

**Penentuan Kestabilan, Parameter Kinetik, dan Efisiensi  
Penggunaan Berulang Enzim Xilanase dari *Trichoderma  
Viride* yang Diamobilkan pada Matriks Zeolit Ca-Alginat**

**SKRIPSI**

**Oleh :**

**NOVIA ANJELINA**

**155090201111001**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU  
PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

repository.ub.ac.id

**Penentuan Kestabilan, Parameter Kinetik, dan Efisiensi  
Penggunaan Berulang Enzim Xilanase dari *Trichoderma  
Viride* yang Diamobilkan pada Matriks Zeolit Ca-Alginat**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains  
dalam bidang kimia

Oleh :

**NOVIA ANJELINA**

**155090201111001**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU  
PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Penentuan Kestabilan, Parameter Kinetik, dan Efisiensi Penggunaan Berulang Enzim Xilanase dari *Trichoderma Viride* yang Diamobilkan pada Matriks Zeolit Ca-Alginat**

Oleh :

**NOVIA ANJELINA**

**155090201111001**

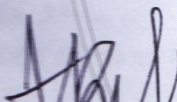
Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji

pada tanggal: **11 9 DEC 2011**

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Pembimbing II



Drs. Sutrisno, M.Si.

NIP. 19620318199002100



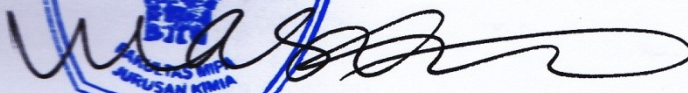
Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, M.S.

NIP. 195204121980021001

Mengetahui,



Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya



Masrui, S.Si., M.Si., Ph.D.

NIP. 197310202002121001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

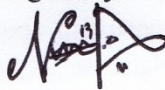
Nama : Novia Anjelina  
NIM : 155090201111001  
Penulis skripsi berjudul : Penentuan Kestabilan,  
Parameter Kinetik, dan Efisiensi  
Penggunaan Berulang Enzim  
Xilanase dari *Trichoderma*  
*Viride* yang Diamobilkan pada  
Matriks Zeolit Ca-Alginat

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,  
Yang menyatakan,



(Novia Anjelina)

NIM. 155090201111001

# Penentuan Kestabilan, Parameter Kinetik, dan Efisiensi Penggunaan Berulang Enzim Xilanase dari *Trichoderma Viride* yang Diamobilkan pada Matriks Zeolit Ca-Alginat

## ABSTRAK

Xilanase merupakan enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Xilanase bebas mempunyai sifat tidak stabil terhadap lingkungan, sehingga enzim xilanase bebas hanya dapat digunakan sekali saja. Dengan demikian stabilitas enzim perlu ditingkatkan menggunakan teknik amobilisasi. Amobilisasi yang dilakukan adalah metode adsorpsi fisik dan metode penjebakan untuk meningkatkan kestabilan dan aktivitas enzim. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap kestabilan, mengetahui nilai parameter kinetika reaksi dan mengetahui efisiensi penggunaan berulang xilanase amobil. Hasil penelitian menunjukkan enzim xilanase bebas paling stabil pada penyimpanan  $temperature -4^{\circ}C$  (*freezer*) dengan aktivitas enzim sisa pada lama penyimpanan 2 hari adalah  $0,17 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ , sedangkan enzim xilanase amobil paling stabil pada penyimpanan  $temperature 4^{\circ}C$  (*refrigerator*) dengan aktivitas enzim sisa pada lama penyimpanan 4 hari adalah  $0,11 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ . Nilai parameter kinetika enzim xilanase bebas dan amobil yaitu  $V_M$  sebesar  $0,104 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$  dan  $0,177 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$  serta nilai  $K_M$  sebesar  $0,31\%$  &  $1,54\%$ , menunjukkan bahwa enzim amobil lebih mampu mengkatalisis xilan menjadi xilosa. Enzim xilanase amobil Ca-Alginat dapat digunakan ulang sebanyak 5 kali dengan aktivitas enzim sebesar  $0,09 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$  dan efisiensi enzim sisa sebesar  $51,7\%$ . Menurut analisis statistik menggunakan uji ANOVA satu arah, parameter kinetik dan penggunaan berulang menunjukkan perbedaan sangat nyata ( $0 < 0,01$ ), sedangkan untuk pengaruh suhu dan lama penyimpanan menunjukkan perbedaan nyata ( $0 > 0,05$ ).

Kata Kunci : Xilanase, Zeolit, Ca-Alginat, *Trichoderma viride*

repository.ub.ac.id

## Determination of Stability, Kinetic Parameters, and Repeated Use Efficiency of Immobilized Xylanase Enzymes from *Trichoderma Viride* on Zeolit Ca-Alginat.

### ABSTRACT

Xylanase is an enzyme which has ability to hydrolyze xylan to xyloso. Xylanase isn't stable in room temperature, so the enzyme only can be use once. So the stability of enzyme should be increased by immobilize techniques. The immobilize techniques we used were physics adsorption metode and trapping metode. This methods can increase the stability and activity. This research's aim is to study the effects of temperature and storage's term to the stability of immobilized xylanase, to study about kinetic parameters' value of enzymatic reaction and to study about repeated use efficiency of immobilized xylanase. The result of this research showed xylanase enzymes most stable in  $-4^{\circ}\text{C}$ (freezer) temperature with the rest enzymes activity in 2 days was  $0,17 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{minutes}^{-1}$ , while immobilized xylanase enzymes most stable in  $4^{\circ}\text{C}$ (refrigeraror) temperature with the rest enzymes activity in 4 days was  $0,11 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{minutes}^{-1}$ . Kinetic parameters' value of free xylanase and immobilized xylanase, the  $V_M$  was  $0,104 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{minutes}^{-1}$  and  $0,177 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{minutes}^{-1}$ , and the  $K_M$  was  $0,31\%$  &  $1,54\%$ . It showed that immobilize enzyme more competent to hydrolyze xylan to xylose. Immobilized xylanase can be repeated use 5 times with the rest enzymes' activities was  $0,09 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{minutes}^{-1}$  and enzyme's efficiency was  $51,7\%$ . Based statistic analysis using one way ANOVA, kinetic parameter and repeated use of xilanase showed that it was very obviously different $_{(0<0,01)}$ , while the effects of temperature and storage's term to the stability showed that it was obviously different $_{(0>0,05)}$ .

Key words : Xylanase, Zeolit, Ca-Alginat, *Trichoderma viride*

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Penentuan Kestabilan, Parameter Kinetik, dan Efisiensi Penggunaan Berulang Enzim Xilanase dari *Trichoderma Viride* yang Diamobilkan pada Matriks Zeolit Ca-Alginat”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Penulis menyadari bahwa selama pelaksanaan dan penyelesaian skripsi ini telah banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Drs. Sutrisno, M.Si. selaku Dosen Pembimbing I yang telah banyak memberikan saran dan bimbingan selama penyusunan proposal penelitian, pelaksanaan penelitian sampai penyusunan skripsi.
2. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, M.S. selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan saran dan arahan dalam pelaksanaan penelitian sampai penyusunan skripsi.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dosen Pembimbing Akademik dan Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia yang telah memberikan dukungan dalam proses penyelesaian skripsi.
4. Mohamad Ilhamin dan Sutik Hartini selaku orang tua penulis, yang selalu mendoakan, memberi dukungan baik spiritual maupun materil, dan motivasi kepada penulis.

5. Fitri Rizka M. dan Aknes F.A.S. selaku rekan satu tim penelitian dan Bpk. Maryono selaku Laboran Biokimia atas semua dukungan semangat dan berbagi ilmu yang terkait dengan penelitian ini.
6. Teman-teman Kimia angkatan 2015, terutama Kimia C dan teman-teman BEM FMIPA UB yang telah memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis.
7. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuannya hingga terselesaikan penelitian ini.

Penulis menyadari dalam laporan ini masih banyak terdapat kekurangan. Untuk itu, penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga laporan ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan pembaca pada umumnya.

Aamiin.

Malang, 19 Desember 2018

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL.....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI.....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xv</b>
<b>BAB I.PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB II.TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Enzim Xilanase.....	5
2.2 Amobilisasi Enzim.....	6
2.3 Aktivitas dan Kestabilan Enzim.....	8
2.4 Hipotesis.....	8
<b>BAB III.METODE PENELITIAN.....</b>	<b>9</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	9
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	9
3.2.1 Alat Penelitian.....	9
3.2.2 Bahan.....	9
3.3 Tahapan Penelitian.....	10
3.4 Prosedur Kerja.....	11
3.4.1 Pembuatan tepung klobot jagung.....	11

3.4.2	Pembuatan media padat.....	11
3.4.3	Peremajaan biakan murni <i>Trichoderma viride</i> .....	11
3.4.4	Pembuatan media cair.....	12
3.4.5	Pembuatan inokulum .....	12
3.4.6	Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase dari biakan <i>Trichoderma viride</i> .....	12
3.4.7	Uji kadar protein.....	13
3.4.8	Penentuan aktivitas xilanase bebas.....	14
3.4.9	Penentuan kurva baku gula pereduksi xilosa.....	15
3.4.10	Amobilisasi enzim xilanase pada matriks zeolit Ca-alginat.....	16
3.4.11	Penentuan kadar protein sisa.....	17
3.4.12	Penentuan aktivitas xilanase amobil.....	17
3.4.13	Uji Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Aktivitas Enzim Xilanase Amobil.....	17
3.4.14	Uji Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Nilai Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis Xilanase Amobil.....	18
3.4.15	Uji Penggunaan Berulang Terhadap Aktivitas Xilanase Amobil.....	18
3.4.16	Analisis Data.....	18
<b>BAB IV.HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>		<b>19</b>
4.1	Produksi dan Isolasi Enzim Xilanase dari <i>Trichoderma viride</i> .....	19
4.2	Amobilisasi Enzim Xilanase.....	21
4.3	Penentuan Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Aktivitas	

Xilanase yang Diamobilisasi dengan Matriks Zeolit Ca-Alginat.....	22
4.4 Penentuan Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Nilai Kinetika Reaksi Enzimatis Xilanase Amobil.....	25
4.5 Efisiensi Penggunaan Ulang Enzim Xilanase Amobil.....	29
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan.....	31
5.2 Saran.....	31
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>32</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>39</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.1 : Mekanisme Reaksi Enzimatis yang terjadi pada saat pembentukan xilosa	20
Gambar 4.2 : Grafik Aktivitas Enzim Xilanase yang diamobilkan pada Matriks Zeolit Ca-Aginat	23
Gambar 4.3 : Kurva Pengaruh Variasi Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Bebas	26
Gambar 4.4 : Kurva Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/[V]$ Enzim Xilanase Bebas	27
Gambar 4.5 : Kurva Pengaruh Variasi Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Amobil	27
Gambar 4.6 : Kurva Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/[V]$ Enzim Xilanase Amobil	29
Gambar D.1 : Panjang Gelombang Maksimum Kasein	46
Gambar E.1 : Kurva Baku Larutan Standar Kasein	47
Gambar F.1 : Panjang Gelombang Maksimum Xilosa	48
Gambar G.1 : Kurva Baku Larutan Standar Xilosa	49

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 : Efisiensi Aktivitas Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Xilanase Bebas	22
Tabel 4.2 : Efisiensi Aktivitas Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Xilanase Amobil	24
Tabel 4.3 : Pengaruh Penggunaa Ulang Enzim Xilanase Amobil	30
Tabel D.1 : Data Absorbansi Larutan Kasein pada $\lambda$ (470-640) nm	46
Tabel E.1 : Data Absorbansi Larutan Standar Kasein pada $\lambda$ maks. 550 nm	47
Tabel F.1 : Data Absorbansi Larutan Xilosa pada $\lambda$ (480-530) nm	48
Tabel G.1 : Data Absorbansi Larutan Standar Xilosa pada $\lambda$ maks. 485 nm	49
Tabel H.1 : Konsentrasi Protein Awal Xilanase Bebas	50
Tabel I.1 : Aktivitas Enzim Xilanase Bebas	51
Tabel J.1 : Konsentrasi Protein Sisa Xilanase Amobil	52
Tabel K.1 : Aktivitas Enzim Xilanase Amobil	53

Tabel L.1 : Data Absorbansi Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Bebas	54
Tabel L.2 : Data Absorbansi Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Amobil	54
Tabel L.3 : Data Konsentrasi Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Bebas	54
Tabel L.4 : Data Konsentrasi Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Amobil	55
Tabel L.5 : Data Aktivitas Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Bebas	55
Tabel L.6 : Data Aktivitas Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Amobil	55
Tabel M.1 : Data Absorbansi Gula Pereduksi pada Variasi Konsentrasi Xilan Enzim Bebas	56
Tabel M.2 : Data Aktivitas Gula Pereduksi pada Variasi Konsentrasi Xilan Enzim Bebas	56
Tabel M.3 : Data Absorbansi Gula Pereduksi pada Variasi Konsentrasi Xilan Enzim Amobil	57
Tabel M.4 : Data Aktivitas Gula Pereduksi pada Variasi Konsentrasi Xilan Enzim Amobil	57

Tabel N.1 : Data Absorbansi Gula Pereduksi pada Penggunaan Ulang Xilanase Amobil	58
Tabel N.2 : Data Efisiensi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil	59
Tabel O.1 : Pengaruh suhu penyimpanan	59
Tabel O.2 : Pengaruh lama penyimpanan	60
Tabel O.3 : Penentuan $V_M$ dan $K_M$	61
Tabel O.4 : Penggunaan Ulang	62



**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran A. Tahapan Penelitian	39
Lampiran B. Preparasi Larutan	40
Lampiran C. Perhitungan Preparasi Larutan	42
Lampiran D. Panjang Gelombang Maksimum Kasein	46
Lampiran E. Kurva Baku Larutan Standar Kasein	47
Lampiran F. Panjang Gelombang Maksimum Xilosa	48
Lampiran G. Kurva Baku Larutan Standar Xilosa	49
Lampiran H. Kadar Protein Awal	49
Lampiran I. Aktivitas Enzim Xilanase Bebas	50
Lampiran J. Kadar Protein Sisa	51
Lampiran K. Aktivitas Enzim Xilanase Amobil	52
Lampiran L. Pengaruh Penyimpanan dan Variasi Suhu terhadap Kestabilan Aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Enzim Xilanase yang diamobilkan Menggunakan Matriks Zeolit Ca-Alginat	54
Lampiran M. Parameter Kinetika Enzimatis ( $V_M$ dan $K_M$ )	56
Lampiran N. Efisiensi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil	58
Lampiran O. Analisis Statistika	59



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan protein yang berperan sebagai katalis dalam reaksi kimia yang terjadi dalam tubuh makhluk hidup [1]. Enzim mampu mengaktifkan suatu senyawa secara spesifik sehingga enzim yang digunakan untuk mempercepat suatu reaksi kimia harus sesuai dengan polisakarida yang akan dihidrolisis [2]. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi  $10^8$  hingga  $10^{11}$  kali lebih cepat daripada reaksi yang tidak diberikan katalis, sehingga enzim sangat efisien untuk digunakan sebagai katalis. Kinerja enzim dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, *temperature*, pH dan pengaruh inhibitor. Enzim sangat membantu dalam proses industri pangan maupun non pangan. Pada proses industri pangan, enzim diperlukan untuk pembuatan kue, jus, wine, susu dan suplemen makanan, sedangkan pada proses industri non pangan, enzim diperlukan untuk pembuatan kosmetik, plastik, cat, deterjen, sabun [3].

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa. Proses bleaching dalam industri yang menggunakan xilanase memberikan kemurnian selulosa yang lebih tinggi dibandingkan menggunakan klorin. Selain itu, pemakaian xilanase dapat memberikan dampak lingkungan yang lebih baik, karena proses industri menggunakan xilanase ramah lingkungan [4]. Gula xilosa merupakan hasil hidrolisis hemiselulosa. Gula xilosa digunakan untuk konsumsi penderita diabetes karena gula xilosa tidak diserap oleh tubuh melainkan dikeluarkan melalui air seni tanpa berubah sifatnya [5]. Melalui proses fermentasi, enzim xilanase dapat dihasilkan dari bakteri dan kapang/jamur. Contoh bakteri yang dapat menghasilkan xilanase adalah *Bacillus sp.*, sedangkan kapang yang dapat menghasilkan xilanase adalah *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger* [1].

Enzim bebas mempunyai sifat tidak stabil terhadap lingkungan, termasuk enzim xilanase. Ketidakstabilan enzim ini menyebabkan enzim hanya dapat digunakan sekali saja, sedangkan

produksi enzim sendiri memerlukan biaya yang mahal. Dengan demikian stabilitas enzim perlu ditingkatkan menggunakan teknik amobilisasi. Amobilisasi enzim adalah suatu proses penahanan pergerakan molekul enzim pada tempat tertentu, sehingga aktivitas katalitiknya tetap ada[6]. Dengan demikian, enzim dapat digunakan berulang kali, dan pengeluaran untuk produksi enzim lebih sedikit. Untuk dapat digunakan ulang, diperlukan tempat penyimpanan yang tepat untuk enzim, karena enzim mudah mengalami denaturasi pada *temperature* yang tinggi.

Pada penelitian Setiawan (2016), telah diteliti mengenai nilai parameter kinetik dari enzim xilanase amobil pada matriks zeolit teraktivasi asam. Nilai ini penting untuk menentukan kemampuan katalisis enzim xilanase dan untuk mengetahui konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mencapai  $\frac{1}{2} V_M$  reaksi[7]. Penentuan kestabilan dan penggunaan berulang dilakukan oleh Prabowo(2017) untuk mengetahui suhu dan lama penyimpanan yang tepat dari enzim xilanase amobil pada matriks zeolit teraktivasi asam[8]. Selanjutnya pada penelitian Novitasari (2018), amobilisasi enzim dilakukan menggunakan metode adsorpsi dengan zeolit dan metode penjebakan dengan Ca-Alginat. Hal ini bertujuan untuk mencegah atau mengurangi adanya penurunan aktivitas xilanase amobil saat digunakan secara berulang serta memberikan perlindungan terhadap enzim. Kondisi optimum amobilisasi xilanase dengan matriks zeolit Ca-Alginat terjadi pada konsentrasi xilanase 3,5 mg/mL dan konsentrasi alginat 3% (w/v)[9]. Penelitian lebih lanjut oleh Hanani (2018), diperoleh kondisi optimum xilanase dari *Trichoderma viride* amobil pada matriks zeolit teraktivasi asam Ca-Alginat pada pH 6, *temperature* 40°C, dan waktu inkubasi 45 menit[10]. Menggunakan data tersebut penelitian selanjutnya dapat dilakukan untuk mengetahui kestabilan, parameter kinetik dan penggunaan berulang enzim xilanase bebas dan amobil dari *Trichoderma viride* pada matriks Zeolit Ca-Alginat.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, maka dapat dirumuskan :

1. Bagaimana pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas enzim xilanase amobil pada matriks zeolit teraktivasi asam Ca-Alginat ?
2. Berapa nilai parameter kinetika reaksi enzimatik xilanase amobil pada matriks zeolit teraktivasi asam Ca-Alginat ?
3. Bagaimana efisiensi penggunaan berulang xilanase amobil pada matriks zeolit teraktivasi asam Ca-Alginat ?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini meliputi :

1. Induser yang digunakan pada produksi xilanase dari *Trichoderma viride* berasal dari klobot jagung.
2. Enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks zeolit Ca-Alginat merupakan enzim ekstrak kasar.
3. Variasi konsentrasi substrat untuk menentukan nilai kinetika xilanase yang digunakan sebesar 0,1;0,5;1,0;1,5;2,0 %.
4. Uji stabilitas enzim teramobil matriks zeolit teraktivasi asam Ca-Alginat pada variasi *temperature* (-4°C(*freezer*), 4°C(*refrigerator*), 30°C(*temperature* ruang), *temperature* 40°C) dan lama penyimpanan(0,1,2,3,4,5,6 dan 7 hari).
5. Kadar zeolit yang digunakan sebesar 0,1 gram dalam *temperature* ruang dan kecepatan pengocokan sebesar 100 rpm dalam waktu 3 jam
6. Konsentrasi optimum yang digunakan dari xilanase yang diamobilkan sebesar 3,5 mg/mL dan alginat 3%(w/v).

## 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas enzim xilanase amobil pada matriks zeolit teraktivasi asam Ca-Alginat.
2. Mengetahui nilai parameter kinetika reaksi enzimatik xilanase amobil pada matriks zeolit teraktivasi asam Ca-Alginat.

3. Mengetahui efisiensi penggunaan berulang xilanase amobil pada matriks zeolit teraktivasi asam Ca-Alginat.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian adalah diketahuinya efisiensi parameter kinetik, penggunaan berulang dan kestabilan enzim xilanase bebas dan amobil dari *Trichoderma viride* pada matriks Zeolit Ca-Alginat, sehingga diharapkan dapat memberi informasi penting untuk menghasilkan xilosa secara optimum serta penyimpanan yang tepat dan penggunaan berulang enzim xilanase amobil baik dalam industri maupun untuk masyarakat.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Enzim Xilanase

Enzim adalah protein yang mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia. Terdapat lebih dari 2500 reaksi biokimia yang berbeda dengan bantuan enzim spesifik yang sesuai untuk meningkatkan laju reaksinya. Masing-masing enzim dicirikan oleh spesifisitasnya untuk substrat(reaktan) yang mirip secara biologis. Meskipun semua enzim mempunyai nama yang kompleks berdasarkan sistem penggolongan yang didasarkan pada jenis reaksi yang dikatalisisnya, banyak enzim yang dikenal dengan nama yang diturunkan dari nama reaktan spesifiknya yang utama, dengan tambahan akhiran -ase[11].

Xilosa dapat diperoleh melalui proses hidrolisis hemiselulosa (xilan) oleh suatu enzim. Enzim yang memiliki kemampuan tersebut adalah Xilanase[1]. Xilosa atau gula kayu( $C_5H_{12}O_5$ ) adalah gula pentosa, monosakarida dengan lima atom karbon dan memiliki gugus aldehida. Gula ini di peroleh dengan mengurai jerami atau nabati lainnya dengan cara memasaknya dengan asam sulfat[12]. Produksi jagung di Indonesia meningkat dari tahun ke tahun. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik Indonesia, produksi jagung sebanyak 19.612.435 ton pada tahun 2015. Besarnya produksi jagung ini, juga memicu besarnya limbah klobot jagung di Indonesia. Di daerah pedesaan, biasanya masyarakat kurang peduli dengan limbah ini, sehingga pemanfaatannya hanya sebatas untuk pakan ternak dan bahan bakar untuk memasak[13]. Komponen utama serat kasar klobot jagung adalah hemiselulosa yaitu sebanyak 41,16%. Besarnya kandungan hemiselulosa ini menyebabkan klobot jagung berpotensi sebagai sumber xilan dalam produksi xilanase[14].

Enzim xilanase dapat berfungsi dalam berbagai industri, seperti industri produksi gula xilosa. Xilosa dapat digunakan dalam penyamakan dan perwarnaan serta dapat juga digunakan sebagai bahan pemanis[12]. Xilosa dapat direduksi menjadi xilitol. Xilitol adalah pemanis alami yang aman dengan kadar kalori 40 persen lebih rendah dari gula pasir(sukrosa) tetapi mempunyai tingkat kemanisan yang sama. Sehingga gula xilosa ini dapat digunakan untuk konsumsi penderita diabetes. Selain itu xilitol juga dapat menjaga kesehatan

gigi, karena xilitol dapat mendukung air liur dalam menetralkan keasaman plak secara lebih sempurna[15]. Kebutuhan enzim xilanase di industri terus meningkat. Enzim xilanase pada saat ini banyak dimanfaatkan untuk pembuatan gula xilosa, proses bleaching pada pembuatan kertas, campuran makanan ternak, dan juga digunakan untuk industri makanan dan minuman[16].

Enzim xilanase dapat dihasilkan oleh bakteri dan kapang melalui proses fermentasi. Salah satu kapang yang dapat menghasilkan enzim xilanase adalah *Trichoderma viride*. *Trichoderma viride* selain menghasilkan enzim selulolitik yang lengkap yaitu enzim selobiohidrolase, endoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase. *Trichoderma viride* juga menghasilkan enzim xyloglukanolitik yang mempermudah enzim memecah selulosa[17]. *Trichoderma viride* umumnya berkoloni dengan akar dari banyak spesies tanaman. Kita dapat menemukannya dengan mudah di alam dan tanah, khususnya tanah pada lahan pertanian[18].

## 2.2 Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim merupakan suatu usaha yang bertujuan untuk memisahkan antara enzim dengan produk selama reaksi dengan menggunakan sistem dua fase, sehingga antara fase yang mengandung enzim dan fase lain yang mengandung produk tidak saling mengkontaminasi[16]. Amobilisasi enzim dilakukan dengan maksud untuk meningkatkan stabilitas dan membuat enzim dapat digunakan berulang. Keunggulan penggunaan enzim amobil dalam industri yaitu dapat digunakan berulang, dapat mengurangi biaya, produk tidak dipengaruhi enzim, memudahkan pengendalian enzim, dapat digunakan untuk uji analisis, dan masih banyak lainnya[19]. Ada tiga metode amobilisasi yaitu metode *carrier binding*, metode penjebakan, dan metode pengikatan silang(*cross-linking*). Metode *carrier binding* ada tiga jenis, yaitu adsorpsi fisik, pengikatan ionik, dan pengikatan kovalen. Dengan metode ini, enzim akan diikat ke dalam suatu *carrier* yang bersifat tidak dapat larut dalam air. Dengan metode penjebakan, enzim ditempatkan dalam kisi-kisi matriks polimer atau membran. Sedangkan dengan metode pengikatan silang, enzim diikat dengan kuat secara silang dengan *carrier*, sehingga desorpsi enzim sangat kecil. Namun metode pengikatan silang dapat menyebabkan aktivitas enzim sangat rendah,

karena sisi aktif enzim berubah[20]. Dalam penelitian ini digunakan metode *carrier binding* jenis absorpsi fisik, dan metode penjebakan dengan membuat manik-manik.

Pada metode *carrier binding* jenis adsorpsi fisik, protein enzim berinteraksi fisik secara adsorpsi dengan matriks permukaan. Metode ini dilakukan karena pengerjaannya mudah, ekonomis, tidak merusak konformasi enzim, dan aktivitas enzim tidak banyak mengalami penurunan[21]. Padatan yang biasa digunakan sebagai matriks pengadsorp atau matriks permukaan adalah zeolit, alumina, dan silika[22]. Zeolit adalah satu kelompok berkerangka aluminosilikat yang terdapat di alam dengan kapasitas tukar kation yang tinggi, adsorpsi tinggi dan bersifat hidrasi-dehidrasi[23]. Di Indonesia, zeolit ditemukan dalam jumlah besar oleh PPTM(Pusat Pengembangan Teknologi Mineral) Bandung pada tahun 1985. Zeolit tersebar di beberapa daerah pulau Sumatera dan Jawa. Namun dari 46 lokasi zeolit, baru beberapa lokasi yang ditambang secara intensif antara lain di Bayah, Banten, Cikalong, Tasikmalaya, Cikembar, Sukabumi, Nanggung, Bogor dan Lampung. Di Indonesia zeolit dipasarkan masih dalam bentuk alam terutama pada pemupukan bidang pertanian[24]. Zeolit memiliki ukuran pori yang tidak seragam, aktifitas katalitik yang rendah dan banyak mengandung pengotor. Oleh karena itu, zeolit perlu diaktivasi sebelum digunakan. Salah satu cara aktivasi zeolit adalah dengan pemberian asam[25].

Pada metode penjebakan, enzim dilokalisasi dalam kisi matriks atau mikrokapsul(membrane semipermeabel) namun masih terikat pada matriks gel atau membran[26]. Metode ini dilakukan karena enzim ada dalam keadaan bebas dan tidak terikat pada bahan pendukung, sehingga fungsi katalitik dan struktur alami molekul enzim tidak mengalami gangguan goncangan[27]. Bahan organik yang biasa digunakan dalam metode ini yaitu Ca-alginat, agar, K-karagenan dan kolagen[28]. Ca-alginat digunakan sebagai matriks, karena dapat membentuk gel yang kokoh, tidak beracun, dapat dilakukan pada *temperature* ruang dan pengerjaannya ekonomis[26]. Alginat dapat dihasilkan dari rumput laut coklat. Di Indonesia, rumput laut coklat sangat melimpah, karena rumput laut coklat termasuk dalam rumput laut yang bernilai ekonomis dan sudah banyak diperdagangkan[29]. Bentuk enzim yang dibuat dalam

penelitian ini adalah dalam bentuk manik karena mudah ditangani dan pembawanya tersedia secara komersial. Penggunaan manik dalam bentuk kecil akan lebih efektif karena memperluas bidang kontak enzim dengan substrat dan menurunkan tahanan difusi manik terhadap substrat[30].

### 2.3 Aktivitas dan Kestabilan Enzim

Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh *temperature*, pH, dan konsentrasi substrat. *Temperature* optimal dan pH optimal adalah rentang *temperature* dan pH ketika enzim dapat bekerja dengan baik secara optimal tanpa menjadi tidak aktif atau menjadi terdenaturasi. Peningkatan konsentrasi substrat juga dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Hal ini karena ada lebih dari cukup enzim untuk memfasilitasi reaksi, sehingga laju reaksi awalnya meningkat. Setelah pada titik tertentu, penambahan konsentrasi substrat tidak mempengaruhi aktivitas enzim karena banyaknya substrat melebihi keberadaan enzim. Sedangkan laju reaksi tetap konstan, karena penambahan substrat harus menunggu enzim yang tersedia untuk memfasilitasi reaksi[31]. Enzim dikatakan stabil apabila aktivitas sisa lebih dari 50% aktivitas enzim awal. Kondisi lingkungan mempengaruhi kestabilan enzim[32]. Kinetika enzim merupakan pengukuran jumlah enzim berdasarkan kecepatan reaksi yang dikatalisisnya. Faktor penting yang mempengaruhi kecepatan reaksi tersebut adalah konsentrasi substrat dan enzim, pH, *temperature* dan adanya kofaktor serta ion logam[33].

### 2.4 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah variasi suhu dan lama penyimpanan berpengaruh terhadap kestabilan serta variasi konsentrasi substrat berpengaruh terhadap aktivitas enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks zeolit Ca-alginat sehingga diperoleh kondisi optimum pada xilanase amobil.



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya gelas kimia (250 mL, 100 mL, 50 mL), erlenmeyer (250 mL, 50 mL, 25 mL), pipet ukur (10 mL, 1 mL), pipet tetes, labu ukur (100 mL, 50 mL, 25 mL, 10 mL), tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas arloji, pengaduk gelas, pengaduk magnet, corong gelas, botol semprot, botol sampel, jarum ose, kapas, kasa, aluminium foil, kertas coklat, bunsen burner, kertas saring Whatman No 40, syringe (10 mL), *blender*, pH meter (*Senz Ph tester*), ayakan 150 mesh, neraca analitik (*Mettler Toledo AL 204*), oven (Memmert), pemanas listrik (*Janke-Kunkel*), motor *rotary* (*Janke-Kunkel*), autoklaf (*All American Model 20X*), laminar air flow, inkubator (*Heraeus type B 5042*), *refrigerator*, shaker (*Edmund Buhler SM 25 24.B*), sentrifuse dingin (*Tomy MX-305*), penangas air (*Memmert W 200*), Spectronic Genesys 20 (*Thermo Scientific Genesys 20*), kuvet, Tanur (Nabertherm), aluminium foil, kapas steril, jarum ose.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah kentang, *Trichoderma viride* dan klobot jagung. Selain itu bahan-bahan kimia yang sifatnya pro analisis (p.a) seperti dextrosa, asam asetat,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$  (NaK-tartrat), glukosa anhidrat, DNS (asam dinitrosalisilat),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , NaOH, HCl, xilosa, Kristal fenol,  $\text{KMnO}_4$ , Na-alginat,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Terdapat bahan yang sifatnya *for microbiology* seperti urea, pepton, tepung agar, xilan, zeolit, tween-80 dan kasein (Merck).

### 3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan Penelitian ini, antara lain :

1. Pembuatan tepung klobot jagung
2. Pembuatan media padat
3. Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*
4. Pembuatan media cair
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase dari biakan *Trichoderma viride*
7. Uji kadar protein
  - a. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan kasein
  - b. Pembuatan kurva baku larutan kasein
  - c. Penentuan kadar protein
8. Penentuan aktivitas xilanase bebas
  - a. Pengujian aktivitas xilanase bebas
  - b. Pengukuran aktivitas xilanase bebas
9. Penentuan kurva baku gula pereduksi xilosa
  - a. Penentuan panjang gelombang maksimal gula pereduksi xilosa
  - b. Pembuatan kurva baku gula pereduksi xilosa
10. Amobilisasi xilanase pada matriks zeolit Ca-alginat
  - a. Preparasi matriks zeolit
  - b. Aktivasi matriks zeolit
  - c. Preparasi larutan Ca-alginat
  - d. Amobilisasi xilanase pada matriks zeolit Ca-alginat
11. Penentuan kadar protein sisa
12. Penentuan aktivitas xilanase amobil
13. Uji Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Aktivitas Enzim Xilanase Amobil
14. Uji Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Nilai Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis Xilanase Amobil
15. Uji Penggunaan Berulang Terhadap Aktivitas Xilanase Amobil
16. Analisis Data

### 3.4 Prosedur Kerja

#### 3.4.1 Pembuatan Tepung Klobot Jagung

Klobot jagung diambil dan dicuci menggunakan akuades, lalu dikeringkan dalam oven pada *temperature* 100°C. Setelah kering, klobot jagung dipotong kecil-kecil dan dihaluskan menggunakan *blender*. Klobot jagung yang telah halus diayak menggunakan ayakan 150 mesh. Serbuk halus yang lolos ayakan disimpan dan digunakan sebagai induser.

#### 3.4.2 Pembuatan Media Padat

*Potatoes Dextrose Agar* (PDA) dibuat dengan menggunakan 20 gram kentang yang telah dikupas, kemudian dimasukkan dalam gelas kimia 250 mL, ditambahkan akuades hingga 100 mL, dipanaskan hingga mendidih selama 1 jam menggunakan pemanas listrik. Volume dijaga tetap 100 mL dengan menambahkan akuades, setelah itu didinginkan. Sari kentang didapatkan dengan menyaring kentang yang telah didinginkan. Kemudian ke dalam sari kentang ditambahkan Dextrose sebanyak 2 gram, 0,2 M buffer asetat pH 5 sebanyak 1 mL, kemudian dipanaskan kembali hingga mendidih dan ditambahkan 1,5 gram tepung agar sambil diaduk. Larutan PDA diambil sebanyak 4 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas dan dilapisi dengan kertas coklat. Kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada *temperature* 121°C dan tekanan 15 psi. Larutan PDA steril dikeluarkan dari autoklaf, didinginkan pada *temperature* ruang dengan posisi miring dan dibiarkan selama 24 jam. Larutan PDA yang telah padat disimpan di dalam *refrigerator*.

#### 3.4.3 Peremajaan Biakan Murni *Trichoderma viride*

Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride* dilakukan dalam *laminar air flow*. Jarum ose disterilkan dengan membakar ujung jarum yang terbuat dari logam pada api bunsen hingga berpijar, kemudian mulut tabung biakan murni *Trichoderma viride* dan mulut tabung media padat dipanaskan pada nyala api bunsen untuk disterilkan. Kemudian spora *Trichoderma viride* diambil sebanyak satu mata ose, dipindahkan ke dalam media padat PDA steril secara aseptis. Setelah itu, tabung ditutup kembali dengan kapas steril dan

dilapisi kertas coklat, kemudian disimpan dan diinkubasi selama 6 hari (144 jam) dalam inkubator dengan *temperature* 30°C.

#### 3.4.4 Pembuatan Media Cair

Sejumlah 0,12 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,12 gram  $\text{CaCl}_2$ ; 0,56 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,12 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,4 g pepton; 0,2 gram urea; 0,08 gram tween-80; 0,4 mL unsur renik dan 2 gram tepung klobot jagung ditimbang dengan neraca analitik. Kemudian dimasukkan semua bahan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, ditambahkan akuades sampai volume 200 mL, ditambahkan 1 mL buffer asetat (0,2 M) pH 5. Campuran tersebut diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Kemudian ditutup kapas, dilapisi kertas coklat dan diikat dengan karet. Selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 15 psi.

#### 3.4.5 Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan dalam *laminar air flow*. Spora hasil pembiakan murni *Trichoderma viride* yang telah berumur 6 hari diambil dengan jarum ose sebanyak satu mata ose dan dipindahkan secara aseptis ke dalam Erlenmeyer 50 mL yang telah berisi 25 mL media cair steril. Kemudian diinkubasi menggunakan *shaker* selama 36 jam (hingga pertengahan fase logaritma) dengan kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang. Kemudian larutan inokulum 1 yang telah diinkubasi diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam 4 erlenmeyer yang berisi media cair sebanyak 50 mL secara aseptis. Selanjutnya diinkubasi kembali menggunakan *shaker* selama 36 jam (pertengahan fase logaritma) dengan kecepatan 100 rpm pada *temperature* ruang.

#### 3.4.6 Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase dari Biakan *Trichoderma viride*

Diambil sebanyak 18 mL larutan inokulum kemudian dimasukkan ke dalam 8 erlenmeyer yang berisi media cair steril sebanyak 180 mL secara aseptis dalam *Laminar Air Flow*. Campuran diinkubasi selama 60 jam pada *temperature* ruang dan dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Kemudian ditambah 16 mL buffer asetat pH 5 dan disentrifugasi dingin pada kecepatan 3000 rpm dan *temperature* 4° C selama 30 menit.

Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim xylanase yang kemudian ditentukan kadar protein dan aktivitasnya.

### **3.4.7 Uji kadar protein**

#### **3.4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Kasein**

Sebanyak 2 mL larutan kasein konsentrasi 5000  $\mu\text{g/mL}$  diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 8 mL reagen biuret dan 2 mL larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5. Kemudian dikocok dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 470-640 nm dengan *Spectronic Genesys 20*.

#### **3.4.7.2 Pembuatan Kurva Baku Larutan Kasein**

Kasein ditimbang sebanyak 1 g, dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL, diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan ditambah beberapa tetes larutan NaOH 0,1 N hingga kasein larut dengan sempurna. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 100 mL, ditambah aquades hingga tanda batas dan dikocok agar homogen. Diperoleh larutan stok kasein 10000  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan stok dipipet dengan volume (1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; dan 9) mL, dimasukkan dalam labu takar 10 mL, ditambah aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan (1000; 2000; 3000; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000; dan 9000)  $\mu\text{g/mL}$ . Dipipet sebanyak 2 mL masing – masing konsentrasi larutan kasein kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 2 mL larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 dan 8 mL reagen Biuret. Kemudian dikocok dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Diukur nilai absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum. Dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi kasein ( $\mu\text{g/mL}$ ) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

#### **3.4.7.3 Penentuan Kadar Protein**

Uji kadar protein dilakukan dengan menggunakan reagen biuret, yaitu 2 mL ekstrak xilanase hasil sentrifugasi dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000  $\mu\text{g/mL}$ . Campuran larutan dikocok hingga homogen dan diinkubasi selama 30 menit kedalam penangas air pada temperatur 50°C. Diukur nilai absorbansi larutan pada panjang

gelombang maksimum dengan *Spectronic Genesys 20*. Kadar protein awal diketahui dengan cara memplotkan nilai absorbansi pada persamaan kurva baku protein.

### 3.4.8 Penentuan Aktivitas Xilanase Bebas

#### 3.4.8.1 Uji Aktivitas Xilanase

Substrat xilan 1% (b/v) sebanyak 1 mL kedalam tabung reaksi, dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit pada temperatur 60° C. Ditambahkan 1 mL xilanase, 1 mL buffer asetat (0,2M) pH 5, dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran larutan diinkubasi selama 55 menit pada *temperature* 50° C. Ditambahkan 2 mL reagen DNS ke dalam tabung reaksi dan dimasukkan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Kemudian didinginkan dengan air mengalir, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas serta dihomogenkan. Diukur nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimum 485 nm dengan *Spectronic Genesys 20*.

#### 3.4.8.2 Pengukuran Aktivitas Xilanase Bebas

Aktivitas xilanase dinyatakan dalam satuan  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$ . satuan unit aktivitas enzim bebas dinyatakan sebagai 1  $\mu\text{g}$  xilosa yang dihasilkan per menit per mL enzim. Pengukuran aktivitas xilanase bebas dilakukan dengan cara memplotkan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva baku, sehingga diperoleh konsentrasi gula pereduksi dari hidrolisis xilan oleh xilanase. Berikut adalah persamaan untuk mengetahui satu unit aktivitas enzim dengan massa molekul gula pereduksi xilosa diwakilkan oleh massa protein :

$$AE = \frac{X \times V \times fp}{p \times q}$$

Keterangan :

AE	=aktivitas enzim ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$ )
X	= konsentrasi gula pereduksi ( $V = \mu\text{g/mL}$ )
V	= volume total sampel (mL)
Fp	= faktor pengenceran
p	= massa protein ( $\mu\text{g}$ )
q	= waktu reaksi (menit)

### 3.4.9 Penentuan Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa

#### 3.4.9.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Gula Pereduksi Xilosa

Dipipet sebanyak 1 mL larutan xilosa 300  $\mu\text{g/mL}$  dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Ditambahkan sebanyak 1 mL larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 dan 2 mL reagen DNS. Campuran larutan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dengan air mengalir. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen. Larutan blanko yang digunakan adalah aquades dengan perlakuan sama seperti sampel. Diukur nilai absorbansinya pada kisaran panjang gelombang 480-530 nm. Ditentukan panjang gelombang maksimum dengan cara memilih nilai absorbansi paling besar.

#### 3.4.9.2 Pembuatan Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa

Ditimbang 0,15 gram xilosa, dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL dan ditambahkan aquades secukupnya. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambah aquades hingga tanda batas serta dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan gula stok gula 1500  $\mu\text{g/mL}$ . Dipipet larutan sebanyak 2; 2,7; 3; 3,3; 3,7; 4; 4,3 ; dan 5 mL larutan stok gula 1500  $\mu\text{g/mL}$  dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berbeda. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Sehingga diperoleh larutan stok 300, 450, 600, 750 900, 1050, dan 1200  $\mu\text{g/mL}$ . Setiap konsentrasi larutan stok tersebut diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda., lalu ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5 dan 2 mL reagen DNS pada masing-masing tabung reaksi. Kemudian, semua campuran larutan tersebut dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dalam air mengalir. Masing-masing larutan dimasukkan dalam labu ukur 25 mL yang berbeda. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Kemudian diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimum glukosa dengan menggunakan *Spectronic Genesys*. Kurva baku dibuat dengan memplotkan data konsentrasi gula ( $\mu\text{g/mL}$ ) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

### **3.4.10 Amobilisasi Enzim Xilanase pada Matriks Zeolit Ca-alginat**

#### **3.4.10.1 Preparasi Matriks Zeolit**

Mineral zeolit dihaluskan dengan cara ditumbuk lalu diayak dengan ayakan 120 *mesh*, padatan yang lolos diayak kembali dengan ayakan 150 *mesh* dan padatan yang tertahan di ayakan 150 *mesh* digunakan sebagai matriks amobilisasi. Hal ini dilakukan agar luas permukaan zeolit untuk amobilisasi setara. Selanjutnya padatan dicuci dengan aquades, disaring dan dikeringkan pada temperatur 105°C di dalam oven.

#### **3.4.10.2 Aktivasi Matriks Zeolit**

Mineral zeolit yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL sebanyak 10 g, ditambahkan larutan HCl 0,4 M sebanyak 200 mL, dikocok selama 4 jam pada temperatur menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Selanjutnya disaring dengan kertas Whatman No.40 dan dicuci dengan aquades hingga pH filtrat netral. Kemudian zeolit yang teraktivasi, dikalsinasi di dalam tanur selama 4 jam pada temperatur 500°C.

#### **3.4.10.3 Preparasi Larutan Ca-Alginat**

Padatan Ca-Alginat sebanyak 0,3 g dilarutkan dengan aquades secukupnya di dalam gelas kimia 250 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades sebanyak 100 mL dan dipanaskan hingga larut sempurna di dalam penangas air lalu didinginkan.

#### **3.4.10.4 Amobilisasi Xilanase pada Matriks Zeolit Ca-Alginat**

Ekstrak kasar xilanase dipipet sebanyak 2,8 mL kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 25 mL, ditambah larutan buffer asetat pH 5 hingga volume total 5 mL, ditambah padatan zeolit teraktivasi sebanyak 0,1 g. Setelah itu campuran di *shaker* selama 3 jam pada kecepatan 100 rpm. Endapan yang diperoleh kemudian dicampurkan dengan larutan alginat dengan konsentrasi 3 %. Kemudian campuran xilanase dan larutan alginat diteteskan dengan *syringe* 10 mL pada gelas kimia yang telah berisi larutan CaCl<sub>2</sub> 7,5 mL. Kemudian manik-manik yang telah terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan CaCl<sub>2</sub> 0,15 M selama satu jam agar manik-manik menjadi keras. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman no. 40. Endapan yang diperoleh merupakan



xilanase amobil yang selanjutnya ditentukan aktivitasnya. Sedangkan filtrat diuji kadar protein sisanya.

### **3.4.11 Penentuan Kadar Protein Sisa**

Filtrat hasil amobilisasi enzim dipipet sebanyak 2 mL, ditambahkan larutan kasein 5000 ppm sebanyak 2 mL, ditambah reagen biuret sebanyak 8 mL, dihomogenkan dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan pada temperatur ruang dan absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spectronic Genesys 20* pada panjang gelombang maksimum 550 nm kasein sehingga diketahui kadar protein sisa dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein.

### **3.4.12 Penentuan Aktivitas Xilanase Amobil**

Substrat xilan 1% (b/v) sebanyak 1 mL kedalam tabung reaksi, dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit pada temperatur 60° C. Ditambahkan 0,1 g xilanase, 1 mL buffer asetat (0,2M) pH 6, dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran larutan diinkubasi selama 45 menit pada *temperature* 40° C. Larutan didinginkan, dan enzim xilanase amobil disaring. Ditambahkan 2 mL reagen DNS ke dalam tabung reaksi yang berisi filtrat dan dimasukkan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Kemudian didinginkan dengan air mengalir, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas serta dihomogenkan. Diukur nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimum 485 nm dengan *Spectronic Genesys 20*.

### **3.4.13 Uji Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Aktivitas Enzim Xilanase Amobil**

Penentuan aktivitas xilanase pada variasi lama penyimpanan dilakukan dengan menguji aktivitas dari enzim xilanase amobil yang telah disimpan dalam beberapa variasi keadaan (-4°C(*freezer*), 4°C(*refrigerator*), 30°C(*temperature* ruang), *temperature* 40°C). Pengujian dilakukan setiap 24 jam sekali selama 7 hari.

Padatan enzim xilanase amobil yang tersisa ditimbang total massanya, kemudian dibagi menjadi empat bagian dan ditempatkan di dalam botol sampel. Kemudian diletakkan berdasarkan parameter yang diinginkan. Setelah disimpan selama 24 jam, masing-masing

sampel diambil sebanyak 0,1 g dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Enzim amobil dikondisikan *temperature*nya agar naik terlebih dahulu sesuai *temperature* optimumnya. Kemudian dilakukan pengujian aktivitas enzim. Dilakukan pengujian aktivitas setiap 24 jam sekali selama 7 hari dengan perlakuan yang sama.

#### **3.4.14 Uji Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Nilai Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis Xilanase Amobil**

Nilai parameter kinetika enzim xilanase amobil dilakukan dengan uji aktivitas xilanase pada *temperature* 40°C dan waktu inkubasi 45 menit terhadap variasi substrat mulai dari variasi konsentrasi substrat sebesar 0,1;0,5;1,0;1,5;2,0 %. Tujuan dari variasi konsentrasi substrat ini untuk menentukan nilai kinetika xilanase dari enzim tersebut.

#### **3.4.15 Uji Penggunaan Berulang Terhadap Aktivitas Xilanase Amobil**

Uji penggunaan berulang xilanase amobil dilakukan dengan menggunakan substrat xilan 1% (b/v). Substrat sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit pada *temperature* 60° C. Ditambahkan 0,1 g xilanase, 1 mL buffer asetat (0,2M) pH 6, dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran larutan diinkubasi selama 45 menit pada *temperature* 40°C. Larutan didinginkan, dan enzim xilanase amobil disaring. Manik-manik hasil penyaringan dicuci menggunakan larutan buffer asetat (0,2 M) pH 6, dan digunakan untuk uji aktivitas kembali. Sedangkan filtrat hasil penyaringan ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dimasukkan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Kemudian didinginkan dengan air mengalir, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas serta dihomogenkan. Diukur nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimum 485 nm dengan *Spectronic Genesys* 20.

#### **3.3.16 Analisis Data**

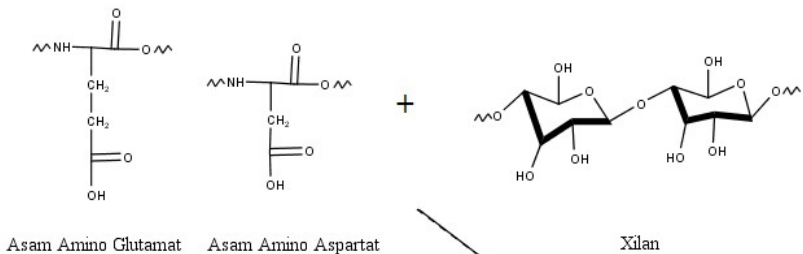
Data hasil aktivitas enzim xilanase amobil dianalisis dengan program SPSS 23.0 menggunakan uji ANOVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji beda Nyata Jujur (BNJ) 5%.

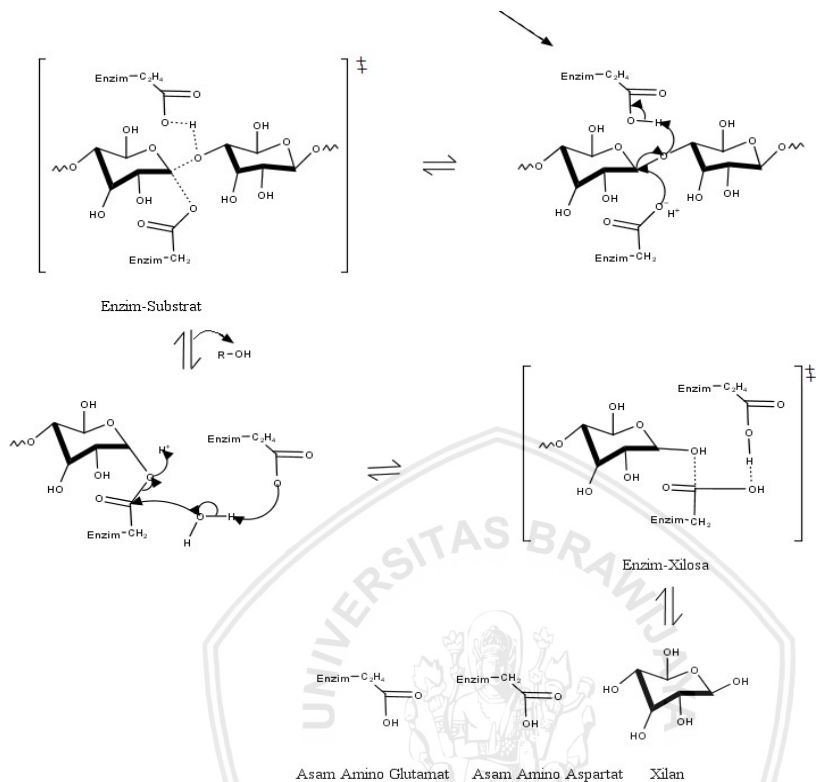
## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Produksi dan Isolasi Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride*

Komponen utama serat kasar klobot jagung adalah hemiselulosa yaitu sebanyak 41,16%. Kandungan hemiselulosa yang cukup banyak, membuat klobot jagung tepat digunakan sebagai substrat dari enzim xilanase untuk memproduksi xilan menjadi xilosa. Isolasi enzim diawali dengan menumbuhkan jamur pada media cair hingga pertengahan fase log(36 jam). Setelah itu dilanjutkan pada media cair yang baru dengan waktu yang sama, karena pada fase ini jamur aktif dalam memproduksi enzim. Selanjutnya enzim xilanase diproduksi hingga fase akhir logaritma(60 jam), karena pada fase ini enzim telah diproduksi secara maksimal.

Uji aktivitas enzim xilanase bebas menggunakan metode spektrofotometri dengan reagen DNS. Xilanase akan menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Xilosa yang dihasilkan akan bereaksi dengan reagen DNS membentuk senyawa kompleks 3-amino-5-nitrosalisilat. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan menggunakan Spectronic Genesys 20 pada panjang gelombang 485nm. Aktivitas enzim xilanase dapat ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi pada persamaan kurva baku xilosa, sehingga diperoleh aktivitas enzim xilanase bebas sebesar  $40,5 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ . Penentuan kadar protein awal enzim xilanase menggunakan metode spektrofotometri dengan reagen biuret. Kadar protein awal enzim xilanase bebas diperoleh sebesar  $9 \text{ mg mL}^{-1}$ . Selanjutnya enzim xilanase bebas diamobilkan pada matriks zeolit terktivasi asam.





**Gambar 4.1 : Mekanisme Reaksi Enzimatis yang terjadi pada saat pembentukan xilosa**

Gugus karboksil rantai samping residu asam amino aspartat mengalami ionisasi membentuk ion karboksilat dan menyerang ikatan glikosidik pada atom C1, setelah atom H dari gugus karboksil residu asam amino glutamate menerima pasangan electron bebas akan terbentuk kompleks enzim-substrat. Kompleks enzim substrat dihidrolisis, sehingga ikatan hidrogen terputus dan terbentuk xilosa[8].

## 4.2 Amobilisasi Enzim Xilanase

### 4.2.1 Preparasi dan Aktivasi Matriks Zeolit

Matriks yang digunakan pada penelitian ini adalah zeolit alam. Zeolit diaktivasi terlebih dahulu menggunakan HCl 0,4 M untuk menghilangkan pengotor dalam rongga-rongga zeolit, sehingga keasaman, kristalinitas, rasio Si/Al dan luas permukaan meningkat. Selanjutnya zeolit dikalsinasi menggunakan tanur agar kristal(hidrat) dalam butiran zeolit hilang sehingga dapat terbentuk oksidanya berupa SiO<sub>2</sub>. Kalsinasi merupakan proses pemanasan yang dilakukan pada *temperature* tinggi, namun masih dibawah titik leleh zeolit, yaitu pada *temperature* 500°C dan dilakukan selama 4 jam. Zeolit yang terbentuk berwarna coklat dengan ukuran butiran haasil ayakan 150 *mesh*.

### 4.2.2 Amobilisasi Xilanase pada Matriks Zeolit

Xilanase biasa digunakan dalam bentuk enzim bebas, sehingga hanya bisa digunakan sekali dan bersifat tidak stabil terhadap lingkungan. Stabilitas enzim dapat ditingkatkan menggunakan metode amobilisasi. Penelitian ini menggunakan metode adsorpsi fisik dan metode penjebakan. Matriks yang digunakan untuk metode adsorpsi fisik berupa mineral alam, yaitu zeolit yang teraktivasi asam. Sedangkan untuk metode penjebakan digunakan bahan organik yaitu Ca-Alginat. Ekstrak kasar enzim xilanase yang dihasilkan dicampur dengan zeolit, 0,2 M larutan buffer pH 5 dan dikocok menggunakan shaker selama 3 jam untuk mempercepat waktu kontak antara zeolit dengan enzim. Larutan buffer asetat pH 5 berfungsi untuk melarutkan enzim, menjaga stabilitas dan aktivitas enzim, dengan demikian enzim telah terikat pada permukaan matriks, namun ikatan tersebut tergolong lemah. Kelebihan dari metode ini adalah pengerjaannya mudah, ekonomis, tidak merusak konformasi enzim, dan aktivitas enzim tidak banyak mengalami penurunan[11]. Selanjutnya dilakukan amobilisasi menggunakan metode penjebakan. Enzim yang telah diamobilkan menggunakan metode absorpsi fisik dicampurkan dengan larutan Ca-Alginat 3% dan dikocok menggunakan shaker selama 30 menit, kemudian campuran ditetaskan pada gelas kimia yang telah berisi larutan CaCl<sub>2</sub> agar menjadi manik-manik. Pada penelitian dipilih bentuk manik dalam bentuk kecil agar gel kokoh dan lebih efektif memperluas bidang kontak enzim dengan

substrat serta menurunkan tahanan difusi manik terhadap substrat[30]. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas enzim xilanase amobil sebesar  $26,1 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$  dengan kadar protein yang terikat sebesar  $8 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### 4.3 Penentuan Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Kestabilan Aktivitas Xilanase yang Diamobilisasi dengan Matriks Zeolit Ca-Alginat

Penentuan pengaruh *temperature* terhadap kestabilan xilanase bebas dilakukan dengan cara menyimpan xilanase bebas pada *temperature*  $-4^{\circ}\text{C}$  (*freezer*),  $4^{\circ}\text{C}$  (*refrigerator*),  $30^{\circ}\text{C}$  (ruang) dan  $40^{\circ}\text{C}$  (*temperature optimum*). Sebelum digunakan, enzim xilanase dikondisikan agar sesuai dengan kondisi optimumnya. Setelah itu enzim xilanase ditentukan aktivitasnya pada waktu penyimpanan 0, 1, 2, 3 hari dan seterusnya hingga aktivitas enzim xilanase sisa kurang dari atau sama dengan 50%. Aktivitas enzim sisa dapat diketahui kurang dari 50% jika nilai aktivitasnya kurang dari nilai aktivitas penyimpanan 0 hari. Dari penelitian ini, dapat dilihat hasilnya pada tabel 4.1

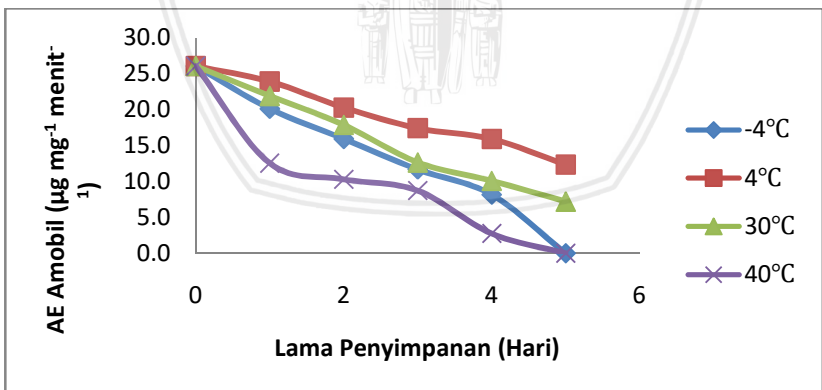
**Tabel 4.1 : Efisiensi Aktivitas Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Xilanase Bebas**

Lama penyimpanan (Hari)	Efisiensi (%)			
	$-4^{\circ}\text{C}$	$4^{\circ}\text{C}$	$30^{\circ}\text{C}$	$40^{\circ}\text{C}$
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	69	70	53	27
2	61	36	27	0
3	32	0	0	0

Berdasarkan tabel 4.1, aktivitas enzim xilanase bebas mengalami kondisi terbaik saat disimpan pada *temperature*  $-4^{\circ}\text{C}$  (*freezer*), kemudian pada *temperature*  $4^{\circ}\text{C}$  (*refrigerator*), *temperature*  $30^{\circ}\text{C}$  (ruang) dan terakhir pada *temperature*  $40^{\circ}\text{C}$  (*temperature optimum*) dan semakin menurun nilai aktivitasnya seiring dengan bertambahnya lama penyimpanan. Aktivitas sisa terakhir dari penyimpanan *temperature*  $-4^{\circ}\text{C}$ (*freezer*) terjadi pada pengukuran 2 hari yaitu sebesar 61% Dari data tersebut kita dapat

menarik kesimpulan bahwa semakin lama waktu penyimpanan, semakin banyak enzim xilanase yang mengalami kerusakan.

Enzim yang diamobilkan memiliki kelebihan jika dibandingkan dengan enzim bebas, salah satu kelebihan dari amobilisasi enzim yaitu meningkatkan stabilitas. Kestabilan enzim dipengaruhi oleh pH dan *temperature* penyimpanan. Penggunaan *temperature* yang rendah untuk penyimpanan enzim dapat menjaga kestabilan enzim karena kemungkinan terjadinya denaturasi akibat perubahan *temperature* lebih kecil. Namun pada *temperature* yang rendah, aktivitas dari enzim akan menurun[8]. Pada penentuan pengaruh *temperature* terhadap kestabilan xilanase yang diamobilisasi dengan matriks zeolit Ca-Alginat dilakukan dengan cara menyimpan xilanase amobil pada *temperature*  $-4^{\circ}\text{C}$  (*freezer*),  $4^{\circ}\text{C}$  (*refrigerator*),  $30^{\circ}\text{C}$  (ruang) dan  $40^{\circ}\text{C}$  (*temperature* optimum). Sebelum digunakan, enzim amobil dikondisikan agar sesuai dengan kondisi optimumnya. Setelah itu enzim xilanase ditentukan aktivitasnya pada waktu penyimpanan 0, 1, 2, 3, 4, 5 hari dan seterusnya hingga aktivitas enzim xilanase sisa kurang atau sama dengan 50%. Aktivitas enzim sisa dapat diketahui kurang dari 50% jika nilai aktivitasnya kurang dari nilai aktivitas penyimpanan 0 hari. Dari penelitian ini, diperoleh hasil yang ditunjukkan pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 : Grafik Aktivitas Enzim Xilanase yang diamobilkan pada Matriks Zeolit Ca-Aginat

Dari gambar 4.2 dapat dilihat bahwa aktivitas enzim xilanase amobil pada *temperature* 4°C (*refrigerator*), 30°C (ruang), -4°C (*freezer*) dan 40°C (*temperature optimum*) turun dengan seiring bertambahnya lama penyimpanan. Dari data tersebut kita dapat menarik kesimpulan bahwa semakin lama waktu penyimpanan, semakin banyak enzim xilanase amobil yang mengalami kerusakan. Penyimpanan enzim pada jangka waktu tertentu dapat menyebabkan perubahan konformasi enzim, sehingga ada beberapa molekul enzim yang terlepas dari substrat.

**Tabel 4.2 : Efisiensi Aktivitas Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Xilanase Amobil**

Lama penyimpanan (Hari)	Efisiensi (%)			
	-4°C	4°C	30°C	40°C
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	77,2	91,7	84,0	48,1
2	61,1	77,8	68,5	39,5
3	44,8	66,7	48,5	33,5
4	31,3	61,0	38,7	10,6
5	0,0	47,3	27,6	0,0

Berdasarkan tabel 4.2, aktivitas enzim xilanase amobil mengalami kondisi terbaik saat disimpan pada *temperature* 4°C (*refrigerator*), kemudian pada *temperature* 30°C (ruang), -4°C (*freezer*) dan terakhir pada *temperature* 40°C (*temperature optimum*) dan semakin menurun nilai aktivitasnya seiring dengan bertambahnya lama penyimpanan. Aktivitas sisa terakhir dari penyimpanan *temperature* 4°C (*refrigerator*) terjadi pada pengukuran 4 hari yaitu sebesar 61%, sedangkan aktivitas sisa terakhir dari penyimpanan *temperature* 30°C (ruang) dan -4°C (*freezer*) terjadi pada pengukuran 2 hari yaitu sebesar 68,5% dan 61,1%. Pada penyimpanan di dalam *refrigerator* aktivitas yang ditunjukkan cukup besar dan stabil hal ini karena pada *temperature* yang rendah kemungkinan terjadinya denaturasi akibat perubahan *temperature* lebih kecil. Sedangkan dalam *freezer* aktivitasnya lebih rendah



repository.ub.ac.id

daripada dalam *refrigerator* karena pada penyimpanan *freezer* sebelum digunakan untuk diuji aktivitasnya, enzim amobil harus dilelehkan terlebih dahulu dengan merendamnya dalam air, sehingga diduga ikatan hidrogen antara enzim xilanase dan matriks meregang dan menyebabkan turunnya aktivitas enzim. Pada saat penyimpanan dalam *temperature* 40°C, aktivitas sisa enzim xilanase amobil terdapat pada waktu kurang dari 24 jam, hal ini dimungkinkan terjadi denaturasi karena batas *temperature* optimum enzim xilanase adalah 60°C.

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa enzim xilanase bebas lebih stabil disimpan dalam *temperature* -4°C, sedangkan enzim xilanase amobil lebih stabil disimpan dalam *temperature* 4°C. Seiring bertambahnya lama penyimpanan, aktivitas enzim xilanase semakin mengalami penurunan, akan tetapi enzim xilanase amobil memiliki waktu penyimpanan yang lebih lama daripada enzim xilanase bebas, yaitu enzim bebas selama 2 hari dengan aktivitas sisa sebesar 24,9  $\mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$  dan enzim amobil selama 4 hari dengan aktivitas sisa sebesar 15,9  $\mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ .

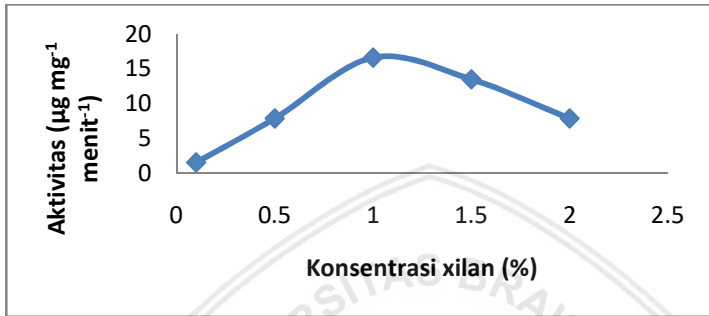
Berdasarkan hasil uji statistik aktivitas enzim xilanase amobil diperoleh nilai F hitung(3,916) > F tabel 5%(2,92) ( $p=0,05$ ), sehingga dapat disimpulkan bahwa pengaruh *temperature* penyimpanan terhadap aktivitas xilanase amobil terdapat perbedaan nyata. Berdasarkan hasil uji statistik aktivitas enzim xilanase amobil diperoleh nilai F hitung(7,679) > F tabel 5%(2,92) ( $p=0,05$ ), sehingga dapat disimpulkan bahwa pengaruh lama penyimpanan terhadap aktivitas xilanase amobil terdapat perbedaan nyata.

#### **4.4 Penentuan Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Nilai Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis Xilanase Amobil**

Penentuan kinetika reaksi enzimatis meliputi dua parameter yaitu nilai  $V_M$  dan  $K_M$ .  $V_M$  merupakan kecepatan reaksi ketika enzim jenuh dengan substrat. Konsentrasi substrat merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim xilanase amobil. Penambahan konsentrasi substrat dapat menaikkan kecepatan reaksi enzimatis. Penelitian ini mengamati pengaruh konsentrasi substrat

terhadap aktivitas enzim xilanase bebas dan amobil dengan variasi konsentrasi mulai dari 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2 % (b/v).

Pada enzim xilanase bebas hasil pengaruh variasi konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim xilanase bebas pada Gambar 4.3, aktivitas tertinggi dicapai pada kondisi konsentrasi substrat 1% dengan aktivitas sebesar  $17,7 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ .

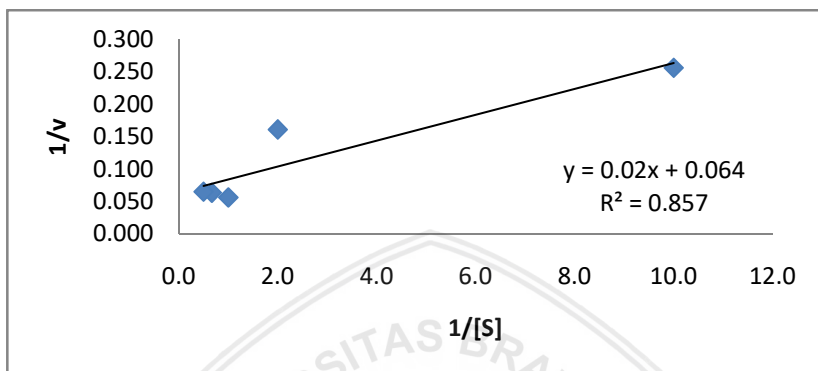


**Gambar 4.3 : Kurva Pengaruh Variasi Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Bebas**

Aktivitas enzim xilanase bebas mulai meningkat sampai pada konsentrasi 1% hingga mencapai maksimal. Pada konsentrasi diatas 1% aktivitas cenderung menurun karena sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat, sehingga tidak tersedia ruang lagi untuk terjadi ikatan antara enzim dengan substrat yang berlebihan.

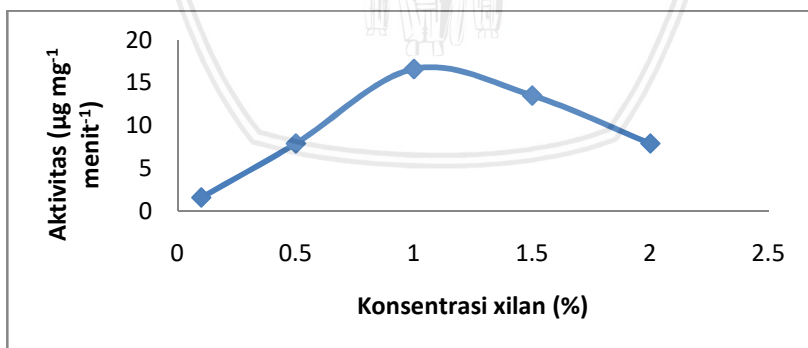
Nilai  $V_M$  dan  $K_M$  dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk berdasarkan kurva hubungan antara  $1/[S]$  dengan  $1/[V]$  seperti yang tertera pada Gambar 4.4. Enzim xilanase bebas mempunyai nilai  $V_M$  sebesar  $15,63 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ , dan nilai  $K_M$  sebesar 0,31%. Pada penelitian Setiawan(2016), enzim xilanase bebas mempunyai nilai  $V_M$  sebesar  $27,85 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ , dan nilai  $K_M$  sebesar 0,25%[7]. Nilai  $V_M$  menunjukkan kemampuan enzim xilanase mengkatalisis seberapa banyak konversi xilan menjadi xilosa. Sedangkan konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) merupakan konsentrasi substrat yang diperlukan oleh suatu enzim untuk mencapai setengah kelajuan maksimumnya. Dengan demikian, enzim xilanase pada percobaan ini memiliki kemampuan

mengkatalisis xilan menjadi xilosa lebih sedikit dari pada penelitian Setiawan(2016), dan memerlukan konsentrasi substrat lebih banyak untuk mencapai setengah  $V_M$  nya. Hal ini terjadi dimungkinkan karena adanya EDTA ketika pembuatan unsur renik yang merupakan inhibitor.



**Gambar 4.4 : Kurva Hubungan antara 1/[S] dengan 1/[V] Enzim Xilanase Bebas**

Pada enzim xilanase amobil hasil pengaruh variasi konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim xilanase amobil pada Gambar 4.5, aktivitas tertinggi dicapai pada kondisi konsentrasi substrat 1% dengan aktivitas sebesar  $16,6 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ .

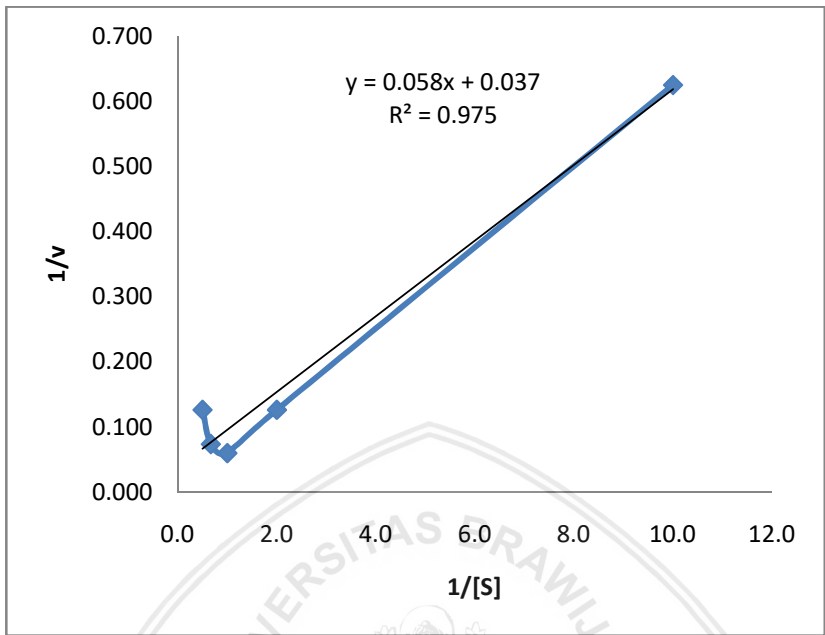


**Gambar 4.5 : Kurva Pengaruh Variasi Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Amobil**

repository.ub.ac.id

Aktivitas enzim xilanase amobil mulai meningkat sampai pada konsentrasi 1% hingga mencapai maksimal. Pada konsentrasi diatas 1% aktivitas cenderung menurun karena sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat, sehingga tidak tersedia ruang lagi untuk terjadi ikatan antara enzim dengan substrat yang berlebihan.

Nilai  $V_M$  dan  $K_M$  dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk berdasarkan kurva hubungan antara  $1/[S]$  dengan  $1/[V]$  seperti yang tertera pada Gambar 4.6. Enzim xilanase amobil mempunyai nilai  $V_M$  sebesar  $27,03 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ , dan nilai  $K_M$  sebesar 1,57%. Pada penelitian Setiawan(2016), enzim xilanase yang diamobilkan dengan zeolit mempunyai nilai  $V_M$  sebesar  $29,24 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ , dan nilai  $K_M$  sebesar 1,281%[7]. Nilai  $V_M$  menunjukkan kemampuan enzim xilanase mengkatalisis seberapa banyak konversi xilan menjadi xilosa. Sedangkan konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) merupakan konsentrasi substrat yang diperlukan oleh suatu enzim untuk mencapai setengah kelajuan maksimumnya. Dengan demikian, enzim xilanase yang diamobilkan dengan matriks zolit ca-alginat pada percobaan ini memiliki kemampuan mengkatalisis xilan menjadi xilosa lebih banyak dari pada penelitian Setiawan(2016) yaitu enzim xilanase yang diamobilkan menggunakan zeolit saja, karena rentang perbedaan nilai parameter kinetika enzim bebas dan enzim amobil dari penelitian ini lebih tinggi daripada rentang perbedaan nilai parameter kinetika enzim bebas dan enzim amobil dari penelitian Setiawan(2016). Kenaikan aktivitas enzim yang lebih banyak ini diduga karena di dalam manik-manik enzim amobil, selain masih terkandung ion Ca dari zeolit, terdapat ion Ca dari alginat, dimana ion Ca merupakan kofaktor, sehingga dapat meningkatkan aktivitas enzim. Nilai  $K_M$  xilanase amobil pada percobaan ini lebih besar daripada penelitian Setiawan(2016). Hal ini menunjukkan konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mencapai  $\frac{1}{2} V_M$  menjadi lebih besar. Hal ini diduga karena metode penjebakan menyebabkan xilan yang dikeluarkan sedikit dan substrat xilan disekitar matriks konsentrasinya tinggi.



**Gambar 4.6 : Kurva Hubungan antara 1/[S] dengan 1/[V] Enzim Xilanase Amobil**

Berdasarkan hasil uji statistik diperoleh nilai F hitung(66,766) > F tabel 1%(5,99) ( $p=0,01$ ), sehingga dapat disimpulkan bahwa variasi konsentrasi xilan yang diterapkan terhadap aktivitas xilanase yang diamobilkan dengan matriks zeolit Ca-alginat terdapat perbedaan sangat nyata.

#### **4.5 Efisiensi Penggunaan Ulang Enzim Xilanase Amobil**

Enzim xilanase bebas hanya dapat digunakan sekali saja, sedangkan enzim xilanase amobil memiliki beberapa kelebihan, salah satunya adalah dapat digunakan berulang kali dan sifatnya lebih stabil. Efisiensi penggunaan ulang enzim xilanase amobil dapat diamati dengan menentukan aktivitas enzim dan mengamati perubahan aktivitas enzim saat digunakan berulang-ulang. Aktivitas enzim dikatakan stabil jika aktivitas sisa lebih besar atau sama dengan 50%[32].

**Tabel 4.3 : Pengaruh Penggunaan Ulang Enzim Xilanase Amobil**

Penggunaan ke-	Aktivitas rata-rata xilanase amobil ( $\mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ )	Efisiensi (%)
1	26,1	100
2	23,7	91,1
3	16	61,2
4	15	57,6
5	13,5	51,7
6	11,4	43,9
7	10,5	40,5

Hasil pengaruh penggunaan ulang xilanase amobil yang tertera pada table 4.3 menunjukkan bahwa enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks zeolit Ca-Alginat dapat digunakan sebanyak 5 kali. Penggunaan pertama enzim xilanase amobil memiliki aktivitas sebesar  $26,1 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$  dengan asumsi efisiensi sebesar 100%. Pada penggunaan selanjutnya, enzim amobil mengalami penurunan aktivitas enzim. Hal ini karena manik-manik sudah mulai rusak, sehingga ikatan antara enzim dengan matriks terlepas dari permukaan matriks, mengingat daya ikat enzim amobil menggunakan metode absorpsi fisik lemah jika tanpa dilindungi amobilisasi menggunakan metode penjebaran. Pengulangan penggunaan enzim amobil sebanyak 5 kali pada penelitian ini menunjukkan efisiensi sebesar 51,7% dengan aktivitas sebesar  $13,5 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ . Berdasarkan penelitian Prabowo(2017), enzim xilanase amobil menggunakan zeolit tanpa Ca-Alginat dapat digunakan ulang sebanyak tiga kali dengan efisiensi 50,65% dan aktivitas  $41,75 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$  [8]. Hal ini karena dengan amobilisasi metode penjebaran menggunakan Ca-Alginat lebih melindungi enzim, selain itu ion Ca yang terdapat pada enzim juga telah terbukti meningkatkan nilai parameter kinetiknya.

Berdasarkan hasil uji statistik diperoleh nilai F hitung(1293,2) > F tabel 1%(7,19) ( $p=0,01$ ), sehingga dapat disimpulkan bahwa penggunaan ulang terhadap aktivitas xilanase amobil terdapat perbedaan sangat nyata.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Suhu dan lama penyimpanan berpengaruh terhadap kestabilan aktivitas enzim xilanase amobil pada matriks zeolit teraktivasi asam Ca-Alginat. Enzim xilanase bebas paling stabil pada penyimpanan *temperature*  $-4^{\circ}\text{C}$  (*freezer*) dengan aktivitas enzim sisa pada lama penyimpanan selama empat hari adalah  $15,9 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$  dan efisiensi sebesar 61%. Sedangkan enzim xilanase amobil paling stabil pada penyimpanan *temperature*  $4^{\circ}\text{C}$  (*refrigerator*) dengan aktivitas enzim sisa pada lama penyimpanan selama empat hari adalah  $15,9 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$  dan efisiensi sebesar 61%.
2. Parameter kinetika enzim xilanase amobil yang diperoleh dari persamaan Lineweaver-Burk yaitu  $V_M$  sebesar  $27,03 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ , dan nilai  $K_M$  sebesar 1,57%. Dengan konsentrasi substrat xilan 1% memberikan hasil nilai aktivitas enzim tertinggi.
3. Enzim xilanase amobil dapat digunakan ulang sebanyak lima kali dengan efisiensi enzim sisa sebesar 51.7% dan aktivitas enzim sebesar  $13.5 \mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ .

#### 5.2 Saran

Sebaiknya setiap amobilisasi enzim digunakan dua metode amobilisasi, agar hasil maksimal.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Sutrisno, Sukmana, M. E., & Roosdiana, A. (2014). *Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Enzim Xylanase dari Trichoderma Viride*, 2(1), 340–344.
2. Samsuri, M., Gozan, M., Mardias, R., Baiquni, M., Hermansyah, H., Wijanarko, A., Nasikin, M. (2007). *Pemanfaatan Selulosa untuk Produksi Ethanol Melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak dengan Enzim Xylanase*, 11(1), 17–24.
3. Murni, S. W., Kholisoh, S. D., D.L., T., & E.M., P. (2011). *Produksi, Karakterisasi, Dan Isolasi Lipase Dari Aspergillus Niger*, 8, 1–7.
4. Putri, Medonna Febrina, Sari, Dita Permata, Caesari, Adisty, & Miranda, Gilda. (2013). *Biobleaching Pelepah Sawit Sebagai Bahan Baku Pembuatan Nitroselulosa Menggunakan Enzim Xylanase*, 1–7.



5. Richana, N. (2002). *Produksi Dan Prospek Enzim Xilanase Dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia*, 5(1), 29–36.
6. Sutrisno, Sari, I. P., & Prasetyawan, S. (2014). *Optimasi Amobilisasi Xilanase Dari Trichoderma Viride Dengan Matriks Zeolit*, 2(1), 421–427.
7. Setiawan, F. (2016). "Karakterisasi Enzim Xilanase Hasil Isolasi Dari Trichoderma Viride Yang Diamobilkan Pada Matriks Zeolit Teraktivasi Asam". Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang.
8. Prabowo, G. A. (2017). "Pengaruh Suhu Dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Aktivitas Xilanase Trichoderma Viride Hasil Filtrasi Gel Yang Diamobil Pada Matriks Zeolit Dan Efisiensi Pemakaian Ulang". Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang.
9. Novitasari, M. (2018). *Optimasi Amobilisasi Xilanase Dari Trichoderma Viride Pada Matriks Zeolit Ca-Alginat*". Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang.

10. Hanani, S. (2018). "*Penentuan Kondisi Optimum Xilanase Dari Trichoderma Viride Yang Diamobilisasi Pada Matriks Zeolit Ca-Alginat*". Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang.
11. Philip, K., & Ralston, G. B. (2006). *Schaum's Easy Outlines : Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
12. Permata, C. (2017). *Pembuatan Gula Xilosa Dengan Menggunakan Enzim Xilanase*. Retrieved From <https://student.unud.ac.id/corrypermata/news/68101>
13. Badan Pusat Statistik. (2018). *Produksi Jagung Menurut Provinsi (Ton), 1993-2015*. Retrieved From <https://www.bps.go.id/dynamic/table/2015/09/09/868/produksi-jagung-menurut-provinsi-ton-1993-2015.html>
14. Sulistyaningtyas, A. S., Prasetyawan, S., & Sutrisno, S. (2013). *Pengaruh Penambahan Ion Fe<sup>3+</sup> Terhadap Aktivitas Xilanase dari Trichoderma Viride*, 2(2), 470–476.

15. Sutriyanto, E. (2011). *Kandungan Xylitol Permen Karet Ampuh Bersihkan Gigi*. Retrieved From [Http://Www.Tribunnews.Com/Kesehatan/2011/11/03/Kandungan-Xylitol-Permen-Karet-Ampuh-Bersihkan-Gigi](http://www.tribunnews.com/kesehatan/2011/11/03/kandungan-xylitol-permen-karet-ampuh-bersihkan-gigi)
16. Sutrisno, Mardiana, & Mahdi, C. (2014). *Optimasi Amobilisasi Xilanase dari Trichoderma Viride Menggunakan Matriks Bentonit*, 2(1), 435–440.
17. Gunam, I. B. W., Aryanta, W. R., & Darma, I. B. N. S. (2015). *Produksi Selulase Kasar dari Kapang Trichoderma Viride dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi*, 15(2), 29–33.
18. Subhan, Sutrisno, N., & Sutarya, R. (2012). *Pengaruh Cendawan Trichoderma Sp. Terhadap Tanaman Tomat Pada Tanah Andisol*, 11(3), 389–400.
19. Tohir, T. (2018). *Tiga Metode Amobilisasi Enzim*. Retrieved From [Http://Chyrun.Com/3-Metode-Amobilisasi-Enzim/](http://chyrun.com/3-metode-amobilisasi-enzim/)

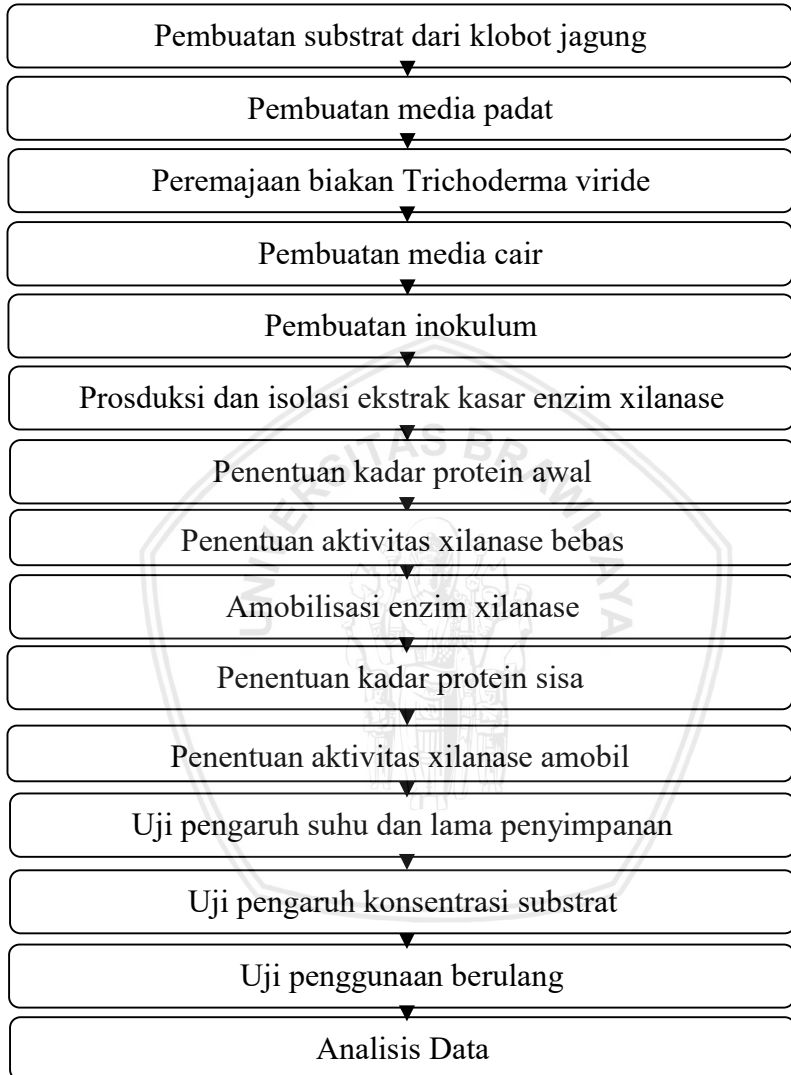
20. Param, R. (2008). *Amobilisasi Enzim*. Retrieved From [Http://Digilib.Itb.Ac.Id/Files/Disk1/621/Jbptitbpp-Gdl-Ratihparam-31017-3-2008ta-2.Pdf](http://Digilib.Itb.Ac.Id/Files/Disk1/621/Jbptitbpp-Gdl-Ratihparam-31017-3-2008ta-2.Pdf)
21. Aulia, F. P. (2017). *Amobilisasi Enzim Selulase dari Bacillus Substilis Menggunakan Bentonit*. Retrieved From [Http://Digilib.Unila.Ac.Id/29379/20/SKRIPSI%20TANPA%20BAB%20PEMBAHASAN.Pdf](http://Digilib.Unila.Ac.Id/29379/20/SKRIPSI%20TANPA%20BAB%20PEMBAHASAN.Pdf)
22. Sari, I. P., Sutrisno, S., & Prasetyawan, S. (2014). *Optimasi Amobilisasi Xilanase dari Trichoderma Viride dengan Matriks Zeolit*, 2(1), 421–427.
23. Kusdarto, K. (2008). *Potensi Zeolit di Indonesia*, 7(2), 78–87.
24. Las, T. (2005). *Potensi Zeolit Untuk Mengolah Limbah Industri dan Radioaktif*. Retrieved From [Http://Www.Batan.Go.Id/Ptlr/Artikel/Zeolit.Html](http://Www.Batan.Go.Id/Ptlr/Artikel/Zeolit.Html)
25. Septiani, U., & Lisma, A. (2011). *Pemanfaatan Zeolit Alam Sebagai Media Pendukung Amobilisasi Enzim A-Amilase*, 5(1), 79–88.

26. Mesla, W., Mahdi, C., & Sutrisno. (2014). *Optimasi Amobilisai Xilanase dari Trichoderma Viride Menggunakan Matriks CA-Alginat-Kitosan*, 2(1), 428–434.
27. Tarihoran, K. (2016). *Pembuatan Sensor Urea Dengan Immobilisasi Urease Pada Matriks PVA (Polyvinil Alcohol)*. Retrieved From [Http://Digilib.Unimed.Ac.Id/20990/9/9%20NIM%204122210007%20BAB%20I.Pdf](http://Digilib.Unimed.Ac.Id/20990/9/9%20NIM%204122210007%20BAB%20I.Pdf)
28. Sutrisno, A. (2017). *Teknologi Enzim*. Malang: UB Press.
29. Basmal, J., Utomo, B. S. B., Tazwir, Murdinah, Wikanta, T., Marraskuranto, E., & Kusumawati, R. (2014). *Membuat Alginat dari Rumput Laut Sargassum*. Jakarta: Penebar Swadaya.
30. Hartoto, L. (2008). *Imobilisasi Enzim*. Retrieved From [Http://Studylibid.Com/Doc/327020/Imobilisasi-Enzim-M.K-Enzim--S2-](http://Studylibid.Com/Doc/327020/Imobilisasi-Enzim-M.K-Enzim--S2-)

31. Sridianti, S. (2018). *Faktor yang Mempengaruhi Enzim*. Retrieved From <https://www.sridianti.com/faktor-mempengaruhi-aktivitas-enzim.html>
32. Isya, I. M., Roosdiana, A., & Sutrisno, S. (2014). *Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Xilanase Amobil dalam Kitosan*, 2(1), 333–339.
33. Saropah, D. A., Jannah, A., & Maunatin, A. (2012). *Kinetika Reaksi Enzimatis Ekstrak Kasar Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul*, 2(1), 34–45.

## LAMPIRAN

### Lampiran A. Tahapan Penelitian



## Lampiran B. Preparasi Larutan

### B.1 Akuades Steril

Sebanyak 250 mL akuades dimasukkan kedalam Erlenmeyer, ditutup dengan kapas kemudian disterilkan menggunakan autolaf pada *temperature* 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.

### B.2 Larutan Asam Asetat 0,2 M

Sebanyak 1.15 mL asam asetat glasial 100% ( $\rho = 1,05 \text{ g/mL}$ ; berat molekul = 60g/mol) diambil dengan pipet ukur 5 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian diencerkan dengan akuades.

### B.3 Larutan Natrium Asetat 0,2 M

Sebanyak 1,64 gram natrium asetat (BM:82,02 g/mol) dilarutkan dengan sedikit akuades dan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian diencerkan menggunakan akuades.

### B.4 Larutan 0,2 M Buffer Asetat pH 5

Sebanyak 25 mL larutan asam asetat 0,2 M diambil ke dalam gelas kimia, kemudian ditambahkan dengan 45,5 mL larutan natrium asetat 0,2 M kemudian diaduk hingga homogen.

### B.5 Larutan 0,2 M Buffer Asetat pH 6

Sebanyak 5 mL larutan asam asetat 0,2 M diambil ke dalam gelas kimia, kemudian ditambahkan dengan 91 mL larutan natrium asetat 0,2 M kemudian diaduk hingga homogen.

### B.6 Larutan Stok Xilosa 1500 $\mu\text{g/mL}$

Sebanyak 0,15 gram xilosa dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan menggunakan akuades.

### B.7 Reagen DNS

NaOH sebanyak 1 gram;  $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$  sebanyak 18,2 gram;  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  sebanyak 0,5 gram dan kristal fenol sebanyak 0,2 gram dilarutkan dengan akuades sebanyak 50 mL, kemudian ditambahkan 1 gram asam dinitrosalisilat sedikit demi sedikit sambil dilakukan



pengadukan menggunakan magnetic stirrer. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades.

### **B.8 Larutan Stok Kasein 10000 µg/mL**

Sebanyak 1 gram kasein dilarutkan dengan sedikit akuades, kemudian diaduk dan ditambahkan sedikit demi sedikit larutan NaOH 0,1 M hingga kasein larut. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades.

### **B.9 Reagen Biuret**

Sebanyak 0,15 gram  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dan 0,6 gram  $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$  dilarutkan dalam 30 mL akuades, ditambahkan 30 mL larutan NaOH 10% sambil dilakukan pengadukan. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades.

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

Sebanyak 10 gram NaOH dilarutkan dalam sedikit akuades, kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades.

### **B.11 Larutan NaOH 0,1 M**

Sebanyak 0,4 gram NaOH dilarutkan dalam sedikit akuades, kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades.

### **B.12 Larutan HCl 0,4 M**

Sebanyak 4 mL larutan HCl 32% dimasukkan dalam gelas kimia yang telah berisi akuades secukupnya. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades.

### **B.13 Larutan $\text{CaCl}_2$ 0,15 M**

Sebanyak 1,7 gram padatan  $\text{CaCl}_2$  dimasukkan dalam gelas kimia yang telah berisi akuades secukupnya. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades.

### **B.14 Substrat xilan 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%**

Sebanyak (0,1; 0,5; 1; 1,5; dan 2) gram xilan dilarutkan dalam sedikit larutan 0,2 M buffer asetat pH 5, kemudian larutan

dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga homogen.

### B.15 Air Bebas Reduktor

Sebanyak 250 mL akuades dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan beberapa tetes  $\text{KMnO}_4$  hingga berubah warna menjadi ungu. Kemudian larutan di destilasi, sehingga diperoleh air hasil destilasi atau air bebas reduktor yang tidak berwarna.

### B.16 Unsur Renik

$\text{Na}_2\text{EDTA}$  sebanyak 3,0225 gram;  $\text{NaOH}$  sebanyak 0,5 gram;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 0,25 gram;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 0,1 gram;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 0,1 gram;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 0,025 gram;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sebanyak 2,5 gram;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 0,025 gram;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 0,5 gram; dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat sebanyak 0,125 mL dimasukkan dalam Erlenmeyer. Ditambahkan akuades steril hingga 250 mL kemudian ditutup dengan kapas dan kasa. Larutan disterilkan menggunakan autoklaf pada *temperature*  $121^\circ\text{C}$  dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.

## Lampiran C. Perhitungan Preparasi Larutan

### C.1 Larutan Asam Asetat 0,2 M

Larutan asam asetat 0,2 M dibuat dari asam asetat glasial 100% ( $\rho = 1,05 \text{ g/mL}$ ; berat molekul =  $60 \text{ g/mol}$ ) dengan cara :

$$\begin{aligned} \text{M asam asetat glasial} &= \frac{\text{berat jenis}}{\text{berat molekul}} \\ &= \frac{1,05 \cdot 1000 \text{ g/L}}{60 \text{ g/mol}} \\ &= 17,5 \text{ M} \end{aligned}$$

Jadi untuk membuat konsentrasi 0,2 M dilakukan pengenceran dengan cara :

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

$$V_1 = 1,143 \text{ mL}$$

## C.2 Larutan Natrium Asetat 0,2 M

Larutan natrium asetat 0,2 M dibuat sebanyak 100 mL (BM:82,02 g/mol) dengan cara :

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

$$\begin{aligned} \text{Massa CH}_3\text{COONa} &= \text{mol CH}_3\text{COONa} \times \text{BM CH}_3\text{COONa} \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 82,02 \text{ g/mol} \\ &= 1,64 \text{ gram} \end{aligned}$$

## C.3 Pembuatan 0,2 M Buffer Asetat pH 5

$$\text{Ka asam asetat} = 1,8 \times 10^{-5}$$

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{pKa} - \log \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COONa}]} \\ 5 &= 4,74 - \log \frac{\frac{25 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mmol/mL}}{(25+v)\text{mL}}}{\frac{v \times 0,2 \text{ mmol/mL}}{(25+v)\text{mL}}} \\ 0,26 &= \left( - \log \frac{25 \text{ mL}}{v} \right) \\ 10^{-0,26} &= \frac{25 \text{ mL}}{v} \\ 0,55 &= \frac{25 \text{ mL}}{v} \\ v &= \frac{25 \text{ mL}}{0,55} \\ v &= 45,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, perbandingan volume  $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{CH}_3\text{COONa}$  adalah 25 mL : 45,5 mL.

### C.3 Pembuatan 0,2 M Buffer Asetat pH 6

$$K_a \text{ asam asetat} = 1,8 \times 10^{-5}$$

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

$$6 = 4,74 - \log \frac{\frac{5 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mmol/mL}}{(25+v)\text{mL}}}{\frac{v \times 0,2 \text{ mmol/mL}}{(25+v)\text{mL}}}$$

$$1,26 = (-\log \frac{5 \text{ mL}}{v})$$

$$10^{-1,26} = \frac{5 \text{ mL}}{v}$$

$$0,055 = \frac{5 \text{ mL}}{v}$$

$$v = \frac{5 \text{ mL}}{0,055}$$

$$v = 90,9 \text{ mL}$$

Jadi, perbandingan volume  $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{CH}_3\text{COONa}$  adalah 5 mL : 91 mL.

### C.4 Larutan NaOH 0,1 M

Larutan NaOH 0,1 M ( $M_r=40\text{g/mol}$ ) dibuat sebanyak 100 mL dengan cara :

$$\text{Mol NaOH} = [\text{NaOH}] \times v$$

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

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

$$\text{Massa NaOH} = \text{mol NaOH} \times M_r \text{ NaOH}$$

$$= 0,01 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol}$$

$$= 0,4 \text{ g}$$

Jadi untuk membuat larutan NaOH 0,1 M sebanyak 100 mL dibutuhkan 0,4 g padatan NaOH.

### C.5 Larutan HCl 0,4 M

Larutan HCl 0,4 M ( $M_r=36,5\text{g/mol}$ ;  $\rho = 1,2 \text{ g/mL}$ ) dibuat sebanyak 100 mL dengan cara :

$$\begin{aligned}\text{Massa HCl } 100\% \text{ dalam } 1 \text{ mL HCl} &= \rho \times v \\ &= 1,2 \text{ g/mL} \times 1 \text{ mL} \\ &= 1,2 \text{ g}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Massa HCl } 32\% \text{ dalam } 1 \text{ mL HCl} &= 32\% \times 1,2 \text{ g} \\ &= 0,384 \text{ g}\end{aligned}$$

$$\text{Volume HCl } 32\% \text{ dalam } 1 \text{ g HCl} = \frac{1 \text{ g}}{0,384 \text{ g}} \times 1 \text{ mL} = 2,6 \text{ mL}$$

$$\begin{aligned}\text{Massa HCl yang dibutuhkan untuk membuat } 100 \text{ mL HCl } 0,4 \text{ M} \\ \text{adalah} &= n \times M_r \text{ HCl} \\ &= (M \times V) \times M_r \text{ HCl} \\ &= (0,4 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L}) \times 36,5 \text{ g/mol} \\ &= 1,46 \text{ g}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Volume HCl yang diambil} &= 1,46 \text{ g} \times 2,6 \text{ mL/g} \\ &= 3,796 \text{ mL}\end{aligned}$$

### C.6 Larutan $\text{CaCl}_2$ 0,15 M

Larutan  $\text{CaCl}_2$  0,15 M ( $M_r=111\text{g/mol}$ ) dibuat sebanyak 100 mL dengan cara :

$$\begin{aligned}\text{Mol } \text{CaCl}_2 &= [\text{CaCl}_2] \times v \\ &= 0,15 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,015 \text{ mol}\end{aligned}$$

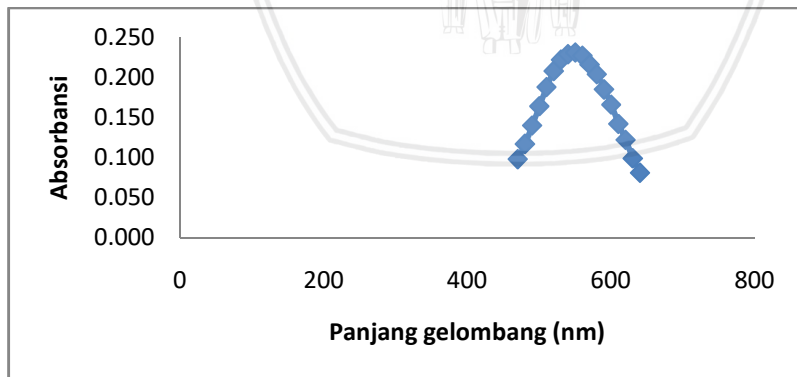
$$\begin{aligned}
 \text{Massa CaCl}_2 &= \text{mol CaCl}_2 \times \text{Mr CaCl}_2 \\
 &= 0,015 \text{ mol} \times 111 \text{ g/mol} \\
 &= 1,665 \text{ g}
 \end{aligned}$$

Jadi untuk membuat larutan  $\text{CaCl}_2$  0,15 M sebanyak 100 mL dibutuhkan 1,7 g padatan  $\text{CaCl}_2$ .

### Lampiran D. Panjang Gelombang Maksimum Kasein

**Tabel D.1** : Data Absorbansi Larutan Kasein pada  $\lambda$  (470-640) nm

$\lambda$	Absorbansi	$\lambda$	Absorbansi
470	0,098	560	0,227
480	0,117	570	0,216
490	0,140	580	0,204
500	0,164	590	0,185
510	0,188	600	0,166
520	0,208	610	0,142
530	0,222	620	0,122
540	0,229	630	0,099
550	0,231	640	0,081

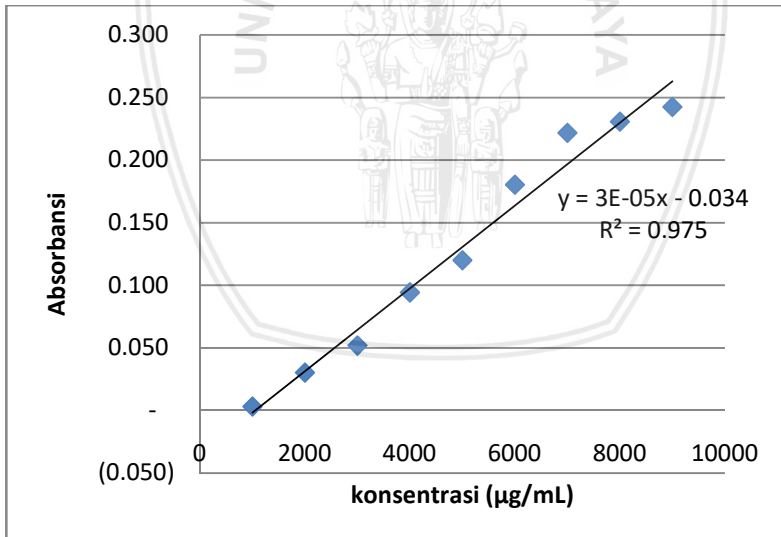


**Gambar D.1** : Panjang Gelombang Maksimum Kasein

### Lampiran E. Kurva Baku Larutan Standar Kasein

Tabel E.1 : Data Absorbansi Larutan Standar Kasein pada  $\lambda$  maks. 550 nm

Konsentrasi kasein ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi (A)			
	A1	A2	A3	$\bar{A}$
1000	0,003	0,005	0,002	0,003
2000	0,030	0,030	0,031	0,030
3000	0,052	0,052	0,052	0,052
4000	0,091	0,096	0,096	0,094
5000	0,120	0,120	0,120	0,120
6000	0,180	0,181	0,180	0,180
7000	0,221	0,222	0,222	0,222
8000	0,232	0,229	0,231	0,231
9000	0,241	0,241	0,245	0,242

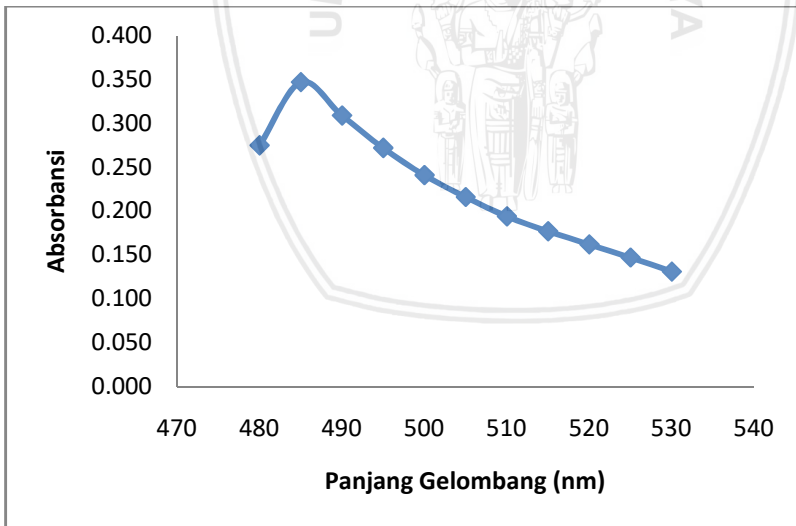


Gambar E.1 : Kurva Baku Larutan Standar Kasein

**Lampiran F. Panjang Gelombang Maksimum Xilosa**

**Tabel F.1 : Data Absorbansi Larutan Xilosa pada  $\lambda$  (480-530) nm**

$\lambda$ (nm)	Absorbansi (A)			
	A1	A2	A3	$\bar{A}$
480	0,275	0,256	0,259	0,263
485	0,347	0,348	0,348	0,348
490	0,309	0,310	0,309	0,309
495	0,272	0,275	0,275	0,274
500	0,241	0,242	0,241	0,241
505	0,216	0,218	0,219	0,218
510	0,194	0,193	0,195	0,194
515	0,177	0,178	0,178	0,178
520	0,162	0,167	0,165	0,165
525	0,147	0,146	0,148	0,147
530	0,131	0,132	0,132	0,132



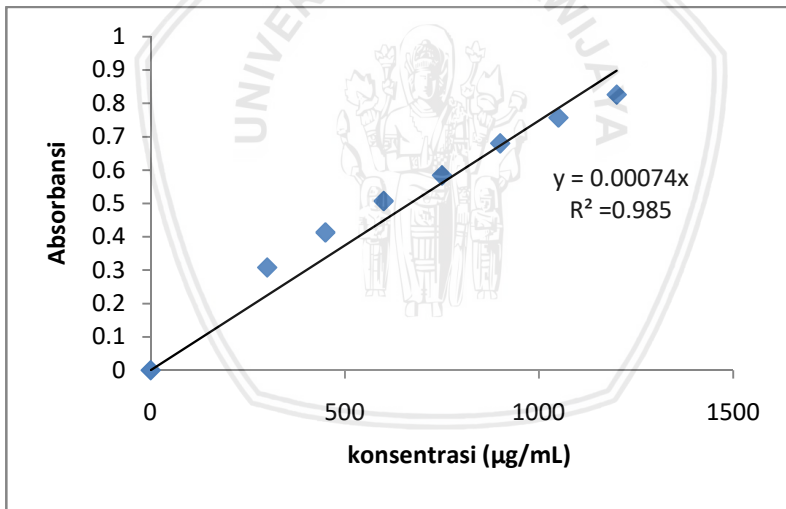
**Gambar F.1 : Panjang Gelombang Maksimum Xilosa**



## Lampiran G. Kurva Baku Larutan Standar Xilosa

Tabel G.1 : Data Absorbansi Larutan Standar Xilosa pada  $\lambda$  maks. 485 nm

Konsentrasi xilosa ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi (A)			
	A1	A2	A3	$\bar{A}$
300	0,317	0,301	0,307	0,308
450	0,425	0,404	0,411	0,413
600	0,527	0,495	0,500	0,507
750	0,614	0,561	0,578	0,584
900	0,699	0,670	0,672	0,680
1,050	0,768	0,752	0,750	0,757
1,200	0,847	0,815	0,817	0,826



Gambar G.1 : Kurva Baku Larutan Standar Xilosa

## Lampiran H. Kadar Protein Awal

Uji kadar protein awal menggunakan kurva baku kasein dengan persamaan garis linier  $y = 3 \cdot 10^{-5} x$  dan nilai koefisien

korelasi 0,975, sehingga dapat diketahui konsentrasi protein. Misal untuk nilai absorbansi sebesar 0,195, maka konsentrasi xilosa dapat dihitung sebagai berikut:

$$y = 0,00003x$$

$$0,195 = 0,00003x$$

$$x = 6500 \mu\text{g/mL}$$

Konsentrasi enzim = konsentrasi protein total – konsentrasi kasein

$$= 6500 \mu\text{g/mL} - 5000 \mu\text{g/mL}$$

$$= 1500 \mu\text{g/mL}$$

Massa protein awal =  $1500 \mu\text{g/mL} \cdot 12 \text{ mL} = 18000 \mu\text{g}$

Kadar protein awal =  $18000 \mu\text{g} : 2 \text{ mL}$

$$= 9000 \mu\text{g/mL}$$

$$= 9 \text{ mg/mL}$$

**Tabel H.1 : Konsentrasi Protein Awal Xilanase Bebas**

	Absorbansi (A)	Konsentrasi protein ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
I	0,191	1367
II	0,197	1567
III	0,196	1533
	<b>Rata-rata</b>	1489

### Lampiran I. Aktivitas Enzim Xilanase Bebas

Uji Aktivitas enzim xilanase bebas menggunakan kurva baku gula pereduksi dengan persamaan garis linier  $y = 0,00074x$  dan nilai koefisien korelasi 0,985, sehingga dapat diketahui konsentrasi xilosa.

Misal untuk nilai absorbansi sebesar 0,594, maka konsentrasi xilosa dapat dihitung sebagai berikut:

$$y = 0,00074x$$

$$0,594 = 0,00074x$$

$$x = 802,7 \mu\text{g/mL}$$

Dengan demikian dapat ditentukan aktivitas enzim xilanase bebas dengan rumus berikut:

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{X \times V \times fp}{p \times q} \\ &= \frac{802,7 \mu\text{g/mL} \times 6\text{mL} \times 25\text{mL}/6\text{m}}{1 \text{ mL} \times 55 \text{ menit}} \\ &= 364,9 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ menit}^{-1} \\ \text{AE bebas} &= \text{AE} / \text{Kadar protein awal} \\ &= \frac{364,9 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}}{9 \text{ mg mL}^{-1}} \\ &= 40,5 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ menit}^{-1} \end{aligned}$$

**Tabel I.1** : Aktivitas Enzim Xilanase Bebas

	Absorbansi (A)	Konsentrasi xilosa ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Aktivitas Enzim ( $\mu\text{g mg}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ )
I	0,594	802,70	40,54
II	0,582	786,49	39,72
III	0,606	818,92	41,36
	<b>Rata-rata</b>	802,70	40,54

### Lampiran J. Kadar Protein Sisa

Uji kadar protein sisa menggunakan kurva baku kasein dengan persamaan garis linier  $y = 3 \cdot 10^{-5} x$  dan nilai koefisien korelasi 0,975, sehingga dapat diketahui konsentrasi protein. Misal untuk nilai

absorbansi sebesar 0,193, maka konsentrasi xilosa dapat dihitung sebagai berikut:

$$y = 0,00003x$$

$$0,193 = 0,00003x$$

$$x = 6433,3 \mu\text{g/mL}$$

Konsentrasi enzim = konsentrasi protein total – konsentrasi kasein

$$= 6433,3 \mu\text{g/mL} - 5000 \mu\text{g/mL}$$

$$= 1433,3 \mu\text{g/mL}$$

Massa protein sisa =  $1433,3 \mu\text{g/mL} \cdot 7 \text{ mL} = 10033,1 \mu\text{g}$

Massa enzim terjebak = Massa protein awal – massa protein sisa

$$= 18000 \mu\text{g} - 10033,1 \mu\text{g}$$

$$= 7966,9 \mu\text{g}$$

$$= 7,97 \text{ mg}$$

$$= 8 \text{ mg}$$

**Tabel J.1** : Konsentrasi Protein Sisa Xilanase Amobil

	Absorbansi (A)	Konsentrasi protein( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
I	0,192	1400,0
II	0,194	1466,7
III	0,193	1433,3
	<b>Rata-rata</b>	1433,3

### Lampiran K. Aktivitas Enzim Xilanase Amobil

Uji aktivitas enzim xilanase amobil menggunakan kurva baku gula pereduksi dengan persamaan garis linier  $y = 0,00074x$  dan nilai koefisien korelasi 0,985, sehingga dapat diketahui konsentrasi xilosa.

Misal untuk nilai absorbansi sebesar 0,278, maka konsentrasi xilosa dapat dihitung sebagai berikut:

$$y = 0,00074x$$

$$0,278 = 0,00074x$$

$$x = 375,7 \mu\text{g/mL}$$

Dengan demikian dapat ditentukan aktivitas enzim xilanase amobil dengan rumus berikut:

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{X \times V \times fp}{p \times q} \\ &= \frac{375,7 \mu\text{g/mL} \times 6\text{mL} \times 25\text{mL}/6\text{mL}}{1 \text{ mL} \times 45 \text{ menit}} \\ &= 208,7 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ menit}^{-1} \\ \text{AE amobil} &= \text{AE} / \text{Kadar protein awal} \\ &= \frac{208,7 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}}{8 \text{ mg mL}^{-1}} \\ &= 26,1 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ menit}^{-1} \end{aligned}$$

**Tabel K.1** : Aktivitas Enzim Xilanase Amobil

	Absorbansi (A)	Konsentrasi xilosa ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Aktivitas Enzim ( $\mu\text{g mg}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ )
I	0,276	372,97	25,90
II	0,276	372,97	25,90
III	0,281	379,73	26,37
	<b>Rata-rata</b>	375,23	26,06

**Lampiran L. Pengaruh Penyimpanan dan Variasi Suhu terhadap Kestabilan Aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Enzim Xilanase yang diamobilkan Menggunakan Matriks Zeolit Ca-Alginat**

**Tabel L.1** : Data Absorbansi Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Bebas

Lama Penyimpanan (Hari)	Absorbansi (A)			
	-4°C	4°C	30°C	40°C
0	0,594	0,594	0,594	0,594
1	0,410	0,419	0,314	0,158
2	0,365	0,216	0,158	0,000
3	0,190	0,000	0,000	0,000

**Tabel L.2** : Data Absorbansi Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Amobil

Lama Penyimpanan (Hari)	Absorbansi (A)			
	-4°C	4°C	30°C	40°C
0	0,278	0,278	0,278	0,278
1	0,214	0,255	0,233	0,134
2	0,170	0,216	0,190	0,110
3	0,124	0,185	0,135	0,093
4	0,087	0,169	0,107	0,029

**Tabel L.3** : Data Konsentrasi Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Bebas

Lama Penyimpanan (Hari)	Konsentrasi Gula Pereduksi ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	-4°C	4°C	30°C	40°C
0	802,7	802,7	802,7	802,7
1	554,5	565,8	424,8	214,0
2	492,8	291,9	213,1	0,000
3	257,2	0,000	0,000	0,000

**Tabel L.4** : Data Konsentrasi Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Amobil

Lama Penyimpanan (Hari)	Konsentrasi Gula Pereduksi ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	-4°C	4°C	30°C	40°C
0	375,2	375,2	375,2	375,2
1	289,6	344,1	315,3	180,6
2	229,3	291,9	257,2	148,2
3	168,0	250,5	182,0	125,7
4	117,6	228,8	145,0	39,6

**Tabel L.5** : Data Aktivitas Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Bebas

Lama Penyimpanan (Hari)	Aktivitas ( $\mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ )			
	-4°C	4°C	30°C	40°C
0	40,5	40,5	40,5	40,5
1	28,0	28,6	21,5	10,8
2	24,9	14,7	10,8	0,0
3	13,0	0,0	0,0	0,0

**Tabel L.6** : Data Aktivitas Gula Pereduksi pada Variasi Suhu dan Lama Penyimpanan Enzim Amobil

Lama Penyimpanan (Hari)	Aktivitas ( $\mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ )			
	-4°C	4°C	30°C	40°C
0	26,1	26,1	26,1	26,1
1	20,1	23,9	21,9	12,5
2	15,9	20,3	17,9	10,3
3	11,7	17,4	12,6	8,7
4	8,2	15,9	10,1	2,8

## Lampiran M. Parameter Kinetika Enzimatis ( $V_M$ dan $K_M$ )

**Tabel M.1** : Data Absorbansi Gula Pereduksi pada Variasi Konsentrasi Xilan Enzim Bebas

Variasi konsentrasi xilan % (b/v)	Absorbansi (A)			
	A1	A2	A3	$\bar{A}$
0,1	0,057	0,057	0,057	0,057
0,5	0,090	0,090	0,093	0,091
1	0,259	0,257	0,261	0,259
1,5	0,230	0,228	0,230	0,229
2	0,219	0,227	0,225	0,224

**Tabel M.2** : Data Aktivitas Gula Pereduksi pada Variasi Konsentrasi Xilan Enzim Bebas

Variasi konsentrasi xilan % (b/v)	Konsentrasi rata-rata xilosa ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Aktivitas rata-rata Xilanase ( $\mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ )	$1/[S]$	$1/v$
0,1	77,0	3,9	10,0	0,256
0,5	123,0	6,2	2,0	0,161
1	350,0	17,7	1,0	0,056
1,5	309,9	15,7	0,7	0,064
2	302,3	15,3	0,5	0,065

### Perhitungan nilai $V_M$ dan $K_M$

Nilai  $V_M$  dan  $K_M$  ditentukan dari persamaan garis linier pada kurva hubungan antara  $1/[S]$  dengan  $1/v$ . Persamaan garis linier yang diperoleh yaitu  $y = 0,02x + 0,064$ . Rumus umum kinetika enzim adalah sebagai berikut:

$$1/v = K_M/V_M \times 1/[S] + 1/V_M$$

Dengan demikian dapat ditentukan nilai  $V_M$  dan  $K_M$  dengan cara:

$$1/V_M = 0,064$$



$$V_M = 1/0,064 = 15,625 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ menit}^{-1}$$

$$K_M/V_M = 0,02$$

$$K_M = 0,02 \times V_M$$

$$= 0,02 \times 15,625$$

$$= 0,3125\%$$

**Tabel M.3** : Data Absorbansi Gula Pereduksi pada Variasi Konsentrasi Xilan Enzim Amobil

Variasi konsentrasi xilan % (b/v)	Absorbansi (A)			
	A1	A2	A3	$\bar{A}$
0,1	0,018	0,015	0,018	0,017
0,5	0,095	0,088	0,070	0,084
1	0,180	0,175	0,175	0,177
1,5	0,115	0,157	0,160	0,144
2	0,083	0,078	0,091	0,084

**Tabel M.4** : Data Aktivitas Gula Pereduksi pada Variasi Konsentrasi Xilan Enzim Amobil

Variasi konsentrasi xilan % (b/v)	Konsentrasi rata-rata xilosa (mL <sup>-1</sup> )	Aktivitas rata-rata Xilanase Amobil (μg mg <sup>-1</sup> menit <sup>-1</sup> )	1/[S]	1/v
0,1	23,0	1,6	10,00	0,625
0,5	114,0	7,9	2,00	0,127
1	238,7	16,6	1,00	0,060
1,5	194,6	13,5	0,67	0,074
2	113,5	7,9	0,50	0,127

## Perhitungan nilai $V_M$ dan $K_M$

Nilai  $V_M$  dan  $K_M$  ditentukan dari persamaan garis linier pada kurva hubungan antara  $1/[S]$  dengan  $1/v$ . Persamaan garis linier yang diperoleh yaitu  $y = 0,058 x + 0,037$ . Rumus umum kinetika enzim adalah sebagai berikut:

$$1/v = K_M/V_M \times 1/[S] + 1/V_M$$

Dengan demikian dapat ditentukan nilai  $V_M$  dan  $K_M$  dengan cara:

$$1/V_M = 0,037$$

$$V_M = 1/0,037 = 27,03 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ menit}^{-1}$$

$$K_M/V_M = 0,058$$

$$\begin{aligned} K_M &= 0,058 \times V_M \\ &= 0,058 \times 27,03 \\ &= 1,57\% \end{aligned}$$

## Lampiran N. Efisiensi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil

**Tabel N.1** : Data Absorbansi Gula Pereduksi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil

Penggunaan ke-	Absorbansi (A)			
	A1	A2	A3	$\bar{A}$
1	0,276	0,276	0,281	0,278
2	0,254	0,251	0,254	0,253
3	0,172	0,169	0,169	0,170
4	0,163	0,162	0,155	0,160
5	0,142	0,149	0,140	0,144
6	0,123	0,122	0,121	0,122
7	0,117	0,113	0,107	0,112

**Tabel N.2 : Data Efisiensi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil**

Penggunaan ke-	Konsentrasi rata-rata xilosa ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Aktivitas rata-rata xilanase amobil ( $\mu\text{g mg}^{-1} \text{menit}^{-1}$ )	Efisiensi (%)
1	375,2	26,1	100
2	341,9	23,7	91,1
3	229,7	16	61,2
4	216,2	15	57,6
5	194,1	13,5	51,7
6	164,9	11,4	43,9
7	151,8	10,5	40,5

**Lampiran O. Analisis Statistika**

**Tabel O.1 : Pengaruh suhu penyimpanan**

- (n-1)(t-1)  $\geq 15$
- (n-1)(16-1)  $\geq 15$
- (n-1)(15)  $\geq 15$
- 15n-15  $\geq 15$
- n  $\geq 2$

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	5%	1%
Between Groups	157.707	3	52.569	3.916	.054	2.92	7.59
Within Groups	107.396	8	13.425				
Total	265.103	11					

F hitung(3,916) > F table 5% (2,92) <sub>(p=0,05)</sub>, sehingga dapat dikatakan bahwa variasi suhu yang diterapkan berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase amobil.

**Aktivitas**

Tukey HSD<sup>a</sup>

Parameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4.000	3	10.52100	
-	3	15.90133	15.90133
3.000	3	17.46567	17.46567
2.000	3		20.52033
Sig.		.172	.458

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Tabel O.2 : Pengaruh lama penyimpanan**

- (n-1)(t-1) ≥ 15
- (n-1)(16-1) ≥ 15
- (n-1)(15) ≥ 15
- 15n-15 ≥ 15
- n ≥ 2

**ANOVA**

Kadar Xilosa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	5%	1%
Between Groups	195.325	3	65.108	7.679	.010	2.92	8.45
Within Groups	67.829	8	8.479				
Total	263.154	11					

F hitung(7,679) > F table 5% (2,92)  $(p=0,05)$ , sehingga dapat dikatakan bahwa lama penyimpanan yang diterapkan berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase amobil.

### Aktivitas

Tukey HSD<sup>a</sup>

Parameter	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4.000	3	11.37600	
3.000	3	13.89933	
2.000	3	18.01800	18.01800
-	3		21.97000
Sig.		.089	.400

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Tabel O.3** : Penentuan  $V_M$  dan  $K_M$

$(n-1)(t-1)$	$\geq 15$
$(n-1)(15-1)$	$\geq 15$
$(n-1)(14)$	$\geq 15$
$14n-14$	$\geq 15$
$n$	$\geq 2,7$

### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	5%	1%
Between Groups	401.513	4	100.378	66.766	.000	3.478	5.994
Within Groups	15.034	10	1.503				
Total	416.547	14					

F hitung(66,766) > F table 1% (5,9943)  $(p=0,01)$ , sehingga dapat dikatakan bahwa variasi konsentrasi xilan yang diterapkan berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas xilanase amobil.

**Aktivitas**

Tukey HSD<sup>a</sup>

Parameter	N	Subset for alpha = 0,05		
		1	2	3
-	3	1.59533		
5.000	3		7.88300	
2.000	3		7.91400	
4.000	3			13.5133
				3
3.000	3			16.5793
				3
Sig.		1.000	1.000	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Tabel O.4 : Penggunaan Ulang**

- (n-1)(t-1) ≥ 15
- (n-1)(21-1) ≥ 15
- (n-1)(20) ≥ 15
- 20n-20 ≥ 15
- n ≥ 1,75

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	5%	1%
Between Groups	414.898	6	69.150	1293.267	.000	3.886	7.19
Within Groups	.374	7	.053				
Total	415.273	13					

F hitung (1293,2) > F table 1%(7,19) ( $p=0,01$ ), sehingga dapat dikatakan bahwa penggunaan ulang yang diterapkan berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas xilanase amobil.

### Aktivitas

Tukey HSD<sup>a</sup>

Parameter	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
7.000	2	10.792 04				
6.000	2	11.495 87				
5.000	2		13.654 28			
4.000	2			15.249 62		
3.000	2			16.000 38		
2.000	2				23.695 57	
-	2					25.900 90
Sig.		.150	1.000	.117	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.