuai dengan jumlah pektinase yang teradsorpsi, dimana penurunan jumlah pektinase yang teradsorpsi juga akan menyebabkan turunnya aktivitas pektinase amobil.



Gambar 4.4: Kurva hubungan antara konsentrasi pektinase terhadap aktivitas pektinase amobil

Pada variasi konsentrasi didapatkan aktivitas optimum pada konsentrasi 3,774 mg/mL dengan aktivitas 1049,9 unit, hal ini berbanding lurus dengan jumlah pektinase teradsorpsi. Konsentrasi pektinase berpengaruh terhadap aktivitas pektinase amobil, hal ini diperkuat pada perhitungan uji F dimana $F_{hitung} (14859,9) > F_{tabel} (3,480)$.

4.3. Efisiensi Penggunaan Pektinase Amobil

Pektinase bebas hanya dapat digunakan sebanyak satu kali dalam reaksi, sedangkan pektinase amobil dapat digunakan beberapa kali, namun juga terdapat efisiensi penggunaannya. Pemakaian pektinase amobil dapat diketahui dengan mengukur aktivitas. Semakin sering pektinase amobil digunakan maka akan menurunkan aktivitasnya.

Penurunan aktivitas ini dimungkinkan karena terjadi proses denaturasi saat dilakukan inkubasi, serta ada pektinase yang lepas mengingat ikatan pada adsorpsi fisik ini cukup lemah. Dari hasil efisiensi penggunaan pektinase amobil didapatkan bahwa aktivitas setelah lima kali pengulangan sebesar 50,90%, sehingga pektinase dapat digunakan sebanyak lima kali pengulangan karena aktivitas masih di atas 50% [62]. Hasil ini cukup berbeda jika dibandingkan pektinase dari *A. aculeatus* yang diamobilisasi dengan metode anion-exchange manik dengan ukuran partikel 525 μm (WBA Dowex Marathon, USA), dimana penggunaan ulang dapat dilakukan sebanyak lima kali dengan aktivitas 93,50% [63]. Efisiensi pektinase amobil berpengaruh terhadap aktivitas pektinase amobil, hal ini diperkuat pada perhitungan uji F dimana $F_{\text{hitung}} (325,2) > F_{\text{tabel}} (3,480)$.

Tabel 4.1: Persentase aktivitas dari efisiensi pektinase amobil

Pengulangan (kali)	Aktivitas (unit)	Persen Aktivitas (%)
1	1112,8	100,00
2	1002,5	90,00
3	878,5	78,94
4	649,8	58,39
5	566,4	50,90

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

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

1. Kondisi optimum adsorpsi pektinase dicapai pada waktu pengocokan 4 jam menghasilkan pektinase teradsorpsi 50,606 mg/g pasir dan aktivitas 560,5unit.
2. Kondisi optimum adsorpsi pektinase dicapai pada konsentrasi pektinase 3,774 mg/mL menghasilkan pektinase teradsorpsi 140,680 mg/g pasir dan aktivitas 1049,9unit.
3. Amobilisasi pektinase pada matriks pasir dapat digunakan sebanyak lima kali pengulangan dengan aktivitas 50,90%.

5.2. Saran

Untuk mengetahui kestabilan dari pektinase amobil maka perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap kestabilan pektinase pada temperatur penyimpanan dan pH.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Poedjiadi, A., dan Supriyanti F. M. T., 2006, **Dasar-Dasar Biokimia**, UI-Press, Jakarta.
- [2] Megawati, 2005, **Kajian Kemampuan Produksi Pektinase (Poligalakturonase) oleh *Aspergillus niger* Hasil Isolasi dari Perkebunan Kakao**, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [3] Naidu, G. S. N., dan Panda T., 1998, **Production of Pectolytic Enzymes**, *Journal Bioprocess Engineering*, Vol. 19, hal. 355-361.
- [4] Jayani, R. S., Saxena S., dan Gupta R., 2005, **Microbial Pectinolytic Enzyme**, *Journal Process Biochemistry*, No. 9, Vol. 40, hal. 2931-2944.
- [5] Hoondal G. S., Tiwari R. P., Tewari R., Dahiya N., dan Beg Q. K., 2002, **Microbial Alkaline Pectinases and Their Industrial Applications**, *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol 59, hal. 409-418.
- [6] Masyithah dan Zuhrina, 2005, **Pemodelan Numerik Reaksi Enzimatik Imobilisasi**, Media Publikasi Karya Ilmiah Teknik Kimia.
- [7] Lin, Y., Liu X., Shen Y., Chen Y., Chen S., 1996, **Researches on Enzyme Properties of the Immobilized Pectinase**, Fujian Institute of Subtropical Botany, *Journal of Fuzhou University Natural Science*. Vol. 5.
- [8] Suklha, S. S., Dorris K. L., Suklha A., dan Margrave J. L., 2003, **Adsorption of Chromium from Aqueous Solution by Maple Sawdust**, *Journal Haz Mater.*, Vol. 12, hal. 1-3.
- [9] Agustiawan, H., 2011, **Amobilisasi Lipase dari *Mucor miehei* Menggunakan Matriks Oxidized Polypropylene (OPP)**,

Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang.

- [10] Sax, N. I., dan Lewis R. J., 1993, **Hawley's : Condensed Chemical Dictionary**, 12th ed., Van Norstand Reinhold Company, New York.
- [11] Dutch, S., 2002, **Quartz Structure**. Natural and Applied Science, University of Wisconsin, Green Bay.
- [12] Lin, J., Zhu L., Su Y., Huang Z., Zeng Z., Liang J., 2008, **The Application of Pectinase from *Aspergillus niger* Immobilized to Chitosan in Clarification of Loquat Juice**, Department of Environment & Life Sciences, Putian University, *Journal Food and Fermentation Industries*, Vol. 17.
- [13] Sumarsih S., 2002, **Uji Aktivitas Lipolitik Beberapa Bakteri Hasil Isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak dan Produksi Lipase dari Strain Terpilih**. JIPTUNAIR. Surabaya.
- [14] Chibata, I., 1978, **Imobilized Enzyme, Research and Development**. John Wiley and Sons Inc, New York.
- [15] Reiss, T., 2004, **Performance EU on Member States In Biotechnology**. *Science and Public Policy Vol. 31, hal. 5*. <http://www.ingentaconnect.com>, diakses tanggal 5 Oktober 2012.
- [16] Sofia., 2008, **Pengadaan Bahan Pustaka**, Angkasa Raya, Bandung.
- [17] Haki, G. D., dan Rakshit S. K., 2003, **Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes**, *Journal Bioresource Technology*, Vol. 89, hal. 17–34.
- [18] Lee, W. C., Yusof S., Hamid N. S. A., dan Baharin S., 2005, **Optimizing Condition for Enzymatic Clarification of**

Banana Juice Using Response Surface Methodology (RSM), *Journal of Food Engineering*, Vol. 50, hal. 65-71.

- [19] Yusof, S. dan Ibrahim N., 1994, **Quality of Soursop Juice Afer Pectinase Enzyme Treatment**, *Journal Food Chemistry*, Vol. 50, hal. 83-88.
- [20] Brasil, I. M., Maia G. A., dan Figueiredo W., 1995, **Physical-Chemical Changes During Extraction and Clarification of Guava Juice**, *Journal Food Chemistry*. No. 4, Vol. 54, hal. 383-386.
- [21] Rai, P., Majumdar G. C., Gupta D. S., dan S De., 2004, **Optimizing Pectinase Usage in Pretreatment of Mosambi Juice for Clarification by Response Surface Methodology (RSM)**, *Journal of Food Engineering*, No. 3, Vol. 64, hal. 397-403.
- [22] Sin, H. N., Yusof S., Hamid N. S. A dan Rahman R. A., 2005, **Optimization of Enzymatic Clarification of Sapodilla Juice Using Response Surface Methodology (RSM)**, *Journal of Food Engineering*, Vol. 3.
- [23] Garna, H., Mabon N., Wathélet B., dan Paquot M., 2004, **New Method For a Two-Step Hydrolysis and Chromatographic Analysis of Pectin Neutral Sugar Chains**. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264895, diakses tanggal 5 Oktober 2012.
- [24] Lourens, K., dan Patrice P., 2000, <http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0411enzymes.php3>, diakses tanggal 5 Oktober 2012.
- [25] Schaechter, M., dan Ingraham F. C., 2006, **Microbe**, ASM Press, Washington DC.
- [26] Graumann, P., 2007, **Bacillus: Cellular and Molecular Biology**. Caister Academic Press.

- [27] Nandy , Subir K., dan Venkatesh K. V., 2008, **Effect of Carbon and Nitrogen on the Cannibalistic Behavior of *Bacillus subtilis***, *Journal Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 151, hal 2-3.
- [28] Murray, R. K., Granner D. K., Mayes P. A., dan Rodwell V. W., 2003, **Harper's Biochemistry**, 25th ed., Appleton and Lange, America.
- [29] Judoamidjojo, R. M., Darwis A. A., dan Sa'id E. G., 1992, **Teknologi Fermentasi**. Rajawali Press, Jakarta.
- [30] Suhartono, 1989, **Enzim dan Bioteknologi**, PAU, Bioteknologi, IPB, Bogor.
- [31] Othmer, K., 1987, **Encyclopedia of Chemical Technology**, John Wiley dan Sons Inc, New York.
- [32] Scopes, R. K., 1994, **Protein Purification: Principle and Practice** Spinger Veriag, New York.
- [33] Anthony, 2008, **Investigating Protein**, <http://www.unilever.com>, diakses tanggal 1 November 2012.
- [34] Voet, D., dan Voet J., 1990, **Biochemistry**, 4th ed., The Maxmillan Company, London.
- [35] Sorensen, H., Sorensen C., Bjergaard dan Michaelson S., 1999, **Chromatograph and Capillary Electrophoresis in Food Analysis**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, hal. 77-88, 324.
- [36] Lehninger, A. L., 1997, **Dasar-dasar Biokimia**, edisi 1, Erlangga, Jakarta.
- [37] Kusumodoyo, B., 1986, **Mineral Dasar**, Binacipta, Bandung.

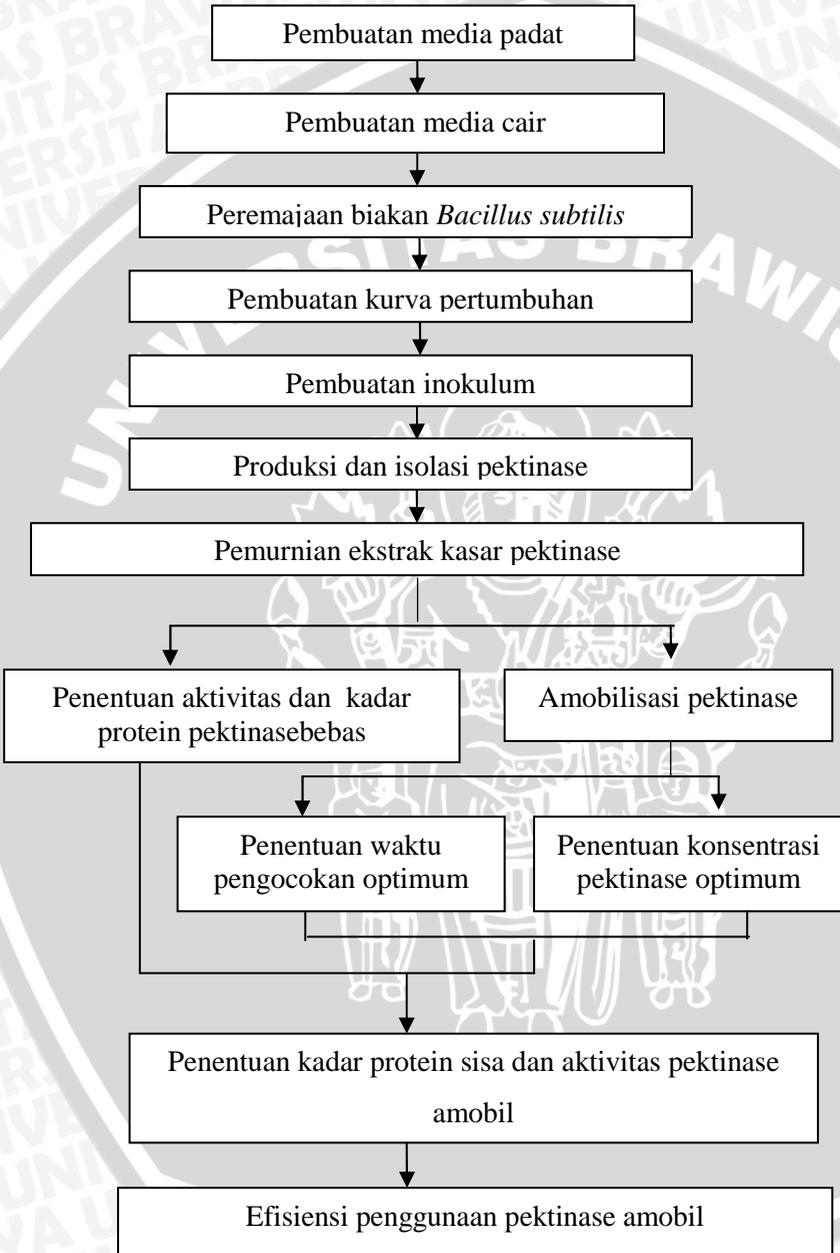
- [38] Dainith, J., 1981, **Kamus Kimia**, Erlangga, Jakarta.
- [39] Tan, K. H., 1991, **Dasar-dasar Kimia Tanah**. UGM Press, Yogyakarta.
- [40] West, A. R., 1984, **Solid State Chemistry and its Application**. John Willey and Sons, New York.
- [41] Sekardarumudi, 1999, **Bahan Galian Industri**. Gadjah Mada. Jogjakarta.
- [42] Cotton, F. A., dan Wilkinson G., 1989, **Kimia Anorganik Dasar, Alih Bahasa Sahati Suharto**. Universitas Gadjah Mada Press, Yogyakarta.
- [43] Anwar, K. P., 1985, **Prospek Pemakaian Zeolit bayah sebagai Penyerap NH_4^+ dalam Limbah, Laporan Teknik Pengembangan No. 69**. Dirjen Pertambangan Umum PPTM, Bandung.
- [44] Hatiaman, E, K., 2002, **Studi Pengaruh Jenis Fosfat Terhadap Fosfatasi Zeolit Alam Turen**. *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Brawijaya, Malang.
- [45] Syukri, 1999, **Kimia Dasar Jilid 3**, IKIP, Padang.
- [46] Sugiharto, 2004, **Dasar-dasar Pengolahan Limbah**. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- [47] Ariyati, D., 2004, **Pengaruh Kondisi Adsorpsi Terhadap Nilai Adsorpsi Cr(VI) oleh Pasir Laut Hasil Aktivasi**. *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- [48] Sarah, A., 2001, **Immobilization and Stabilization of Papain on Chelating Sepharose**, *Electronic Journal Biotechnology*, Catolica de Velparaaiso Chile.

- [49] Hiratsuka, A., Fujisawa K., dan Muguruma H., 2008, **Amperometric Biosensor Based on Glucose Dehydrogenase and Plasma-polymerized Thin Films**, *Journal Analytical Sciences*, Vol. 24, hal. 483–486.
- [50] Chaplin, J., dan Buckle G, B., 1990, **Enzyme Immobilization Technology**. AVI Publishing. New York.
- [51] Bayramol, G., Akgol S., Bulut A., Denizli A., dan Yakup A. M., 2003, **Covalent Immobilization of Invertase Into a Reactive Film Composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate**, *Journal Biochemical Engineering*. Vol. 14, hal. 117-126.
- [52] Milosavic., Prodanovic N. R., Javanovic S., Novakovic I, dan Vujcic Z., 2005, **Preparation and Characterization of Two Types of Covalently Immobilized Amyloglucosidase**, *Journal Serb. Shem. Soc.* No. 5, Vol. 70, hal.713-719.
- [53] Dey, G. B., dan Banerjee R., 2003, **Immobilization of Amylase Produced by *Bacillus circulans* GRS 313**, *Journal Braz. Arch. Biotechnology*, No. 2, Vol. 46, hal. 167-176.
- [54] Xie, T., Wang A., Huang L., Haifeng L., Chen Z., Qiuyan W., dan Xiaopu, Y., 2009, **Recent Advance in The Support and Technology Used in Enzyme Immobilization**, *African, Journal Biotech*, No. 19, Vol. 8, hal. 4724-4733.
- [55] Larry, D. B., Judkins J. F., dan Weand B. L., 1992, **Process Chemistry for Water and Wastewater Treatment**. Prentice Hall, Inc., New Jersey.
- [56] Bernasconi, G., 1995, **Teknologi Kimia**, edisi 2, PT. Pradnya Paramitha. Jakarta.
- [57] Castellan, G. M., 1984, **Physical Chemistry**, 6th ed, Addison Wisley Publishing Company, London.

- [58] Parker, S. P., 1984, **Dictionary of Chemistry**. Mc Graw Hill Book Company. Singapore.
- [59] Apriyantono, A., Fardias D., Puspitasari N. L., Sedamawati, dan Budiyanto S., 1989, **Analisis Pangan, PAU Pangan dan Gizi**, IPB Press. Jakarta.
- [60] Carpette, 2005, **An Introduction to Practical Biochemistry**, Mc Graw Hill BookCompany, Great Britany.
- [61] Harrow, 1954, **Textbook of Biochemistry**, 6thed., Saunders Company. USA.
- [62] Roosdiana, A., Setianingsih T., Mardiana D., dan Suratmo, 2009, **Karakterisasi Lipase yang Diimobilisasi dalam Aluminosilikat untuk Sintesis Laktosil Palmitat**, *Indonesian Journal Chemistry*, No. 2, Vol. 9, hal. 201–205.
- [63] Demir, N., Acar J., Sarioğlu K., dan Mehmet M., 2001, **The Use of Commercial Pectinase in Fruit Juice Industry. Part 3: Immobilized Pectinase for Mash Treatment**, *Journal of Food Engineering*, Vol. 47, hal. 275-280.

LAMPIRAN

Lampiran A. Alur Penelitian



Lampiran B. Preparasi Larutan

B.1 Larutan asam sitrat 0,1 M

Ditimbang 2,10 g asam sitrat kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia 100 mL, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.2 Larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M

Ditimbang 2,84 g Na_2HPO_4 , dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia 100 mL, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.3 Larutan buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7

Sebanyak 100 mL larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL, dimasukkan pengaduk magnetik. Elektroda pH dipasang dan dicelupkan dalam larutan. Ditambah asam sitrat sedikit demi sedikit hingga pH 7.

B.4 Larutan buffer sitrat fosfat 0,07 M pH 7

Diambil 35 mL larutan buffer sitrat fosfat 0,2 M, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.5 Larutan NaOH 0,1 M

Ditimbang 0,40 g NaOH, dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia 100 mL, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.6 Larutan stok kasein 10.000 ppm

Ditimbang 1,00 g kasein, kemudian dilarutkan dengan akuades 50 mL dalam gelas kimia 100 mL, ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 M hingga kasein larut, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.7 Larutan stok kasein

Disiapkan 9 buah labu ukur 10 mL, masing-masing labu ukur diisi dengan larutan stokkasein 10.000 ppm sebanyak 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen, sehingga diperoleh konsentrasi 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, dan 9.000 ppm.

B.8 Larutan NaOH 10%

Ditimbang 10 g NaOH, dilarutkan dengan akuades sebanyak 50 mL dalam gelas beaker 100 mL, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.9 Pereaksi biuret

Ditimbang 0,15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 0,60 g $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, dilarutkan dengan akuades sebanyak 30 mL dalam gelas kimia 100 mL, ditambahkan 30 mL NaOH 10% sambil diaduk, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.10 Larutan HCl 0,1 M

Dipipet 0,96 mL larutan HCl 37%, dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL yang telah berisi akuades, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.11 Larutan HCl 0,4 M

Dipipet 3,84 mL larutan HCl 37%, dimasukkan dalam gelas kimia 100 mL yang telah berisi akuades, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.12 Larutan BaCl₂ 0,1 M

Ditimbang 2,44 g BaCl₂, dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia 100 mL, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.13 Larutan stok glukosa 5.000 ppm

Ditimbang 0,500 g glukosa anhidrat, dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia 100 mL, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.14 Larutan stok gula pereduksi

Larutan stok glukosa 5000 ppm dipipet berturut-turut sebanyak 1, 2, 3, 4, 5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditandabatkan dengan akuades sehingga didapatkan larutan gula pereduksi dengan konsentrasi 500, 100, 15000, 2000 dan 2500 ppm.

B.15 Larutan NaOH 1%

Ditimbang 1,00 g NaOH, dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia 100 mL, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.16 Reagen DNS

Ditimbang 1 g asam dinitrosalisilat, ditambah 200 mg kristalin fenol, 50 mg sodium sulfite kemudian dilarutkan dalam 100 mL NaOH 1% menggunakan stirer.

B.17 Substrat pektin

Sebanyak 1,00 g *citrus pectin* dilarutkan dalam 100 mL akuades menggunakan labu ukur 100 mL dan ditambahkan buffer sitrat fosfat pH 7.



Lampiran C. Perhitungan Preparasi Larutan

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

Larutan asam sitrat 0,1 M dibuat sebanyak 100 mL (Mr. $C_6H_8O_7 = 210,14$ g/mol)

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

$$= 0,01 \text{ mol}$$

$$\text{massa } C_6H_8O_7 = \text{mol } C_6H_8O_7 \times \text{Mr. } C_6H_8O_7$$

$$= 0,01 \text{ mol} \times 210,14 \text{ g/mol}$$

$$= 2,10 \text{ g}$$

Jadi, asam sitrat yang harus ditimbang untuk membuat larutan asam sitrat 0,1 M adalah 2,10 g.

C.2 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)

$$\text{mol } Na_2HPO_4 = [Na_2HPO_4] \times V_{\text{larutan}}$$

$$= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L}$$

$$= 0,02 \text{ mol}$$

$$\text{massa } Na_2HPO_4 = \text{mol } Na_2HPO_4 \times \text{Mr. } Na_2HPO_4$$

$$= 0,02 \text{ mol} \times 142 \text{ g/mol}$$

$$= 2,84 \text{ g}$$

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

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

Untuk mendapatkan larutan buffer dengan pH yang diharapkan, dibuat dengan mencampur larutan asam sitrat dan larutan dinatrium hidrogen fosfat berdasarkan persamaan dibawah ini:

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

Misalkan untuk membuat larutan buffer sitrat-fosfat dengan pH 7, larutan dinatrium hidogen fosfat 0,2 M yang dicampurkan sebanyak 100 mL, maka volume larutan asam sitrat yang ditambahkan adalah:

$$\begin{aligned} \text{pKa}_{\text{Asam sitrat}} &= 4,62 \\ 7 &= 4,62 + \log \frac{(100 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mmol/mL})}{(V \text{ mL} \times 0,1 \text{ mmol/mL})} \\ 2,38 &= \log \frac{20}{0,1V} \\ 239,883 &= \frac{20}{0,1V} \\ V &= 0,834 \text{ mL} \end{aligned}$$

C.4 Larutan NaOH 0,1 M

Larutan NaOH 0,1 M dibuat sebanyak 100 mL (Mr. NaOH = 40 g/mol)

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

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

Jadi, NaOH yang harus ditimbang untuk membuat larutan NaOH 0,1 M adalah 0,40 g.

C.5 Larutan BaCl₂ 0,1 M

Larutan BaCl₂ 0,1 M dibuat sebanyak 100 mL (Mr.BaCl₂ = 244,24 g/mol)

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

$$\begin{aligned}\text{massaBaCl}_2 &= \text{mol BaCl}_2 \times \text{Mr.BaCl}_2 \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 244,20 \text{ g/mol} = 2,442 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi, BaCl₂ yang harus ditimbang untuk membuat larutan BaCl₂ 0,1 M adalah 2,442 g.

C.6 Larutan HCl 0,4 M

Larutan HCl 0,4 M dibuat dari larutan HCl 37% (37 g/100 mL)

$$\begin{aligned}M &= \frac{\text{massa}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{100} \\ &= \frac{37}{35,5} \times 10 = 10,423 \text{ M}\end{aligned}$$

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

$$10,423 \text{ M} \times V_1 = 0,4 \text{ M} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 3,84 \text{ mL}$$

C.7 Larutan HCl 0,1 M

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

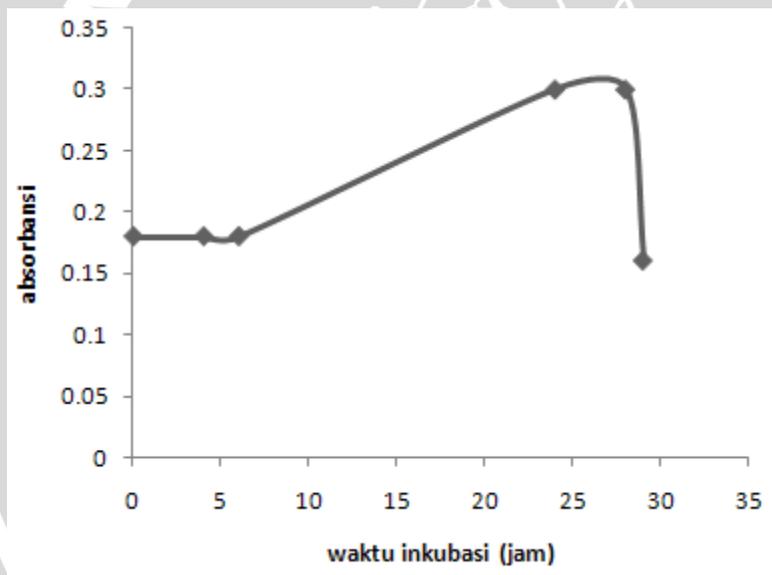
$$10,423 \text{ M} \times V_1 = 0,1 \text{ M} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,96 \text{ mL}$$

Lampiran D. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

Tabel D.1: Pembuatan kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis*

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

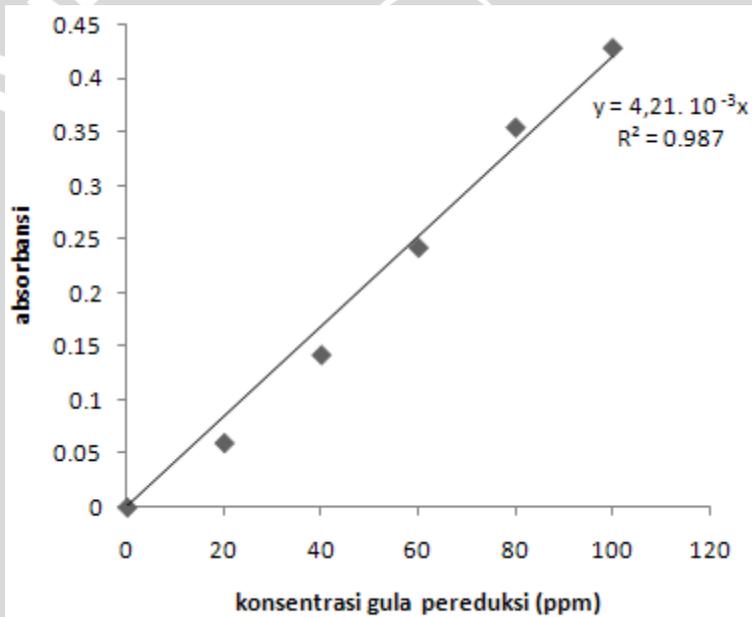


Gambar D.1: Kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis*

Lampiran E. Pembuatan Kurva Baku

Tabel E.1: Pembuatan kurva baku gula pereduksi

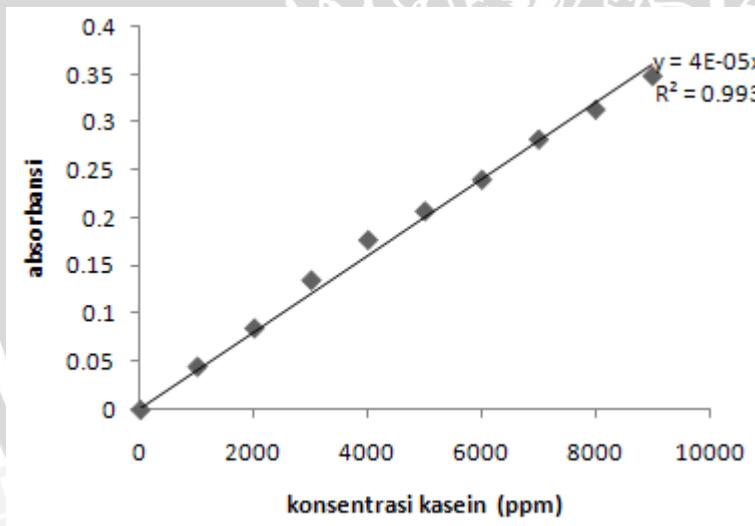
Konsentrasi gula pereduksi (ppm)	Absorbansi
0	0
20	0,060
40	0,142
60	0,242
80	0,354
100	0,428



Gambar E.1: Kurva baku gula pereduksi

Tabel E.2: Pembuatan kurva bakukasein λ 559 nm

Konsentrasi kasein (ppm)	Absorbansi
0	0
1000	0,045
2000	0,085
3000	0,135
4000	0,177
5000	0,207
6000	0,240
7000	0,282
8000	0,313
9000	0,348



Gambar E.2: Kurva baku kasein

Lampiran F. Pemurnian Pektinase

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 pektinase (Lampiran F.2).

Contoh : fraksi 0-20%, maka perlu ditambahkan 114 g amonium sulfat pada 1000 mL pektinase, sehingga pada 75 mL ekstrak kasar pektinase adalah :

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

$$w = 8,550 \text{ g}$$

fraksi 20-60%, maka perlu ditambahkan 262 g amonium sulfat pada 1000 mL pektinase, sehingga pada 75 mL ekstrak kasar pektinase adalah :

$$\frac{262 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{w}{75 \text{ mL}}$$

$$w = 19,650 \text{ g}$$

w = banyaknya amonium sulfat yang ditambahkan

F.2 Massa Amonium Sulfat (gram) 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 H₂O).

Lampiran G. Perhitungan Kadar Protein dan Aktivitas Pektinase Bebas

G.1 Perhitungan kadar protein pektinase bebas

Perhitungan kadar protein yaitu melalui pengkonversian nilai absorbansi pektinase pada persamaan kurva bakukasein menggunakan persamaan regresi kurva baku kasein.

Diketahui persamaan kasein :

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

Dimana : Y = Absorbansi

X = Konsentrasi

Volume pektinase yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan stokkasein 5000 ppm yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

$$\text{Konsentrasi total} = \text{Konsentrasi protein enzim} + \text{kasein 5000 ppm}$$

Contoh perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,387 adalah :

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

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

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

$$9675 \text{ ppm} - 5000 \text{ ppm} = 4675 \text{ ppm} = 4,675 \text{ mg/mL}$$

Tabel G.1: Kadar protein enzim bebas

Absorbansi	Konsentrasi pektinase (mg/mL)	Rata-rata (mg/mL)
0,387	4,675	4,717
0,389	4,725	
0,390	4,750	

Sehingga kadar protein pektinase bebas :

$$= 4,717 \text{ mg/mL} \times 2 \text{ mL}$$

$$= 9,434 \text{ mg}$$

Konsentrasi pektinase sebelum amobilisasi untuk 2 mL/5 mL adalah

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

$$5 \text{ mL}$$

G.2 Perhitungan aktivitas pektinase bebas

Perhitungan aktivitas yaitu melalui pengkonversian nilai absorbansi pektinase pada persamaan kurva baku gula pereduksi menggunakan persamaan regresi kurva baku gula pereduksi.

Diketahui persamaan gula pereduksi :

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

Dimana : Y = Absorbansi

X = Konsentrasi

Setelah diketahui konsentrasinya dikonversi ke dalam persamaan unit aktivitas:

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

Keterangan:

AE = Aktivitas Enzim (Unit)

X = Konsentrasi gula pereduksi (ppm)

V = Volume total sampel dalam percobaan pada tiap tabung (mL)

q = Waktu reaksi (menit)

p = Volume ekstrak kasar pektinase (mL)

fp = Faktor pengenceran

Mr galakturonat = 194,14 gram/mol

Mr glukosa = 180 gram/mol

Contoh perhitungan aktivitas dengan absorbansi 0,854 adalah :

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

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

$$AE = \frac{202,850 \times 6 \times 4,17}{1 \times 50} \times \frac{194,14}{180} = 109,7 \text{ unit}$$

Tabel G.2: Aktivitas pektinase bebas

Absorbansi	Konsentrasi pektinase	Aktivitas (unit)	Rata-rata (unit)
0,854	202,850	109,7	109,8
0,854	202,850	109,7	
0,855	203,088	109,9	

Lampiran H. Penentuan Waktu Pengocokan Optimum

H.1 Jumlah pektinase setelah amobilisasi pada variasi waktu pengocokan

Tabel H.1: Volume pektinase setelah amobilisasi pada variasi waktu pengocokan

Konsentrasi pektinase (mg/mL)	Waktu pengocokan (jam)	Volume pektinase (mL)			Volume pektinase rata-rata (mL)
		I	II	III	
1,887	1	2,300	2,300	2,300	2,300
1,887	2	2,300	2,200	2,300	2,267
1,887	3	2,200	2,200	2,200	2,200
1,887	4	2,100	2,100	2,200	2,133
1,887	5	2,000	2,100	2,200	2,100

Volume pektinase yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan stokkaseinyang 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 linearkasein.

Untuk perhitungan jumlah pektinase setelah amobilisasi pada waktu pengocokan 1 jam dengan nilai absorbansinya 0,222 adalah:

Diketahui persamaan regresi:

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

$$0,222 = 4.10^{-5}X$$

$$X = 5550 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total = Konsentrasi pektinase + konsentrasi kasein
5000 ppm

Konsentrasi pektinase= 5550 ppm – 5000 ppm
= 550 ppm
= 0,550 mg/mL

Diketahui volume pektinase setelah amobilisasi adalah 2,300 mL sehingga jumlah pektinase setelah amobilisasi :

$$0,550 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 2,300 \text{ mL} = 7,590 \text{ mg}$$

Tabel H.2: Jumlah pektinase setelah amobilisasi

Konsentrasi pektinase (mg/mL)	Waktu pengocokan (jam)	Absorbansi			Jumlah pektinase setelah amobilisasi (mg)			Rata-rata (mg)
		I	II	III	I	II	III	
1,887	1	0,222	0,223	0,223	7,590	7,935	7,935	7,820
1,887	2	0,220	0,220	0,221	6,800	6,800	7,140	6,913
1,887	3	0,219	0,220	0,219	6,270	6,600	6,270	6,380
1,887	4	0,214	0,213	0,214	4,480	4,160	4,480	4,373
1,887	5	0,215	0,215	0,214	4,725	4,725	4,410	4,620

H.2 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 H.3: Jumlah pektinase yang teradsorpsi pada pasir

Waktu pengocokan (jam)	Jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 gram pasir (mg)			Rata-rata (mg)	Standart deviasi	Persen deviasi
	I	II	III			
1	1,844	1,499	1,499	1,614	0,199	12,356
2	2,634	2,634	2,294	2,521	0,196	7,794
3	3,164	2,834	3,164	3,054	0,191	6,243
4	4,954	5,274	4,954	5,061	0,185	3,652
5	4,709	4,709	5,024	4,814	0,182	3,779

H.3 Aktivitas pektinase variasi waktu pengocokan

Tabel H.4: Absorbansi aktivitas pada variasi waktu pengocokan

Waktu pengocokan (jam)	Absorbansi		
	I	II	III
1	0,335	0,338	0,337
2	0,372	0,370	0,372
3	0,406	0,409	0,408
4	0,435	0,437	0,439
5	0,416	0,415	0,417

Aktivitas dapat dihitung dengan cara :

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

$$0,335 = 4,21 \cdot 10^{-3} X$$

$$X = 79,572 \text{ ppm}$$

$$AE = \frac{79,572 \times 6 \times 4,17}{0,1 \times 50} \times \frac{194,14}{180}$$

$$= 429,637 \text{ unit}$$

Tabel H.5: Aktivitas pektinase pada variasi waktu pengocokan

Waktu pengocokan (jam)	Aktivitas (unit)			Rata-rata (unit)	Standart deviasi	Persen deviasi
	I	II	III			
1	429,6	433,5	432,2	431,8	1,959	0,454
2	477,1	474,5	477,1	476,2	1,481	0,311
3	520,7	524,5	523,3	522,8	1,959	0,375
4	557,9	560,5	563,0	560,5	2,565	0,458
5	533,5	532,2	534,8	533,5	1,282	0,240

Lampiran I. Penentuan Konsentrasi Pektinase Optimum

I.1 Jumlah pektinase sebelum amobilisasi

Diketahui bahwa jumlah pektinase bebas setelah pemurnian yaitu 4,717mg/mL, sehingga jumlah pektinase sebelum amobilisasi dalam 5 mL 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 :

$$W (1 \text{ mL}) \text{ pektinase} = 4,717 \text{ mg/mL pektinase} \times 1 \text{ mL} = 4,717 \text{ mg}$$

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 :

$$\frac{4,717 \text{ mg/mL} \times 1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} = 0,9434 \text{ mg/mL}$$

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

I.2 Jumlah pektinase setelah amobilisasi pada variasi konsentrasi pektinase

Tabel I.1: Volume pektinase setelah amobilisasi pada variasi konsentrasi pektinase murni

Konsentrasi pektinase (mg/mL)	Volume pektinase (mL)			Volume rata-rata (mL)
	I	II	III	
0,943	2,100	2,200	2,100	2,133
1,887	2,200	2,300	2,200	2,233
2,830	2,200	2,300	2,300	2,267
3,774	2,400	2,400	2,400	2,400
4,717	2,300	2,400	2,400	2,367

Volume pektinase yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan stokkasein 5000 ppm 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 0,213 adalah:

Diketahui persamaan regresi:

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

$$0,213 = 4.10^{-5}X$$

$$X = 5325 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total = Konsentrasi Pektinase + konsentrasi Kasein 5000 ppm

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi pektinase} &= 5325 \text{ ppm} - 5000 \text{ ppm} \\ &= 325 \text{ ppm} \\ &= 0,325 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Diketahui volume pektinase setelah amobilisasi adalah 2,400mL sehingga jumlah pektinase setelah amobilisasi :

$$0,325 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 2,400 \text{ mL} = 4,680 \text{ mg}$$

Tabel I.2: Jumlah Pektinase Setelah Amobilisasi

Konsentrasi pektinase (mg/mL)	Absorbansi			Jumlah pektinase setelah amobilisasi (mg)			Rata-rata
	I	II	III	I	II	III	
0943	0,209	0,210	0,209	2,880	3,200	2,880	2,987
1,887	0,211	0,211	0,212	3,685	3,685	4,020	3,797
2,830	0,214	0,214	0,215	4,760	4,760	5,100	4,873
3,774	0,213	0,214	0,213	4,680	5,040	4,680	4,800
4,717	0,227	0,227	0,228	9,585	9,585	9,940	9,703

I.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.

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

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

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

Tabel I.3: Jumlah pektinase yang teradsorpsi pasir

Jumlah pektinase sebelum amobilisasi (mg)	Jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 gram pasir (mg)			Rata-rata (mg)	Standart deviasi	Persen deviasi
	I	II	III			
4,717	1,837	1,517	1,837	1,730	0,185	10,677
9,434	5,749	5,749	5,414	5,637	0,193	3,431
14,151	9,391	9,391	9,051	9,278	0,196	2,116
18,868	14,188	13,828	14,188	14,068	0,208	1,477
23,585	14,000	14,000	13,645	13,882	0,205	1,476

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

Tabel I.4: Massa pasir setelah amobilisasi

Konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Massa pektinase setelah amobilisasi (mg)
0,943	0,220
1,887	0,260
2,830	0,300
3,774	0,320
4,717	0,325

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

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

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

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

W_c = massa pasir setelah amobilisasi (gram)

Contoh :

Perhitungan jumlah pektinase setelah amobilisasi dalam 0,1 g (pektinase+pasir) dengan W_c sebesar 0,300 gram :

$$= \frac{0,1 \text{ gram}}{0,300 \text{ gram}} \times 9,278 \text{ mg} = 3,093 \text{ mg}$$

Tabel I.5: Jumlah pektinase dalam pasir + pektinase

Konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Jumlah pektinase (mg) dalam 0,1 gram pasir	Jumlah pektinase (mg) dalam 1 g pasir (mg/gram)
0.943	0.787	7.865
1.887	2.168	21.682
2.830	3.093	30.926
3.774	4.396	43.963
4.717	4.271	42.713

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 1,653 mg dan volume filtrat 2,067 mL :

$$\text{Konsentrasi sisa} = \frac{3,797 \text{ mg}}{2,233 \text{ mL}} = 1,700 \text{ mg/mL}$$

Tabel I.6: Konsentrasi pektinase sisa

Konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Jumlah pektinase setelah amobilisasi (mg)	Volume filtrat (mL)	Konsentrasi sisa pektinase (mg/mL)
0,943	2,987	2,133	1,400
1,887	3,797	2,233	1,700
2,830	4,873	2,267	2,150
3,774	4,800	2,400	2,000
4,717	9,703	2,367	4,099

I.5 Aktivitas pektinase pada variasi konsentrasi pektinase

Tabel I.7: Absorbansi aktivitas variasi konsentrasi pektinase

Konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Absorbansi		
	I	II	III
0,943	0,553	0,552	0,553
1,887	0,653	0,654	0,654
2,830	0,756	0,756	0,757
3,774	0,819	0,818	0,819
4,717	0,798	0,797	0,798

Aktivitas dapat dihitung dengan cara:

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

$$0,798 = 4,21 \cdot 10^{-3} X$$

$$X = 189,549 \text{ ppm}$$

$$AE = \frac{189,549 \times 6 \times 4,17}{0,1 \times 50} \times \frac{194,14}{180}$$

$$= 1023,4 \text{ unit}$$

Tabel I.8: Aktivitas variasi konsentrasi pektinase

Konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Aktivitas (unit)			Rata-rata (unit)	Standart deviasi	Persen deviasi
	I	II	III			
0,943	570,7	564,2	566,9	567,3	3,228	0,569
1,887	673,3	674,6	678,4	675,4	2,670	0,395
2,830	881,1	884,9	891,3	885,8	5,183	0,585
3,774	1050,3	1049,1	1050,4	1049,9	0,740	0,072
4,717	1023,4	1022,1	1023,4	1023,0	0,740	0,072

Lampiran J. Efisiensi Pektinase Amobil

Tabel J.1: Absorbansi efisiensi

Konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Absorbansi		
	I	II	III
3,774	0,865	0,894	0,844
3,774	0,788	0,804	0,753
3,774	0,671	0,688	0,696
3,774	0,509	0,506	0,505
3,774	0,445	0,443	0,437

Aktivitas dapat dihitung dengan cara:

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

$$0,865 = 4,21 \cdot 10^{-3} X$$

$$X = 205,463 \text{ ppm}$$

$$AE = \frac{205,463 \times 6 \times 4,17}{0,1 \times 50} \times \frac{194,14}{180}$$

$$= 1109,361 \text{ unit}$$

Tabel J.2: Aktivitas efisiensi

Konsentrasi awal pektinase (mg/mL)	Aktivitas (unit)			Rata- rata (unit)	Persen efisiensi (%)
	I	II	III		
3,774	1109,4	1146,6	1082,4	1112,8	100,00
3,774	1010,6	1031,1	965,7	1002,5	90,08
3,774	860,6	882,4	892,6	878,5	78,94
3,774	652,8	648,9	647,7	649,8	58,39
3,774	570,7	568,1	560,5	566,4	50,90

Lampiran K. Analisa Statistik

K.1 Jumlah pektinase yang teradsorpsi dalam pasir

K.1.1 Pada variasi waktu pengocokan

Tabel K.1: Analisis Pengaruh Waktu Pengocokan Terhadap Jumlah pektinase teradsorpsi pada pasir

Waktu pengocokan (jam)	Jumlah pektinase teradsorpsi (mg)			Total (mg)	Rata-rata (mg)
	I	II	III		
1	1.844	1.499	1.499	4.842	1.614
2	2.634	2.634	2.294	7.562	2.521
3	3.164	2.834	3.164	9.162	3.054
4	4.954	5.274	4.954	15.182	5.061
5	4.709	4.709	5.024	14.442	4.814
total	17.305	16.950	16.935	51.190	17.063

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{2620,416}{15} = 174,694$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$$
$$= 201,575 - 174,694 = 26,881$$

- b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right] - FK$$
$$= 603,636/3 - 174,694 = 26,517$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 26,881 - 26,517 = 0,363$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$a. \text{KT Perlakuan} = \frac{JKP}{\text{dB perlakuan}} = \frac{26,517}{4} = 6,629$$

$$b. \text{KT Galat percobaan} = \frac{JKG}{\text{dB percobaan}} = \frac{0,363}{10} = 0,036$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{6,629}{0,036} = 182,409$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,480$$

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

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 0,036/3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 0,155 = 0,347 \end{aligned}$$

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

FK	174,694
JK total	26,881
JK perlakuan	26,517
JK galat	0,363
dB perlakuan	4
KT perlakuan	6,629
dB galat	10
KT galat	0,036
F hitung	182,409

Tabel K.2: Data analisa varian satu arah pektinase teradsorpsi variasi waktu pengocokan

Waktu pengocokan (jam)	Rata-rata jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 gram pasir (mg)	Waktu pengocokan (jam)				
		1	2	3	5	4
		Rata-rata jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 gram pasir (mg)				
		1,614	2,521	3,054	4,814	5,061
1	1,614					
2	2,521	0,907				
3	3,054	1,440	0,533			
5	4,814	3,447	2,540	2,007		
4	5,061	3,447	2,540	2,007	0,247	

Tabel K.3: Data Uji BNT 5% jumlah pektinase teradsorb terhadap variasi waktu pengocokan

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	26,517	6,629	182,409	3,480
Galat percobaan	10	0,363	0,036		
Total	14	26,880	6,665		

Ket: warna biru =berbeda nyata

K.1.2 Pada variasi konsentrasi pektinase

Tabel K.4: Analisis pengaruh konsentrasi pektinase terhadap pektinase teradsorpsi pasir

Konsentrasi pektinase (mg/mL)	Jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 gram pasir (mg)			Total (mg)	Rata-rata (mg)
0,943	1,837	1,517	1,837	5,191	1,730
1,887	5,749	5,749	5,414	16,912	5,637
2,830	9,391	9,391	9,051	27,833	9,278
3,774	14,188	13,828	14,188	42,204	14,068
4,717	14,000	14,000	13,645	41,645	13,882
total	45,165	44,485	44,135	133,785	44,595

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{17898,426}{15} = 1193,228$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. JK Total (JKT)

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

$$= 1534,764 - 1193,228 = 341,536$$

b. JK Perlakuan (JKP)

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

$$= 4603,122/3 - 1193,228 = 341,146$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 341,536 - 341,146$$

$$= 0,391$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. KT Perlakuan = $\frac{JKP}{\text{dB perlakuan}} = \frac{341,146}{4} = 85,286$

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

$$= \frac{0,391}{10} = 0,039$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{85,286}{0,039} = 2183,657$$

$$F_{tabel\ 5\ \%} = F(0,05; 4, 10) = 3,480$$

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

$$\begin{aligned} BNT\ 5\ \% &= t_{(\alpha/2; dB)} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 0,039 = 0,360 \end{aligned}$$

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

FK	1193,228
JK total	341,536
JK perlakuan	341,146
JK galat	0,391
dB perlakuan	4
KT perlakuan	85,286
dB galat	10
KT galat	0,039
F hitung	2183,657

Tabel K.5: Data analisa variansatu arah pektinase teradsorpsi variasi konsentrasi pektinase

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	341,146	85,286	2183,657	3,480
Galat percobaan	10	0,391	0,039		
Total	14	341,537	85,325		

Tabel K.6: Data uji BNT 5 % pektinase teradsorpsi terhadap variasi konsentrasi pektinase

Konsentrasi pektinase (mg/mL)	Rata-rata jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 gram pasir (mg)	Konsentrasi pektinase (mg/mL)				
		0,943	1,887	2,830	4,717	3,774
		Rata-rata jumlah pektinase teradsorpsi dalam 0,1 gram pasir (mg)				
		1,730	5,637	9,278	13,882	14,068
0,943	1,730					
1,887	5,637	3,907				
2,830	9,278	7,548	3,641			
4,717	13,882	12,152	8,245	4,604		
3,774	14,068	12,338	8,431	4,790	0,186	

Ket: warna biru =berbeda nyata

K.2 Aktivitas Pektinase Amobil

K.2.1 Pada variasi waktu pengocokan

Tabel K.7: Analisa pengaruh waktu pengocokan terhadap aktivitas pektinase amobil

Waktu pengocokan (jam)	Aktivitas (unit)			Total (unit)	Rata-rata (unit)
1	429,6	433,5	432,2	1295,3	431,8
2	477,1	474,5	477,1	1428,7	476,2
3	520,7	524,5	523,3	1568,5	522,8
4	557,9	560,5	563,0	1681,4	560,5
5	533,5	532,2	534,8	1600,5	533,5
total	2518,8	2525,2	2530,4	7574,4	2524,8

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{57372050,4}{15} = 3824803,4$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. JK Total (JKT)

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK \\ &= 3856026,7 - 382480,4 = 31223,3 \end{aligned}$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK \\ &= 11567971,6/3 - 382480,4 = 31187,2 \end{aligned}$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$\text{JKG} = \text{JKT} - \text{JKP} = 31223,3 - 31187,2 = 36,2$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{a. KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{31187,2}{4} = 7796,8$$

$$\text{b. KT Galat percobaan} = \frac{\text{JKG}}{\text{dB percobaan}} = \frac{36,2}{10} = 3,6$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}} = \frac{7796,8}{3,6} = 2154,7$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,480$$

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

$$\begin{aligned} \text{BNT}_{5\%} &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2\text{KTG}/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 3,6/3)^{0,5} \\ &= 2,2 \times 1,6 = 3,5 \end{aligned}$$

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

FK	3824803,4
JK total	31223,3
JK perlakuan	31187,2
JK galat	36,2
dB perlakuan	4
KT perlakuan	7796,8
dB galat	10
KT galat	3,6
F hitung	2154,7

Tabel K.8: Data analisa varian satu arah aktivitas pektinase amobil terhadap variasi waktu pengocokan

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	31187,2	7796,8	2154,7	3,480
Galat percobaan	10	36,2	3,6		
Total	14	31223,4	7800,4		

Tabel K.9: Data Uji BNT 5% aktivitas terhadap variasi waktu pengocokan

Waktu pengocokan (jam)	Aktivitas (unit)	Waktu pengocokan (jam)				
		1	2	3	5	4
		Rata-rata aktivitas pektinase amobil (unit)				
		431,8	476,2	522,8	533,5	560,5
1	431,8					
2	476,2	44,4				
3	522,8	91,0	46,6			
5	533,5	101,7	57,3	10,7		
4	560,5	128,7	84,3	37,7	27,0	

Ket: warna biru =berbeda nyata

K.2.2 Pada variasi konsentrasi pektinase

Tabel K.10: Analisis pengaruh konsentrasi pektinase terhadap aktivitas pektinase amobil

Konsentrasi pektinase (mg/mL)	Aktivitas (unit)			Total (unit)	Rata-rata (unit)
0,943	570,7	564,2	566,9	1701,8	567,3
1,887	673,3	674,6	678,4	2026,3	675,4
2,830	881,1	884,9	891,3	2657,3	885,8
3,774	1050,3	1049,1	1050,4	3149,8	1049,9
4,717	1023,4	1022,1	1023,4	3068,9	1023,0
total	4198,9	4195,0	4210,4	12604,3	4201,4

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{1588681012}{15} = 10591206,7$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

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

$$= 1134646,0 - 10591206,7 = 543439,3$$

- b. JK Perlakuan (JKP)

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

$$= 33403663,9/3 - 10591206,7 = 543347,9$$

- c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 543439,3 - 543347,9$$

$$= 91,4$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{a. KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{543347,9}{4} = 135837,0$$

$$\begin{aligned} \text{b. KT Galat percobaan} &= \frac{\text{JKG}}{\text{dB percobaan}} \\ &= \frac{91,4}{10} = 9,1 \end{aligned}$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}} = \frac{135837,0}{9,1} = 14859,9$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,480$$

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

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2\text{KTG}/n)^{0,5} \\ &= 2,3 \times 2,5 = 5,7 \end{aligned}$$

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

FK	10591206,7
JK total	543439,3
JK perlakuan	543347,9
JK galat	91,4
dB perlakuan	4
KT perlakuan	135837,0
dB galat	10
KT galat	9,1
F hitung	14859,9

Tabel K.11: Data analisa varian satu arah aktivitas pektinase amobil variasi konsentrasi

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	543347,9	135837,0	14859,9	3,480
Galat percobaan	10	91,4	9,1		
Total	14	543439,3	135846,1		

Tabel K.12:Data uji BNT 5 % aktivitas pektinase amobil variasi konsentrasi pektinase

		Konsentrasi pektinase (mg/mL)				
Konsentrasi pektinase (mg/mL)	Aktivitas (unit)	0,943	1,887	2,830	4,717	3,774
		Rata-rata aktivitas pektinase amobil (unit)				
		567,3	675,4	885,8	1023,0	1049,9
0,943	567,3					
1,887	675,4	108,1				
2,830	885,8	318,5	210,4			
4,717	1023,0	455,6	347,6	137,2		
3,774	1049,9	482,7	374,5	164,1	26,9	

Ket: warna biru =berbeda nyata

K.3 Efisiensi Pektinase Amobil

Tabel K.13: Analisis pengaruh pengulangan pektinase amobil terhadap aktivitas

Pengulangan	Aktivitas (unit)			Total (unit)	Rata-rata (unit)
1	1109,4	1146,6	1082,4	3338,3	1112,8
2	1010,6	1031,1	965,7	3007,5	1002,5
3	860,6	882,4	892,6	2635,5	878,5
4	652,8	648,9	647,7	1949,4	649,8
5	570,7	568,1	560,5	1699,3	566,4
total	4204,0	4277,1	4148,9	12630,0	4210,0

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

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{1595179104}{15} = 10634527,4$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$$
$$= 11279308,1 - 10634527,4 = 644780,7$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK$$
$$= 33823167,0/3 - 10634527,4 = 639861,6$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JK T - JK P = 644780,7 - 639861,6$$
$$= 4919,1$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. KT Perlakuan = $\frac{JKP}{\text{dB perlakuan}} = \frac{639861,6}{4} = 159965,4$

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

$$= \frac{4919,1}{10} = 491,9$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{159965,4}{491,9} = 325,2$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,480$$

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$, maka H_0 ditolak, artinya variasi konsentrasi pektinase berpengaruh terhadap aktivitas. Untuk mengetahui

variasi konsentrasi pektinase mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$.

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (491,904/n)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 18,109 = 40,3 \end{aligned}$$

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

FK	10634527,4
JK total	644780,7
JK perlakuan	639861,6
JK galat	4919,1
dB perlakuan	4
KT perlakuan	159965,4
dB galat	10
KT galat	491,9
F hitung	325,2

Tabel K.14: Data analisa varian satu arah pengulangan pektinase amobil

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	639861,6	159965,4	325,2	3,480
Galat percobaan	10	4919,1	491,9		
Total	14	644780,7	160457,3		

Tabel K.15: Data uji BNT 5 % aktivitas terhadap pengulangan pektinase amobil

Pengulangan	Aktivitas (unit)	Pengulangan				
		5	4	3	2	1
		Rata-rata aktivitas pektinase amobil (unit)				
		566,4	649,8	878,5	1002,5	1112,8
5	566,4					
4	649,8	83,4				
3	878,5	312,1	228,7			
2	1002,5	436,1	352,7	124,0		
1	1112,8	546,4	463,0	234,2	110,3	

Ket: warna biru =berbeda nyata