

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

SKRIPSI

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

**Oleh:
FITRI RISKA MARDLOTILLA
155090201111016**



**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 Pasir Laut Ca-Alginat**

Oleh:

FITRI RISKA MARDLOTILLA
155090201111016

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

Pembimbing I

Pembimbing II

Drs. Sutrisno, M.Si
NIP.196203181990021001

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP.196304041989011001



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Masruki, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP.197310202002121001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fitri Riska Mardlotilla

NIM : 155090201111016

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

Penentuan Parameter Kinetik, Efisiensi Penggunaan Berulang dan Kestabilan Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Pasir Laut 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 bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang.....

Yang menyatakan,

(Fitri Riska Mardlotilla)

NIM. 155090201111016

repository.ub.ac.id

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

ABSTRAK

Xilanase merupakan enzim yang berfungsi sebagai katalis pada reaksi hidrolisis xilan menjadi gula pereduksi xilosa. Tujuan dari amobilisasi xilanase agar xilanase lebih stabil dan dapat digunakan lebih dari sekali pemakaian. Matriks yang digunakan untuk pengamobilan yaitu pasir laut dan Ca-alginat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi substrat xilan terhadap xilanase bebas dan amobil, nilai parameter kinetik xilanase bebas dan amobil, efisiensi penggunaan ulang xilanase amobil dan kestabilan xilanase bebas dan amobil berdasarkan variasi temperatur dan lama penyimpanan. Hasil penelitian diperoleh bahwa konsentrasi substrat xilan memengaruhi nilai aktivitas xilanase bebas dan amobil. Nilai aktivitas tertinggi terjadi pada konsentrasi substrat sebesar 1%, yaitu sebesar 18,6 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ pada xilanase bebas dan 39,8 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ pada enzim amobil. Nilai parameter kinetik V_{maks} dan K_M pada enzim bebas sebesar 15,89 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ dan 0,27%. Sedangkan pada xilanase amobil nilai V_{maks} dan K_M sebesar 38,17 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ dan 0,13%. Xilanase yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat dapat digunakan hingga lima kali pengulangan dengan aktivitas enzim sebesar 31,91 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ dan persen aktivitas sisa sebesar 52,96%. Kestabilan xilanase bebas tertinggi yaitu pada temperatur -4°C (*freezer*) selama dua hari penyimpanan dengan persen aktivitas sisa sebesar 61,5%. Sedangkan xilanase amobil terjadi pada suhu 4°C (*refrigerator*) selama tujuh hari penyimpanan dengan persen aktivitas sisa sebesar 50,2%.

Kata Kunci: Amobilisasi, Lama Penyimpanan, Substrat Xilan, Suhu, *Trichoderma viride*

repository.ub.ac.id

Determination of Kinetic Parameters, Efficiency of Repeated Use and Stability Xylanase Enzymes from *Trichoderma viride* that are Mobilized on the Matrix Sea Sand Ca-Alginat

ABSTRACT

Xylanase is an enzyme that functions as a catalyst in the hydrolysis reaction of xylan to xylose reducing sugar. The aim of xylanase immobilization is that xylanase is more stable and can be used more than once. The matrix used for immobilization is sea sand and Ca-alginate. This study aims to determine the effect of variations xylan substrates on free and immobilized enzymes, the value of kinetic parameters on free and immobilized xylanase, the efficiency of reuse of immobilized xylanase, and the stability of free and immobilized xylanase based on temperature and storage time variations. The results showed that xylan concentration affected the value of free and immobilized xylanase activity. The highest activity value occurs at xylan concentration of 1%, which is equal to 18.6 $\mu\text{g} / \text{mg} \cdot \text{minutes}$ on free enzymes and 39.8 $\mu\text{g} / \text{mg} \cdot \text{minutes}$ on immobilized enzymes. The value kinetic parameters V_{maks} and K_M for free xylanase were 15.89 $\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{minutes}$ and 0.27%. But the value of immobilized xylanase were 38.17 $\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{minutes}$ and 0.13%. The xylanase that was immobilized on the matrix sea sand Ca-alginate can be used up to five repetitions with enzyme activity of 31.91 $\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{minutes}$ and percent of residual activity of 52.96%. The highest stability of free xylanase occurs at -4°C (*freezer*) for two days of storage with a percentage of residual activity of 61.5%. While immobilized xylanase occur at 4°C (*refrigerator*) for seven days of storage with a percentage of residual activity of 50.2%.

Keywords: Immobilization, Duration of Storage, Xylan Substrates, Temperature, *Trichoderma viride*

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur Penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya dan juga wasilah dari Rosulullah SAW sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Penentuan Parameter Kinetik, Efisiensi Penggunaan Berulang dan Kestabilan Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Pasir Laut 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 hingga penulisan.
2. Dr. Sasangka P., M.S selaku Dosen pembimbing II yang telah memberikan saran dan bimbingan dalam pelaksanaan penelitian hingga penyusunan skripsi.
3. Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku Ketua Jurusan kimia yang telah memberikan dukungan dalam proses penyelesaian skripsi.
4. Lasemun dan Siti Asiyah selaku orang tua penulis, Lika Feri Fanani selaku kakak penulis dan Syukron Wildana Allansyah selaku adik penulis serta keluarga besar yang selalu mendoakan, memberi dukungan baik spiritual, materil, maupun motivasi kepada penulis.
5. Novia Anjelina dan Aknes Fransiska selaku rekan satu tim penelitian dan Bpk. Maryono selaku Laboran Biokimia atas semua dukungan semangat dan berbagi ilmu yang terkait penelitian ini.
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuannya hingga terselesaikan penelitian dan laporan skripsi 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. Amin.

Malang, Desember 2018

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Batasan Masalah	4
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Enzim Xilanase	5
2.2. Klobot Jagung	6
2.3. <i>Trichoderma viride</i>	6
2.4. Amobilisasi Enzim	6
2.5. Aktivitas Enzim	8
2.6. Parameter Kinetik	9
2.7. Ca-Alginat dan pasir laut	11
2.8. Metode Spektrofotometri	11
2.9. Hipotesis	12
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.2. Bahan dan Alat Penelitian	13
3.3. Tahapan Penelitian	14
3.4. Prosedur Kerja	15
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Produksi dan Isolasi Xilanase dari <i>Trichoderma viride</i>	25
4.2. Amobilisasi Xilanase pada Matriks Pasir Laut Ca-alginat	26
4.3. Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis	

Xilanase Bebas dan Amobil	29
4.3. Efisiensi Penggunaan ulang Enzim Amobil	31
4.3. Pengaruh Temperatur dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Xilanase Bebas dan Amobil	
Kestabilan Enzim Bebas dan Amobil	32
BAB V PENUTUP	
5.1. Kesimpulan	37
5.2. Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	43



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1: Struktur Molekul Xilan	6
Gambar 2.2: Kurva Lineweaver-Burk	10
Gambar 2.3: Struktur Ca-alginat	11
Gambar 4.1: Hidrolisis Xilan Menjadi Xilosa	27
Gambar 4.2: Kurva Hubungan Variasi Konsentrasi Substrat Xilan Terhadap Aktivitas Xilanase Bebas dan Amobil	29
Gambar 4.3: Kurva Hubungan $1/v$ dengan $1/[S]$ pada Xilanase Bebas dan Amobil	30
Gambar 4.4: Kurva Hubungan Aktivitas Enzim dengan Variasi Temperatur dan Lama Penyimpanan Enzim Amobil	34
Gambar D.1: Kurva Baku Kasein	49
Gambar E.1: Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa	51



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1: Data Penggunaan Ulang Xilanase Amobil	31
Tabel 4.2: Persen Aktivitas Sisa Xilanase Bebas pada Variasi Temperatur dan Lama Penyimpanan	32
Tabel 4.3: Data Persen Aktivitas Sisa Xilanase Amobil pada Variasi Temperatur dan Lama Penyimpanan	33
Tabel D.1: Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Kasein	48
Tabel D.2: Kurva Baku Kasein	49
Tabel E.1: Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Xilosa	50
Tabel E.2: Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa	50
Tabel F.1: Konsentrasi Protein Awal	51
Tabel G.1: Konsentrasi Protein Akhir	52
Tabel H.1: Konsentrasi Xilanase Bebas	53
Tabel H.2: Konsentrasi Xilanase Amobil	54
Tabel I.1: Data Absorbansi Variasi Substrat Xilanase Bebas	55
Tabel I.2: Aktivitas Xilanase Bebas pada Variasi Konsentrasi Substrat	55
Tabel I.3: Data Absorbansi Variasi Substrat Xilanase Amobil	56
Tabel I.4: Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi Konsentrasi Substrat	56
Tabel J.1: Data Absorbansi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil	57
Tabel J.2: Data Aktivitas Enzim Amobil pada Efisiensi Penggunaan Ulang	57
Tabel K.1: Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Temperatur -4°C (<i>freezer</i>)	58
Tabel K.2: Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Temperatur 4°C (<i>refrigerator</i>)	58
Tabel K.3: Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Temperatur 30°C	58
Tabel K.4: Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Temperatur 50°C	58
Tabel K.5: Data Aktivitas Enzim rata-rata pada Kestabilan Xilanase Bebas	59
Tabel K.6: Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Temperatur -4°C (<i>freezer</i>)	60
Tabel K.7: Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Temperatur 4°C (<i>refrigerator</i>)	60

Tabel K.8: Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Temperatur 30°C	61
Tabel K.9: Data Absorbansi Xilanase Amobil pada temperatur 50°C	61
Tabel K.10: Data Aktivitas Enzim rata-rata pada Kestabilan Xilanase Amobil	62
Tabel L.1: Uji ANOVA dan BNJ 5% pada Variasi Konsentrasi Substrat	63
Tabel L.2: Uji ANOVA dan BNJ 5% pada Pemakaian Ulang Enzim Amobil	65
Tabel L.3: Uji ANOVA dan BNJ 5% pada Variasi Temperatur dan Lama Penyimpanan Enzim Amobil	67



DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN A. Tahapan Penelitian	43
LAMPIRAN B. Preparasi Larutan	44
LAMPIRAN C. Perhitungan Preparasi Larutan	46
LAMPIRAN D. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku Kasein	48
LAMPIRAN E. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa	50
LAMPIRAN F. Penentuan Kadar Protein Awal	51
LAMPIRAN G. Penentuan Kadar Protein Akhir	52
LAMPIRAN H. Penentuan Aktivitas Enzim	52
LAMPIRAN I. Penentuan V_{maks} dan K_M xilanase	54
LAMPIRAN J. Efisiensi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil	56
LAMPIRAN K. Kestabilan Xilanase Berdasarkan Variasi Temperatur dan Lama Penyimpanan	57
LAMPIRAN L. Analisa Statistika	63



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan kompleks protein yang terdiri atas rantai peptida yang mampu secara efisien mengkatalisis reaksi biokimia. Enzim juga merupakan biokatalisator yang terdiri atas protein-protein [1]. Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim adalah derajat keasaman (pH), aktivator, inhibitor, konsentrasi enzim dan konsentrasi substrat [2]. Dalam bioteknologi modern penggunaan enzim berkembang begitu pesat. Banyak industri-industri yang memanfaatkan kerja enzim, baik dalam industri pangan maupun non pangan [3]. Salah satu jenis enzim yang mempunyai nilai jual yang tinggi adalah enzim xilanase. Xilanase adalah sekelompok enzim xilanolitik yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilooligosakarida. Xilanase terdiri atas unsur utama yaitu hemiselulosa yang merupakan salah satu jenis polisakarida terbesar di dalam sel tanaman. Xilanase merupakan jenis enzim ekstraseluler dan hampir semua komponennya termasuk protein tunggal [4].

Mikroorganisme yang sudah umum digunakan untuk menghasilkan xilanase adalah bakteri dan jamur. Bakteri dan jamur mempunyai peranan penting dalam kehidupan makhluk hidup karena kedua jenis makhluk ini mampu menghasilkan enzim yang tidak diproduksi oleh makhluk lain. Xilanase dari sumber mikroorganisme akan bersifat mesofilik yang mana enzim akan bekerja pada temperatur (40-60)°C dan pada pH netral (4,0-6,0) [4]. Xilanase yang diproduksi oleh bakteri dan jamur memiliki perbedaan karakteristik baik pada temperatur dan pH optimumnya [3]. Xilanase yang berasal dari jamur akan lebih suka pada kondisi asam dari pada xilanase yang berasal dari bakteri [5].

Produksi xilanase oleh mikroorganisme memerlukan substrat sebagai penginduksi yaitu xilan. Xilan merupakan komponen penyusun hemiselulosa terbesar yang merupakan polimer dari pentosa yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4-D-xilosa yang tersusun atas 150-200 monomer xilosa. Pada dinding sel tumbuhan, xilan banyak ditemukan berinteraksi dengan lignin dan komponen karbohidrat lainnya. Xilan dapat larut dalam larutan alkali, seperti pada NaOH dan

KOH. Xilan merupakan komponen polisakarida non selulosa terbanyak yang terdapat pada kayu keras dan tumbuhan tahunan [4].

Isolasi xilanase dilakukan dengan cara disentrifugasi untuk memisahkan ekstrak kasar dengan endapannya, supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar xilanase. Ekstrak kasar tersebut masih mengandung protein-protein non enzim dan aktivitas protein yang masih rendah sehingga perlu untuk dimurnikan [6]. Selain itu enzim juga perlu diamobilisasi. Amobilisasi enzim memiliki banyak sekali keuntungan, salah satunya ialah mengurangi transformasi produk yang berlebih. Namun amobilisasi enzim juga memiliki banyak kekurangan yaitu biaya produksi pengamobilan yang tinggi dan hilangnya aktivitas biokatalis selama amobilisasi. Adapun cara sederhana untuk membuat enzim amobil yaitu dengan menempelkan enzim pada adsorben atau media padat [4]. Media padat yang sering digunakan adalah zeolit, alumina dan silika [7]. Silika merupakan mineral alam yang mempunyai rumus kimia SiO_2 . Silika paling banyak ditemukan dalam pasir laut yang memiliki kandungan silika lebih dari 50%, sehingga dapat digunakan sebagai adsorben alami karena memiliki ukuran pori dan luas permukaan yang besar [8]. Selain penggunaan media padat, juga dapat digunakan larutan Ca-alginat sebagai media gel untuk penjebakan [9].

Pada penelitian sebelumnya xilanase bebas stabil pada temperatur 60°C dengan lama penyimpanan 24 jam [10]. Penelitian lain menyatakan bahwa ekstrak kasar xilanase memiliki nilai K_M sebesar 0,25% dan nilai V_{maks} sebesar $27,85 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ [11]. Hal ini berbeda sekali dengan xilanase yang diamobilkan pada matriks pasir laut yang stabil pada temperatur 60°C hingga 6 hari lama penyimpanan dengan persen aktivitas enzim sisa sebesar 50,74% (42,01 unit) [12]. Sedangkan xilanase hasil filtrasi gel yang diamobilkan pada matriks pasir laut memiliki kestabilan tertinggi pada temperatur rendah yaitu 4°C hingga 6 hari lama penyimpanan [13]. Penyimpanan pada temperatur rendah bertujuan untuk meminimalisir terjadinya denaturasi protein dan serangan dari protease yang aktif pada temperatur $35\text{-}40^\circ\text{C}$ [12]. Menurut Adiningtyas [7] xilanase yang diamobilkan pada matriks pasir laut dapat digunakan hingga 4 kali pengulangan dengan nilai aktivitas enzim sisa sebesar $69,02 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ dan persen aktivitas enzim sisa sebesar 60,15% serta diperoleh nilai K_M sebesar 0,593% dan nilai V_{maks} sebesar $162,492$

$\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$. Penurunan aktivitas enzim dapat dikurangi dengan mencampurkan enzim yang teradsorp dengan suatu polimer seperti alginat. Pasir laut akan mengikat enzim pada permukaan dan alginat akan menjebak enzim ketika diamobilisasi. Sehingga difusi enzim akan terhambat setelah dijebak oleh polimer dan enzim akan memiliki stabilitas yang lebih tinggi.

Selanjutnya pada penelitian ini akan dipelajari lebih lanjut tentang parameter kinetik, efisiensi penggunaan ulang dan pengaruh temperatur dan lama penyimpanan terhadap kestabilan xilanase bebas dari *Trichoderma viride* serta yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat. Sebelumnya diperoleh nilai konsentrasi enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat sebesar $3,5 \text{ mg/mL}$ dengan aktivitas enzim sebesar $16,79 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ dan konsentrasi alginat sebesar $3\% \text{ w/v}$ dengan aktivitas enzim sebesar $14,25 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ [14]. Penelitian lebih lanjut diperoleh nilai kondisi optimum xilanase bebas yaitu pada pH 6, temperatur 50°C , dan waktu inkubasi selama 55 menit, sedangkan kondisi optimum xilanase amobil yaitu pada pH 6, temperatur 60°C , dan waktu inkubasi selama 50 menit [15].

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dituliskan, maka dihasilkan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi substrat xilan terhadap aktivitas xilanase bebas dari *Trichoderma viride* serta yang diamobilkan pada pasir laut Ca-Alginat?
2. Bagaimana nilai parameter kinetik xilanase bebas dari *Trichoderma viride* serta yang diamobilkan pada pasir laut Ca-Alginat?
3. Bagaimana efisiensi penggunaan ulang xilanase dari *Trichoderma viride* yang diamobilkan pada pasir laut Ca-Alginat?
4. Bagaimana pengaruh temperatur dan lama penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas xilanase bebas dari *Trichoderma viride* serta yang diamobilkan pada pasir laut Ca-Alginat?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Induser yang digunakan pada produksi xilanase dari *Trichoderma viride* adalah klobot jagung.
2. Enzim yang digunakan adalah xilanase bebas dan amobil dengan menggunakan matriks pasir laut Ca-Alginat
3. Variasi temperatur yang digunakan yang digunakan adalah -4°C (*freezer*), 4°C (*refrigerator*), 30°C (ruang) dan 50°C yang diinkubasi selama (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) hari.
4. Variasi konsentrasi substrat xilan sebesar (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2) % (w/v).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi xilan terhadap aktivitas xilanase bebas dari *Trichoderma viride* serta yang diamobilkan pada pasir laut Ca-Alginat.
2. Mengetahui nilai parameter kinetik xilanase bebas dari *Trichoderma viride* serta yang diamobilkan pada pasir laut Ca-Alginat.
3. Mengetahui efisiensi penggunaan ulang xilanase dari *Trichoderma viride* yang diamobilkan pada pasir laut Ca-Alginat.
4. Mengetahui pengaruh temperatur dan lama penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas xilanase bebas dari *Trichoderma viride* serta yang diamobilkan pada pasir laut Ca-Alginat.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh konsentrasi substrat xilan terhadap aktivitas xilanase bebas dari *Trichoderma viride* serta yang diamobilkan pada pasir laut Ca-Alginat, nilai parameter kinetik pada xilanase bebas dan amobil, efisiensi penggunaan ulang, serta pengaruh temperatur dan lama penyimpanan terhadap kestabilan xilanase bebas dan amobil.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

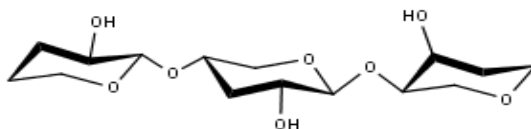
2.1 Enzim Xilanase

Enzim adalah biomolekul berupa protein berbentuk bulat (globular) yang terdiri atas satu atau lebih rantai polipeptida [16]. Enzim dapat berfungsi sebagai katalis yang bisa mempercepat reaksi tanpa mengalami perubahan dan produk samping [17]. Aktivitas kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, , pH, aktivator, dan inhibitor [2].

Salah satu enzim yang mempunyai nilai komersial tinggi adalah xilanase. Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa (xilan) menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Berat molekul xilanase umumnya antara 15.000-30.000 Dalton, dan aktif pada temperatur 55°C dan pH 9 [3].

Xilanase merupakan kelompok enzim ekstraseluler yang dapat diproduksi oleh bakteri dan jamur [18]. Xilanase yang diproduksi oleh bakteri dan jamur memiliki perbedaan karakteristik baik pada suhu dan pH optimumnya [3]. Xilanase yang berasal dari jamur akan lebih suka pada kondisi asam dari pada xilanase yang berasal dari bakteri [5].

Xilan termasuk jenis hemiselulosa, kelompok polisakarida terbesar setelah selulosa dan merupakan salah satu komponen terbesar penyusun struktur dinding sel. Xilan mempunyai substituent yang berada pada cincin struktur inti xilan. Pada umumnya jenis substituen tersebut adalah asetil, arabinosil dan glukuronosil. Adapun kandungan xilan pada tanaman ialah sekitar 30% dari berat tanaman kering [5]. Berikut adalah molekul struktur xilan [5]



Gambar 2.1 Struktur Molekul Xilan

2.2 Klobot Jagung

Kulit jagung merupakan bagian dari tanaman yang berfungsi untuk melindungi biji jagung. Pemanfaatan limbah kulit jagung pada masyarakat masih terlihat belum maksimal, yaitu hanya sebatas digunakan untuk kesenian dan makanan ternak saja. Padahal kulit jagung mengandung beberapa senyawa kimia yang bermanfaat, yaitu lignin (15%), abu (5,09%), alkohol-sikloheksana (4,57%), dan hemiselulosa (44,08%) [19].

Tingginya kandungan hemiselulosa pada klobot jagung dapat dijadikan sebagai sumber xilan untuk memproduksi xilanase. Menurut Ningsih [20] proses pembuatan pada saat ini dapat dibuat dari bahan non kayu, yaitu dengan cara memanfaatkan kandungan hemiselulosa pada kulit jagung.

2.3 *Trichoderma viride*

Trichoderma viride adalah salah satu jenis kapang yang dapat menghasilkan xilanase melalui proses fermentasi. Kelebihan *Trichoderma viride* dibandingkan dengan jenis kapang lainnya, yaitu dapat tumbuh cepat di berbagai substrat, dan mampu berkembang biak pada pH asam (2-5), serta dapat tumbuh maksimum pada temperatur 60°C [21]. Menurut Resita [22] *Trichoderma viride* dapat dikembangbiakkan dengan cara diinkubasi pada kamar selama 7 hari. *Trichoderma viride* merupakan salah satu jenis kapang yang paling banyak ditemukan, karena kapang ini tidak membutuhkan nutrisi khusus untuk pertumbuhannya [16].

2.4 Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim adalah suatu cara untuk menghasilkan enzim yang mudah dipisahkan dari substrat. Pengamobilan enzim bertujuan agar enzim tetap dalam keadaan stabil dan dapat

digunakan berulang-ulang. Terdapat beberapa cara untuk membuat enzim amobil, diantaranya adalah melarutkan enzim pada butiran alginat atau menjebak enzim dengan menggunakan matriks [1].

Enzim amobil bersifat lebih unggul daripada enzim bebas. Dimana enzim amobil dapat digunakan hingga beberapa kali pengulangan, kondisi ini ditandai pada pengukuran aktivitas enzim amobil. Semakin besar aktivitas suatu enzim, maka stabilitasnya juga semakin besar [23], sehingga penggunaan enzim amobil lebih efisien daripada penggunaan enzim bebas. Amobilisasi enzim dapat dilakukan dengan beberapa metode, antara lain adsorpsi, penjebakan dan ikatan silang [24].

Metode adsorpsi didasarkan pada keterikatan enzim secara non kovalen. Interaksi yang terjadi antara enzim dan substrat dapat berupa ikatan hidrogen dan gaya Van der Waals. Amobilisasi enzim dengan metode adsorpsi dibagi menjadi dua yaitu adsorpsi fisika dan adsorpsi kimia. Pada adsorpsi fisika, enzim diadsorpsi pada bagian permukaan matriks berdasarkan gaya Van der Waals yang terjadi antar materi. Adsorpsi kimia merupakan adsorpsi berdasarkan pembentukan ikatan hidrogen dan kovalen antara enzim dengan matriks. Keuntungan dari metode ini adalah mudah dilakukan, memiliki efek perubahan konformasi enzim yang kecil dan mudah untuk meregenerasi enzim yang tidak aktif. Namun kelemahan dari metode ini adalah dapat terjadi desorpsi yang disebabkan oleh perubahan-perubahan lingkungan yang terjadi [24].

Metode penjebakan dapat dilakukan dalam kondisi enzim dan matriks dalam fase yang sama, enzim dan matriks berada dalam sistem larutan. Kemudian larutan yang terbentuk dikeringkan, baik dengan cara penguapan maupun melalui proses pembentukan sol-gel. Sedangkan dalam fase berbeda, enzim berada dalam fase larutan dan matriks berada dalam fase padatan. Pada kondisi ini proses amobilisasi hampir sama dengan teknik adsorpsi, hanya saja pada metode penjebakan ini ditekankan bahwa antara enzim dan matriks tidak mengalami interaksi kimia hanya enzim terperangkap secara fisik saja [25].

repository.ub.ac.id

Metode ikatan silang didasarkan pada pembentukan ikatan kovalen antara enzim dengan matriks dengan atau tanpa penambahan pengikat silang yang sering digunakan adalah glutaraldehyd. Gugus fungsi enzim yang terikat secara ikatan silang adalah gugus amin dari lisin dan gugus fungsi lain, seperti gugus hidroksi -OH dari tirosin. Kelemahan metode ikatan silang ini adalah terjadinya perubahan konformasi enzim dan adanya distorsi konformasi enzim aktif selama proses berlangsung. Hal ini menyebabkan menurunnya aktivitas dari suatu enzim [24].

Enzim amobil memiliki stabilitas yang naik turun, hal ini dikarenakan adanya perubahan-perubahan lingkungan yang terjadi. Ketika enzim amobilisasi, aktivitas dari suatu enzim akan menurun dikarenakan terjadinya konformasi enzim saat proses reaksi berlangsung sehingga menyebabkan enzim tidak mampu berikatan dengan substrat. Selain itu, stabilitas enzim amobil juga dipengaruhi oleh matriks yang digunakan [24].

2.5 Aktivitas Enzim

Aktivitas suatu enzim dapat diketahui dengan mengukur konsentrasi gula pereduksinya, yaitu xilo-oligosakarida dan xilosa. Konsentrasi gula pereduksi dapat dihitung menggunakan metode DNS [26]. Metode DNS (Dinitrosalisilat) ialah metode pengukuran gula pereduksi dengan teknik kolorimetri. Pada metode ini, gugus aldehyd pada suatu sampel akan dioksidasi dengan asam, dan selanjutnya dipanaskan pada suhu (90-100)°C. Pada kondisi basa, maka akan dihasilkan senyawa amino salisilat yang mana absorbansinya dapat diukur pada panjang gelombang 540 nm [27].

Aktivitas xilanase dinyatakan dalam satuan internasional unit atau yang biasa dikenal dengan IU. Satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya enzim yang dapat merubah substrat menjadi 1 µmol produk per menit pada keadaan optimum [19] dan pada temperatur 25°C [26].

Menurut Sutrisno [4] faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah, pH, inhibitor, konsentrasi enzim dan substrat.

- a. Temperatur
Ketika temperatur dalam keadaan meningkat, maka kecepatan reaksi juga akan meningkat. Kondisi dimana kecepatan reaksi akan mencapai titik maksimal, itulah yang disebut dengan suhu optimum. Pada keadaan inilah reaksi enzimatik berlangsung secara maksimal.
- b. pH
Setiap enzim memiliki profil yang berbeda dengan pH dan lingkungannya. Sebagian besar enzim aktif dalam pH 4,5-8. pH optimum menunjukkan bahwa enzim berada pada aktivitas optimum. Namun apabila pH berada dibawah pH optimum, maka reaksi enzimatik yang berlangsung kurang maksimal.
- c. Inhibitor
Inhibitor dibagi menjadi dua jenis, yaitu inhibitor kompetitif dan inhibitor non-kompetitif. Inhibitor kompetitif adalah suatu penghambat yang bersaing dengan substrat untuk mendapatkan sisi aktif. Sedangkan pada inhibitor non-kompetitif penghambat tidak berebut untuk mendapatkan sisi aktif, namun menempel pada sisi enzim yang lain.
- d. Konsentrasi enzim dan substrat
Peningkatan konsentrasi enzim pada substrat, maka akan meningkatkan kecepatan reaksi. Namun pada suatu titik tertentu, penambahan konsentrasi substrat tidak akan memengaruhi kecepatan reaksi dikarenakan enzim telah mengalami kejenuhan.

2.6 Parameter Kinetik (K_M dan V_{maks})

Penentuan nilai K_M dan V_{maks} pada suatu enzim didasarkan pada penggunaan konstanta Michaelis-Menten dimana semakin banyak konsentrasi substrat yang ditambahkan, maka laju reaksi suatu enzim akan semakin besar [28], tetapi setelah [S] meningkat lebih lanjut enzim akan mengalami laju reaksi yang tetap. Kondisi dimana V tidak dapat berubah lagi akibat ditambahkannya [S] disebut dengan V_{maks} [29].

Hubungan penambahan konsentrasi substrat [S] dengan laju reaksi V dapat dinyatakan melalui persamaan Michaelis-Menten [22] sebagai berikut:

$$V_o = \frac{v_{maks} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

dengan:

V_o = kecepatan awal konsentrasi substrat [S]

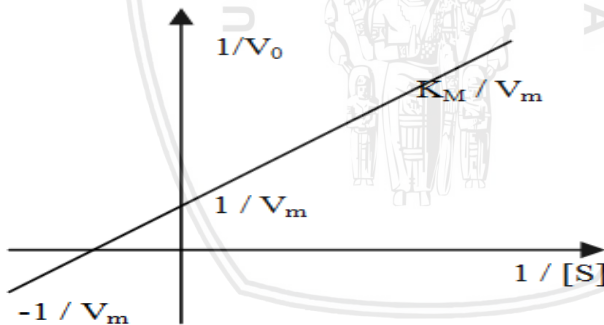
V_{maks} = kecepatan maksimum

K_M = tetapan Michaelis-Menten

Persamaan Michaelis-Menten yang sering digunakan adalah perbandingan terbalik ganda atau yang sering disebut dengan Lineweaver-Burk [30].

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{v_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{maks}}$$

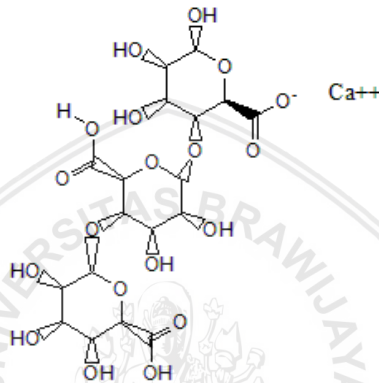
Selanjutnya, penentuan K_M dan V_{maks} juga dapat ditentukan dengan plot Lineweaver-Burk [30].



Gambar 2.2 Kurva Lineweaver-Burk

2.7 Ca-Alginat dan Pasir Laut

Alginat merupakan polisakarida hasil ekstraksi dari rumput laut cokelat (*Phaeophyceae*) seperti *Laminaria* dan *Sargassum*. Alginat membentuk garam yang larut dalam air dengan, Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ dan lain-lain [31]. Alginat jika bereaksi dengan Ca^{2+} akan membentuk suatu gel yang kokoh, kuat dan tidak beracun dikarenakan kalsium tidak larut dalam air kecuali pada $pH > 7$ [32]. Berikut adalah gambar struktur Ca-alginat [32].



Gambar 2.3 Struktur Ca-alginat

Silika (SiO_2) merupakan mineral yang tersebar secara luas di alam dan banyak ditemukan dalam bentuk pasir. Pasir laut memiliki kandungan silika lebih dari 50% sehingga dapat digunakan sebagai adsorben alami karena memiliki ukuran pori yang besar [34]. Untuk meningkatkan kualitas penyerapan pasir laut, maka perlu dilakukan proses aktivasi yang dapat dilaksanakan baik secara fisik maupun kimia. Aktivasi secara fisik dapat dilakukan melalui proses pemanasan sedangkan secara kimia dapat dilakukan dengan penambahan HCl [35].

2.8 Metode Spektrofotometri

Pengukuran dengan menggunakan metode spektrofotometri yaitu berdasarkan absorpsi cahaya pada panjang gelombang tertentu melalui suatu larutan yang mengandung senyawa dan akan ditentukan konsentrasinya. Spektrofotometri

repository.ub.ac.id

menggunakan panjang gelombang pada gelombang ultraviolet dan gelombang inframerah. Prinsip kerja metode spektrofotometri yaitu jumlah cahaya yang diabsorpsi oleh larutan sebanding dengan konsentrasi senyawa pada larutan. Hal ini sesuai dengan Hukum Lambert Beer [36] :

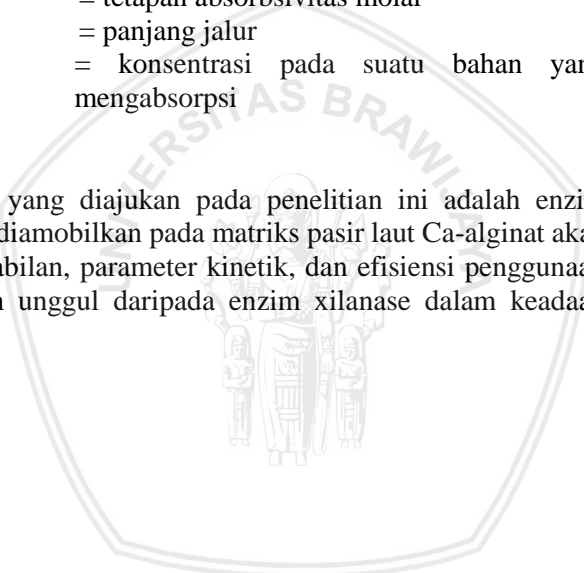
$$A = \log (I_{in}/I_{out}) = (1/T) = a \times b \times c$$

Keterangan :

- A = Absorbansi
- I_{in} = Intensitas cahaya masuk
- I_{out} = Intensitas cahaya keluar
- a = tetapan absorpsivitas molar
- b = panjang jalur
- c = konsentrasi pada suatu bahan yang mengabsorpsi

2.9 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat akan memiliki kestabilan, parameter kinetik, dan efisiensi penggunaan berulang lebih unggul daripada enzim xilanase dalam keadaan bebas.



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang pada bulan September sampai November 2018.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya gelas kimia (250 mL, 100 mL), erlenmeyer (250 mL, 50 mL), pipet ukur (10 mL, 1 mL), pipet tetes, labu ukur (100 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*), ayakan 150 mesh, pH meter, neraca analitik (*Mettler Toledo AL 204*), oven (*Memmert*), pemanas listrik (*Janke-Kunkel*), autoklaf (*All American Model 20X*), *Laminar Air Flow*, inkubator (*Heraeus type B 5042*), lemari pendingin, pengocok (*Shaker type Edmund Buhler SM 25 24.B*), sentrifuse (*Tomy MX-305*), penangas air (*Memmert W 200*), *Grinder*, blender, *Spectronic Genesys 20*, kuvet, Tanur (*Nabertherm*).

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah *Trichoderma viride* yang diperoleh di Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya dan klobot jagung. Selain itu bahan-bahan kimia yang sifatnya pro analisis (p.a) seperti dextrosa, asam asetat glasial, CH_3COONa , KH_2PO_4 , 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), xilosa, DNS (asam dinitrosalisilat), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaOH, HCl, Kristal fenol, KMnO_4 , Na-alginat, tween-80 dan Na_2SO_3 . Terdapat bahan yang sifatnya *for microbiology* seperti urea, pepton, tepung agar, xilan, pasir laut, unsur renik dan kasein (Merck). Sedangkan bahan lainnya yaitu aquades, air bebas reduktor, kentang dan tepung klobot jagung.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam 16 tahap yang berkesinambungan 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 kurva baku gula pereduksi xilosa
 - a. Penentuan panjang gelombang maksimal gula pereduksi xilosa
 - b. Pembuatan kurva baku gula pereduksi xilosa
9. Penentuan aktivitas xilanase bebas
 - a. Pengujian aktivitas xilanase bebas
 - b. Pengukuran aktivitas xilanase bebas
10. Amobilisasi xilanase pada matriks pasir laut Ca-alginat
 - a. Preparasi matriks pasir laut
 - b. Aktivasi matriks pasir laut
 - c. Preparasi larutan Na-alginat
11. Penentuan kadar protein sisa
12. Uji aktivitas xilanase amobil
 - a. Penentuan aktivitas xilanase amobil
 - b. Pengukuran aktivitas xilanase amobil
13. Penentuan K_M dan V_{maks}
 - a. Penentuan K_M dan V_{maks} xilanase bebas
 - b. Penentuan K_M dan V_{maks} xilanase amobil
14. Penentuan efisiensi penggunaan berulang xilanase amobil
15. Penentuan kestabilan xilanase bebas dan amobil berdasarkan variasi dan lama penyimpanan
16. Analisis data

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan tepung klobot jagung

Klobot jagung dicuci dengan air mengalir hingga bersih dan dikeringkan dalam oven pada temperatur 100°C. Setelah kering, klobot jagung dipotong kecil-kecil dan kemudian dihancurkan dengan menggunakan *grinder*. Klobot jagung yang sudah dihancurkan, kemudian diblender untuk memperhalus ukurannya. Setelah itu, klobot jagung diayak dengan menggunakan ayakan 150 mesh. Serbuk halus yang lolos ditampung dalam wadah dan digunakan sebagai induser.

3.4.2 Pembuatan media padat

Potatoes Dextrose Agar (PDA) merupakan media padat yang digunakan untuk menumbuhkan kapang *Trichoderma viride*. PDA dapat dibuat dengan cara kentang yang telah dikupas, dipotong kecil-kecil dan ditimbang sebanyak 20 g. Kemudian potongan kentang dicuci dengan menggunakan aquades. Setelah itu kentang dimasak dalam 100 mL air mendidih selama 1 jam. Sese kali ditambahkan aquades agar volumenya tetap 100 mL. Selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring, sehingga diperoleh sari kentang. Sari kentang tersebut selanjutnya ditambahkan dextrose sebanyak 2 g, 1 mL buffer asetat (0,2 M) pH 5, lalu dipanaskan kembali hingga mendidih dan ditambah 1,5 g tepung agar sambil diaduk. Larutan PDA dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk, lalu dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 4 mL, ditutup dengan kapas, dan dilapisi dengan kertas coklat. Larutan PDA tersebut disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 15 psi. Larutan PDA yang sudah disterilkan kemudian didinginkan pada temperatur ruang dengan posisi miring, sehingga diperoleh media padat PDA.

3.4.3 Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*

Jarum ose disiapkan, kemudian mulut tabung biakan murni *Trichoderma viride*, jarum ose dan mulut tabung media padat disterilkan dengan cara dipanaskan pada nyala api Bunsen. Setelah disterilkan, tabung media padat dan biakan murni *Trichoderma viride* dipindahkan ke dalam *Laminar Air Flow* secara cepat. Lalu spora

Trichoderma viride diambil sebanyak satu mata ose, dipindahkan ke media padat PDA steril secara aseptis. Kemudian tabung media padat tersebut ditutup dengan kapas dan dilapisi kertas coklat. Selanjutnya diinkubasi pada inkubator selama 144 jam (6 hari) pada temperatur 30°C.

3.4.4 pembuatan media cair

Sebanyak 0,054 g KH_2PO_4 ; 0,054 g CaCl_2 ; 0,252 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,054 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,09 g pepton; 0,054 g urea ; 0,036 g tween-80 ; 0,18 mL unsur renik, dan 0,9 g tepung klobot jagung ditimbang dengan neraca analitik. Semua bahan dimasukkan dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan aquades hingga volumenya 180 mL. Selanjutnya ditambahkan 1 mL larutan buffer asetat (0,2) pH 5. Setelah itu larutan media cair diaduk, ditutup dengan kapas, dilapisi kertas coklat dan diikat dengan karet serta dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C pada 15 psi selama 15 menit.

3.4.5 Pembuatan Inokulum

Jarum ose disiapkan, kemudian mulut tabung hasil biakan murni *Trichoderma viride* yang telah berumur 6 hari, dan jarum ose disterilkan dengan cara dipanaskan pada nyala api Bunsen. Setelah disterilkan, tabung hasil biakan murni *Trichoderma viride* dipindahkan ke dalam *Laminar Air Flow* secara cepat. Lalu spora *Trichoderma viride* diambil dengan menggunakan jarum ose dan dipindahkan secara aseptis kedalam erlenmeyer 50 mL yang sudah berisi 25 mL media cair steril. Kemudian dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang hingga mencapai pertengahan fase logaritma (36 jam). Kemudian larutan inokulum 1 yang telah dikocok diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan kedalam 4 erlenmeyer yang berisi media cair sebanyak 50 mL secara aseptis. Selanjutnya dikocok kembali menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang hingga mencapai pertengahan fase logaritma (36 jam).

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

Larutan inokulum diambil sebanyak 18 mL, kemudian dimasukkan ke dalam 8 erlenmeyer yang berisi media cair steril sebanyak 180 mL secara aseptis didalam *Laminar Air Flow*. Campuran dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang selama 60 jam. Kemudian ditambah 16 mL buffer asetat pH 5 dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim xilanase yang kemudian ditentukan kadar protein dan aktivitasnya.

3.4.7 Uji kadar protein

3.4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Kasein

Larutan kasein dengan konsentrasi 5000 $\mu\text{g/mL}$ diambil sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 8 mL reagen biuret dan 2 mL larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5. Selanjutnya dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 50°C selama 30 menit. Diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 460-600 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 dan ditambahkan sedikit akuades. Kemudian diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan ditambahkan sedikit demi sedikit larutan NaOH 0,1 M hingga kasein larut dengan sempurna. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga 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 dan dimasukkan dalam labu takar 10 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan (1000; 2000; 3000; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000; dan 9000) $\mu\text{g/mL}$. Masing – masing konsentrasi larutan kasein dipipet sebanyak 2 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 2 mL larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 dan 8 mL reagen Biuret. Kemudian dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 50°C selama 30 menit. Diukur nilai absorbansi larutan

pada panjang gelombang maksimum kasein yaitu 550 nm dan selanjutnya dibuat kurva bakunya.

3.4.7.3 Penentuan Kadar Protein

Uji kadar protein dilakukan dengan menggunakan reagen biuret, yaitu 2 mL ekstrak xilanas hasil sentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 $\mu\text{g/mL}$. Campuran larutan dikocok hingga homogen dan dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 50°C selama 30 menit. Nilai absorbansi larutan diukur dengan menggunakan *Spectronic Genesys 20* pada panjang gelombang 550 nm. Kadar protein awal dapat diketahui dengan cara memplotkan nilai absorbansi pada persamaan kurva baku protein.

3.4.8 Penentuan Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa

3.4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Gula Pereduksi Xilosa

Sebanyak 1 mL larutan stok xilosa 300 $\mu\text{g/mL}$ dipipet 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. Nilai absorbansi diukur pada kisaran panjang gelombang 480-530 nm.

3.4.8.2 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 stok gula 1500 $\mu\text{g/mL}$. Dipipet larutan sebanyak 3, 4, 5, 6, 7, 8 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. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum xilosa yaitu 485 nm dengan menggunakan *Spectronic Genesys 20*.

3.4.9 Penentuan Aktivitas Xilanase Bebas

3.4.9.1 Uji Aktivitas Xilanase

Sebanyak 1 mL substrat xilan 1% (w/v) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit pada temperatur 60°C. Selanjutnya ditambahkan 1 mL xilanase, 1 mL buffer asetat (0,2M) pH 6, dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran larutan dipanaskan selama 55 menit pada temperatur 50°C. Setelah dipanaskan, campuran larutan ditambah 2 mL reagen DNS ke dalam tabung reaksi dan dimasukkan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Kemudian didinginkan dengan menggunakan air mengalir, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas serta dihomogenkan. Nilai absorbansi diukur menggunakan *Spectronic Genesys 20* pada panjang gelombang maksimum yaitu 485 nm.

3.4.9.2 Pengukuran Aktivitas Xilanase Bebas

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

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

Keterangan :

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

3.4.10 Amobilisasi Enzim Xilanase pada Matriks Ca-alginat Pasir Laut Teraktivasi

3.4.10.1 Preparasi Matriks Pasir Laut

Mineral pasir laut dihaluskan dengan cara ditumbuk lalu diayak dengan ayakan 150 *mesh* dan padatan yang tertahan di ayakan 150 *mesh* digunakan sebagai matriks amobilisasi. Selanjutnya padatan dicuci dengan aquades, disaring dan dikeringkan pada temperatur 100°C di dalam oven.

3.4.10.2 Aktivasi Matriks Pasir Laut

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

3.4.10.3 Preparasi Larutan Na-Alginat

Padatan Na-Alginat sebanyak 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 Pasir Laut Ca-alginat

Sebanyak 2,8 mL ekstrak kasar xilanase dipipet, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 25 mL, ditambah larutan buffer asetat pH 5 hingga volume total 5 mL. Selanjutnya ditambah padatan mineral pasir laut teraktivasi sebanyak 0,1 g. Setelah itu campuran dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang selama 3 jam. Kemudian ditambahkan larutan alginat dengan konsentrasi 3 % dan dikocok lagi selama 30 menit agar larutan bercampur merata. Selanjutnya campuran xilanase dan larutan alginat diteteskan pada larutan CaCl_2 7,5 mL dengan menggunakan pipet tetes. Kemudian manik-manik yang telah terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan CaCl_2 0,15 M selama satu jam agar manik-manik menjadi keras. Kemudian manik-manik dipisahkan dari filtratnya dengan cara disaring menggunakan kertas saring (*Whatman no. 40*). Manik-manik yang diperoleh merupakan xilanase amobil yang selanjutnya ditentukan aktivitasnya.

3.4.11 Uji 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 dipanaskan dengan penangas air pada temperatur 50°C selama 30 menit lalu didinginkan dengan menggunakan air mengalir. Kemudian didinginkan pada suhu temperatur dan absorbansi larutan diukur dengan menggunakan *spectronic Genesys 20* pada panjang gelombang maksimum kasein yaitu 550 nm .

3.4.12 Penentuan Aktivitas Xilanase Amobil

Sebanyak 1 mL substrat xilan 1% (w/v) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit pada temperatur 60°C . Selanjutnya ditambahkan 0,1 g xilanase amobil, 1 mL buffer asetat (0,2M) pH 6, dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran larutan dipanaskan selama 50 menit pada temperatur 60°C . Setelah dipanaskan, campuran larutan ditambah 2 mL reagen DNS ke dalam tabung reaksi dan dimasukkan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Kemudian didinginkan dengan menggunakan air mengalir, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan

aquades hingga tanda batas serta dihomogenkan. Nilai absorbansi diukur menggunakan *Spectronic Genensys 20* pada panjang gelombang maksimum yaitu 485 nm.

3.4.13 Penentuan V_{maks} dan K_M Xilanase Bebas dan Amobil

3.4.13.1 Penentuan V_m dan K_M Xilanase Bebas

Nilai V_{maks} dan K_M xilanase bebas ditentukan pada variasi konsentrasi substrat xilan 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 (w/v). Penentuan ini dilakukan dengan cara 1 mL masing-masing konsentrasi substrat xilan dipipet ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 60°C selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 1 mL ekstrak kasar xilanase, 1 mL buffer asetat pH 6 dan 1 mL air bebas reduktor pada masing-masing tabung reaksi. Kemudian dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 50°C selama 55 menit. Selanjutnya, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan hingga mendidih dalam penangas air selama 5 menit, lalu didinginkan menggunakan air mengalir. Larutan tersebut dipindahkan pada labu ukur 25 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas, lalu dikocok hingga homogen. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 485 nm sehingga dapat dihitung konsentrasi enzim dan aktivitas enzim.

3.4.13.2 Penentuan V_{maks} dan K_M Xilanase Amobil

Nilai V_{maks} dan K_M xilanase bebas ditentukan pada variasi konsentrasi substrat xilan 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 (w/v). Penentuan ini dilakukan dengan cara 1 mL masing-masing konsentrasi substrat xilan dipipet ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 60°C selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 0,1 g xilanase amobil, 1 mL buffer asetat pH 6 dan 1 mL air bebas reduktor pada masing-masing tabung reaksi. Kemudian dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 60°C selama 50 menit. Selanjutnya, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan hingga mendidih dalam penangas air selama 5 menit, lalu didinginkan

menggunakan air mengalir. Larutan tersebut dipindahkan pada labu ukur 25 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas, lalu dikocok hingga homogen. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 485 nm sehingga dapat dihitung konsentrasi enzim dan aktivitas enzim.

3.4.14 Penentuan Efisiensi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil dengan Matriks Pasir Laut Ca-alginat

Penentuan efisiensi penggunaan berulang xilanase amobil dilakukan sesuai kondisi optimum yaitu dengan cara xilanase amobil dimasukkan ke dalam uji aktivitas pertama yang selanjutnya dipisahkan antara endapan dengan filtratnya menggunakan kertas saring dan dicuci dengan larutan buffer asetat pH 5 sebanyak 1,5 mL. Kemudian, endapan dimasukkan ke dalam larutan uji berikutnya pada kondisi yang sama. Perlakuan ini diulang sebanyak 5 kali. Filtrat yang diperoleh pada setiap uji ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan dalam penangas air yang mendidih selama 5 menit. Selanjutnya, larutan didinginkan dengan menggunakan air mengalir dan diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimum gula pereduksi yaitu 485 nm. Selain itu, ditentukan pula aktivitas enzim pada setiap perulangan. Xilanase amobil masih efisien digunakan jika memiliki aktivitas diatas 50%.

3.4.15 Pengaruh Temperatur dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Xilanase Bebas dan Amobil

Penentuan kestabilan xilanase bebas dan amobil dilakukan pada variasi temperatur -4°C (*freezer*), 4°C (*refrigerator*), 30°C dan 40°C dan variasi lama penyimpanan (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) hari. Kestabilan xilanase pada variasi temperatur dan lama penyimpanan diukur aktivitasnya berdasarkan kondisi optimum masing-masing xilanase setiap 24 jam sekali hingga penurunan aktivitas xilanase bebas dan amobil lebih dari 50%.

Pada xilanase bebas, 1 unit aktivitas merupakan 1 μg xilosa yang dihasilkan tiap menit oleh setiap mL enzim. Sedangkan pada xilanase amobil, 1 unit aktivitas merupakan 1 μg xilosa yang dihasilkan tiap menit oleh setiap mg enzim.

3.4.16 Analisis Data

Data aktivitas xilanase bebas DAN amobil pada matriks pasir laut Ca-Alginat yang dipengaruhi oleh variasi konsentrasi substrat, temperatur dan lama penyimpanan dianalisis menggunakan program SPSS 23.00 dengan uji ANOVA satu arah, dan dilanjutkan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) 5%.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Produksi dan Isolasi Xilanase dari *Trichoderma viride*

Xilanase adalah enzim yang berperan menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase dapat diproduksi menggunakan metode fermentasi padat yaitu dengan bantuan kapang, bakteri dan ragi [37]. Salah satu jenis kapang yang sering digunakan adalah *Trichoderma viride*, yang dapat tumbuh dan berkembang pada media fermentasi padat PDA.

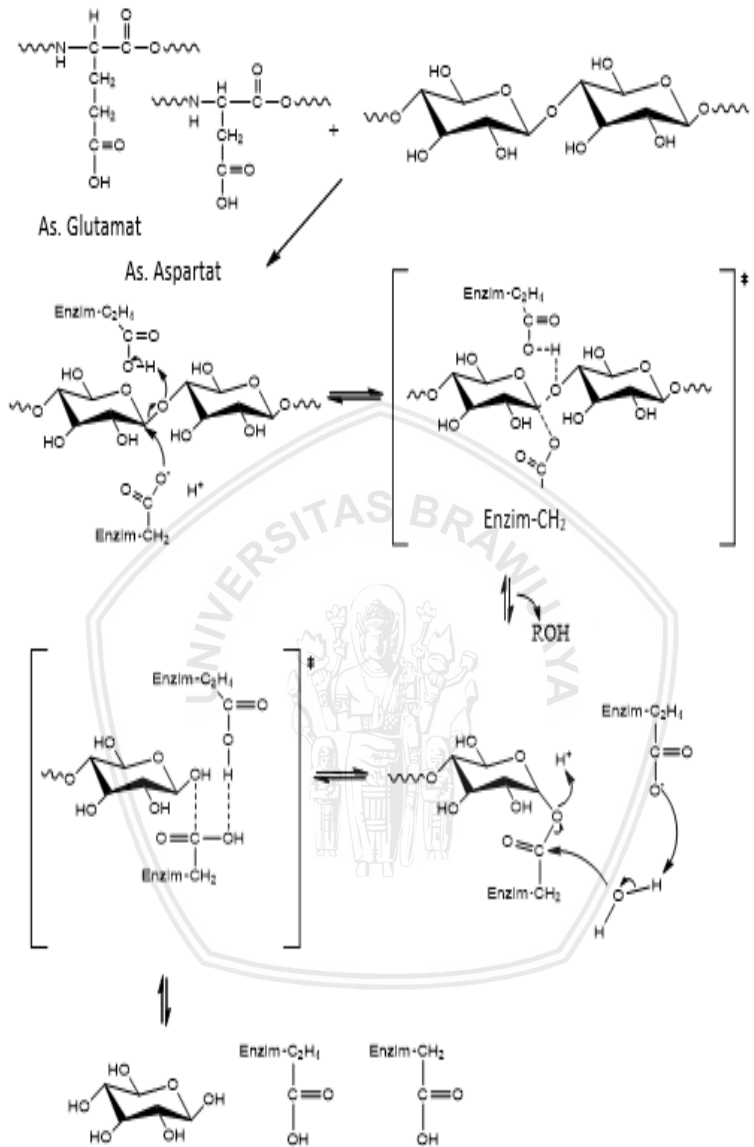
Mikroba yang ditumbuhkan pada media cair akan mengalami beberapa fase untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Hal ini dikarenakan terbatasnya nutrisi yang digunakan didalam medium. Fase-fase yang terjadi dapat dilihat dengan menggunakan kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan merupakan kurva yang menggambarkan fase pertumbuhan dari suatu mikroorganisme yang bertujuan untuk mengetahui waktu panen suatu sel yang paling baik [38].

Produksi enzim diperlukan biakan aktif (inokulum) agar diperoleh hasil yang maksimal, sehingga *Trichoderma viride* yang telah diremajakan ditumbuhkan pada media cair hingga pertengahan fase logaritmik. Pada fase tersebut jumlah enzim yang dihasilkan sebanding dengan jumlah mikroba. Produksi xilanase dilakukan hingga akhir fase logaritmik, karena pada fase ini produksi *Trichoderma viride* maksimal sehingga xilanase yang dihasilkan juga maksimal. Isolasi enzim dilakukan dengan cara disentrifugasi, dimana partikel yang memiliki berat lebih besar akan terendapkan. Partikel yang mengendap kemudian dipisahkan dari supernatan dengan cara didekantasi. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar dari enzim xilanase. Ekstrak kasar tersebut dilakukan pengukuran aktivitas dan kadar protein dalam enzim. Aktivitas enzim diukur menggunakan *Spektronic Genesys 20* dengan menggunakan reagen DNS pada panjang gelombang 485 nm. Sedangkan pengukuran kadar protein enzim dilakukan dengan menggunakan reagen biuret pada panjang gelombang 550 nm. Sehingga dihasilkan aktivitas enzim xilanase bebas sebesar 42,6 µg/mg.menit dan kadar protein awal sebesar 9 mg/mL.

4.2 Amobilisasi Xilanase pada Matriks Pasir Laut Ca-alginat

Amobilisasi merupakan proses penempelan enzim pada adsorben atau media padat [4]. Media gel juga dapat digunakan untuk amobilisasi enzim dengan menggunakan metode penjebakan [9]. Amobilisasi dilakukan dengan menggunakan pasir laut sebagai media padat dan Ca-alginat sebagai media gel agar enzim yang teramobilkan lebih kokoh dan dapat digunakan secara berulang. Penelitian sebelumnya telah dilakukan penentuan kondisi optimum enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat dengan menggunakan variasi pH, temperatur dan waktu inkubasi. Dari penelitian tersebut dihasilkan kondisi optimum xilanase amobil pada pH 6, temperatur 60°C, dan waktu inkubasi selama 50 menit. Fungsi dari enzim xilanase adalah menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Dengan adanya kondisi optimum suatu enzim, maka proses hidrolisis xilan untuk menghasilkan xilosa dan xilo-oligosakarida juga maksimal.

Reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa terjadi pada gugus aktif enzim xilanase. Gugus aktif tersebut adalah asam amino jenis aspartat dan glutamat. Terjadinya hidrolisis ini dikarenakan ionisasi gugus karboksil pada aspartat terjadi lebih dahulu dari pada gugus karboksil pada glutamat. Ionisasi ini membentuk ion karboksilat dan menyerang ikatan glikosidik atom C1 yang mengikat atom O pada polimer xilan. Ion H⁺ dari gugus karboksil rantai samping glutamat menerima pasangan elektron bebas dari atom O dan kemudian membentuk kompleks enzim-substrat. Pembentukan gula pereduksi (xilosa) didapatkan dari hidrolisis kompleks enzim-substrat dengan menggunakan H₂O dengan cara memutus ikatan hidrogennya [13]. Berikut adalah mekanisme reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa oleh enzim xilanase ditunjukkan pada **Gambar 4.1** [15].



Gambar 4.1 Hidrolisis Xilan Menjadi Xilosa

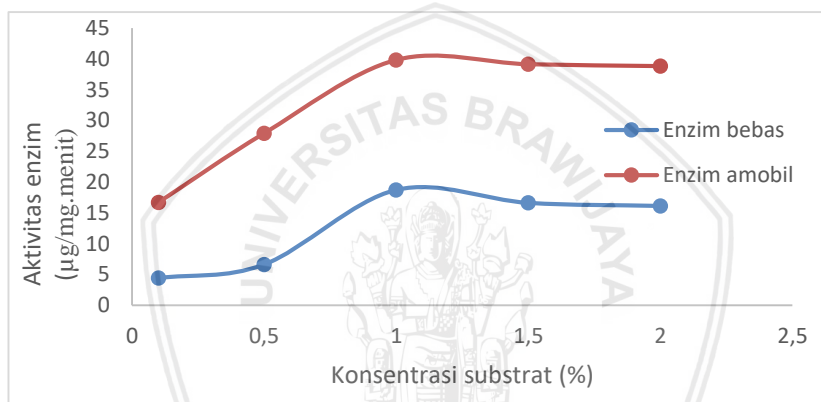
Pada penelitian ini xilanase diamobilkan menggunakan matriks pasir laut dengan metode adsorpsi. Metode adsorpsi merupakan metode yang sederhana dan tidak mengubah aktivitas enzim yang diamobilkan. Pembagian kuat dan tidaknya interaksi antara adsorbat dengan adsorben dibagi menjadi dua jenis adsorpsi yaitu adsorpsi fisik dan adsorpsi kimia. Pada adsorpsi fisik terjadi interaksi gaya Van der Waals antara enzim dengan matriks (pasir laut). Interaksi ini ditandai dengan rendahnya energi yang dilepaskan yang disebabkan oleh lemahnya ikatan antara enzim dengan matriks. Sedangkan pada adsorpsi kimia energi yang dilepaskan relatif besar dan ikatan yang terjadi antara enzim dan matriks lebih kuat. Terjadinya adsorpsi kimia ini diawali dengan adsorpsi fisik, yaitu enzim mendekat ke permukaan matriks melalui gaya Van der Waals atau ikatan hidrogen dan selanjutnya diikuti dengan adsorpsi kimia [39]. Ikatan hidrogen yang terjadi akibat adanya kontak antara atom O yang bermuatan parsial negatif pada silika (Si-O-Si) yang terdapat pada pasir laut dengan atom H yang berparsial positif pada rantai samping asam amino penyusun xilanase [7].

Metode amobilisasi lain yang digunakan yaitu *entrapment* (penjebakan) dengan menggunakan larutan alginat. Keberhasilan menggunakan metode ini dapat diketahui dari distribusi enzim dalam matriks polimer. Hal ini dapat diatur dengan pencampuran enzim dan matriks polimer pada rasio tertentu. Keuntungan dari alginat yang digunakan sebagai matriks dalam amobilisasi enzim adalah tidak beracun, memiliki stabilitas yang tinggi, porositas tinggi, prosedur sederhana dan relatif murah [40].

Amobilisasi dilakukan dengan pencampuran garam alginat atau Na-alginat dengan enzim yang telah teradsorpsi dalam pasir laut. Kemudian campuran tersebut ditetaskan ke dalam larutan CaCl_2 sehingga membentuk manik Ca-alginat. Tersedianya ion Ca^{2+} menyebabkan terjadinya ikatan silang antar molekul alginat yaitu ion karboksilat ($-\text{COO}^-$) pada asam guluronat yang terdapat dalam asam alginat. Alginat yang telah mengalami ikatan silang kemudian akan mengendap membentuk kalsium alginat. Besar kecilnya pori pada gel alginat dapat disebabkan oleh konsentrasi CaCl_2 yang digunakan [41].

4.3 Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis Xilanase Bebas dan Amobil

Penentuan nilai K_M dan laju reaksi enzim (V_{maks}) pada konstanta Michaelis-Menten merupakan komponen terpenting yang dilakukan untuk mengetahui karakteristik enzim. Nilai K_M menunjukkan pada konsentrasi substrat yang dibutuhkan enzim untuk mencapai setengah kecepatan maksimumnya. Sedangkan V_{maks} menunjukkan kecepatan maksimum yang telah dicapai dikarenakan enzim telah jenuh dengan substrat. Pada penelitian ini pengaruh variasi konsentrasi substrat xilan (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2) % (w/v) terhadap aktivitas enzim bebas dan amobil ditunjukkan pada gambar berikut.



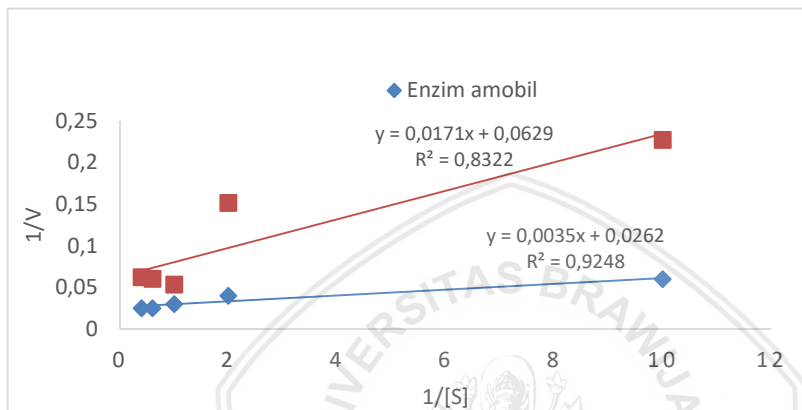
Gambar 4.2 Kurva Hubungan Variasi Konsentrasi Substrat Xilan Terhadap Aktivitas Xilanase Bebas dan Amobil

Berdasarkan teori kinetika, semakin tinggi konsentrasi substrat yang digunakan, maka semakin tinggi pula energi dan frekuensi benturan antar molekul, sehingga semakin banyak xilan yang dihidrolisis oleh enzim xilanase untuk membentuk produk berupa xilosa. Pada **Gambar 4.2** ditunjukkan hasil dari pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas xilanase bebas dan amobil. Semakin tinggi konsentrasi substrat yang digunakan, maka semakin tinggi pula aktivitas enzim yang dihasilkan. Namun pada kondisi tertentu, aktivitas enzim tidak mengalami peningkatan dikarenakan enzim telah jenuh oleh substrat [7].

Penentuan nilai K_M dan V_{maks} dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan Leaneweaver-Burk [29], yaitu:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{KM}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Sehingga diperoleh nilai intersept = $\frac{1}{V_{maks}}$, slope = $\frac{KM}{V_{maks}}$, sumbu y = $\frac{1}{V_o}$ dan sumbu x = $\frac{1}{[S]}$. Sehingga data seperti **Gambar 4.3** berikut:



Gambar 4.3 Kurva Hubungan $1/v$ dengan $1/[S]$ pada Xilanase Bebas dan Amobil

Berdasarkan **Gambar 4.3** dihasilkan persamaan linear pada enzim bebas $y = 0,0171x + 0,0629$, sehingga dihasilkan nilai V_{maks} sebesar $15,89 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ dan nilai K_M sebesar $0,27\%$. Sedangkan pada enzim amobil dihasilkan persamaan linear $y = 0,0035x + 0,0262$, sehingga dihasilkan nilai V_{maks} sebesar $38,17 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ dan nilai K_M sebesar $0,13\%$. Merunut adiningtyas [7] nilai K_M dan V_{maks} berhubungan dengan tingkat kemurnian enzim. Enzim yang sisi-sisi aktifnya bereaksi baik dengan substrat dapat menurunkan nilai K_M dan meningkatkan aktivitasnya. Nilai K_M yang rendah menunjukkan ikatan enzim dengan substrat yang tinggi atau afinitas enzim terhadap substrat tinggi. Tingginya afinitas berpengaruh pada sedikitnya konsentrasi substrat yang diperlukan enzim untuk mencapai kecepatan maksimumnya (V_{maks}). Sedangkan nilai V_{maks} yang tinggi menunjukkan kemampuan dari enzim mengkatalisis xilan menjadi xilosa. Dari penelitian tersebut dihasilkan nilai V_{mak} xilanase amobil

lebih besar daripada xilanase bebas. Sehingga dapat disimpulkan bahwa 1 mg xilanase amobil dapat mengkatalisis xilan menjadi xilosa lebih banyak daripada xilanase bebas.

Berdasarkan hasil uji statistika dinyatakan bahwa hasil F_{hitung} xilanase bebas = 912,879 dan $F_{tabel (0.05)} = 3,48$ sehingga $F_{hitung} > F_{tabel (0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing konsentrasi substrat berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase bebas. F_{hitung} xilanase amobil = 192,256 dan $F_{tabel (0.05)} = 3,48$ sehingga $F_{hitung} > F_{tabel (0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing konsentrasi substrat berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase amobil.

4.4 Efisiensi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil

Kelebihan antara enzim bebas dengan enzim amobil yaitu terletak pada kestabilan dan efisiensinya. Xilanase amobil memiliki sifat yang lebih stabil dari pada enzim bebasnya, serta dapat digunakan berulang kali karena mudah untuk dipisahkan dari campurannya. Untuk mengetahui efisiensi penggunaan berulang enzim amobil dapat dilihat dengan mengukur aktivitasnya.

Xilanase yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat dapat digunakan hingga lima 5 pengulangan, sesuai pada tabel berikut:

Tabel 4.1 Data Penggunaan Ulang Xilanase Amobil

Peenggunaan Ke-	AE ($\mu\text{g}/\text{mg}.\text{menit}$)	% Aktivitas Enzim Sisa
1	60,25	100
2	57,48	95,4
3	49,53	82,2
4	43,89	72,8
5	31,91	52,96
6	26,95	44,7

Dari **Tabel 4.1** diketahui pada penggunaan ke 1 xilanase amobil memiliki aktivitas sebesar 60,25 $\mu\text{g}/\text{mg}.\text{menit}$ dengan persen aktivitas enzim sebesar 100%. Kemudian pada hari ke 2 aktivitas enzim juga masih dalam keadaan tinggi yaitu 57,48 $\mu\text{g}/\text{mg}.\text{menit}$. Penurunan aktivitas secara drastis terjadi pada hari ke 3 hingga hari ke 5, dimana aktivitas enzim pada hari ke 5 hanya sebesar 31,91 μg

/mg.menit dengan persen aktivitas enzim sisa sebesar 52,96%. Sedangkan pada hari ke 6 enzim amobil dikatakan tidak stabil karena persen aktivitas enzim sisa dibawah dari 50% dari persen aktivitas enzim awal. Hal ini dapat terjadi karena lemahnya ikatan antara enzim dengan matriks, sehingga enzim banyak yang terlepas keluar dari permukaan matriks.

Berdasarkan hasil uji statistika dinyatakan bahwa hasil F_{hitung} enzim xilanase amobil = 6418,198 dan $F_{tabel(0,05)} = 3,48$ sehingga $F_{hitung} > F_{tabel(0,05)}$, artinya penggunaan berulang xilanase amobil berpengaruh nyata terhadap aktivitasnya.

4.5 Pengaruh Temperatur dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Xilanase Bebas dan Amobil

Kestabilan enzim dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama temperatur, pH, dan lama penyimpanan. Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas pada xilanase bebas dan xilanase yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat yang disimpan pada variasi temperatur -4°C (*freezer*), 4°C (*refrigerator*), 30°C dan 50°C dan lama penyimpanan selama (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) hari. Dari penelitian tersebut diperoleh hasil yang ditunjukkan oleh **Tabel 4.2** dan **Tabel 4.3**.

Tabel 4.2 Persen Aktivitas Sisa Xilanase Bebas pada Variasi Temperatur dan Lama Penyimpanan

Hari ke-	% Aktivitas Enzim Sisa			
	-4°C (<i>freezer</i>)	4°C (<i>refrigerator</i>)	30°C	50°C
0	100	100	100	100
1	69,2	70,4	54,5	27,1
2	61,5	36,3	26,5	22,2
3	31,9	31,8	23,4	16,7

Berdasarkan **Tabel 4.2**, maka dapat disimpulkan bahwa xilanase bebas memiliki kestabilan lebih lama pada temperatur -4°C (*freezer*). Hal ini ditandai dengan persen aktivitas xilanase bebas yang masih bertahan diatas 50% pada hari ke 2 yaitu sebesar 61,5%.

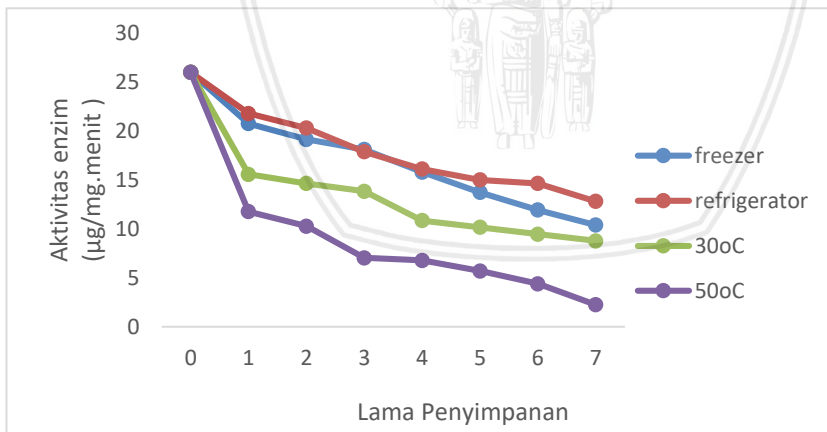
Sedangkan pada hari ke 3 aktivitas xilanase mulai mengalami penurunan yang sangat drastis hingga hari ke 7. Xilanase yang diinkubasi pada temperatur 4°C (*refrigerator*) dan 30°C hanya stabil pada hari ke 1 yaitu dengan persen aktivitas enzim sisa pada masing-masing perlakuan adalah 70,4% dan 54,5%. Ketidakstabilan tertinggi yaitu terjadi pada xilanase yang diinkubasi pada temperatur 50°C yaitu ditandai dengan pengukuran persen aktivitas enzim sisa pada hari ke 1 sebesar 27,1%. Penyebab dari ketidakstabilan ini dapat dikarenakan oleh serangan protease yang terbentuk ketika xilanase diproduksi [42]. Sehingga banyak xilan yang terhidrolisis oleh protease daripada xilanase. Hal inilah yang menyebabkan aktivitas xilanase bebas menurun secara drastis dan tidak stabil. Berikut adalah data persen aktivitas enzim sisa xilanase amobil berdasarkan variasi temperatur dan lama penyimpanan.

Tabel 4.3 Data Persen Aktivitas Sisa Xilanase Amobil pada Variasi Temperatur dan Lama Penyimpanan

Hari ke-	% Aktivitas Enzim Sisa			
	-4°C (<i>freezer</i>)	4°C (<i>refrigerator</i>)	30°C	50°C
0	100	100	100	100
1	79,9	83,9	59,9	45,9
2	73,7	78,1	56,4	39,5
3	69,7	68,8	53,3	27,1
4	60,8	61,9	41,7	26
5	52,8	57,7	39,1	21,9
6	45,9	56,4	36,4	16,9
7	39,9	50,1	33,7	8,6

Pada **Tabel 4.3** dapat disimpulkan bahwa kestabilan xilanase amobil yang divariasikan pada temperatur dan lama penyimpanan semakin menurun. Penurunan aktivitas xilanase dapat dikarenakan karena banyak enzim yang terlepas keluar dari matriks. Enzim Xilanase yang diinkubasi pada perlakuan temperatur -4°C (*freezer*) dapat stabil hingga hari ke 5 penyimpanan, ditandai dengan persen

aktivitas enzim sisa sebesar 52,8%. Sedangkan pada perlakuan temperatur 4°C (*refrigerator*) xilanase dapat stabil hingga hari ke 7 penyimpanan, dengan persen aktivitas enzim sisa sebesar 50,1%. Menurut Aziz [13] enzim yang diinkubasi pada temperatur (0 – 4)°C akan mengalami ketidakatifan, sehingga enzim sulit untuk lepas dari substratnya. Hal inilah yang menyebabkan penurunan aktivitas enzim rendah. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa enzim lebih stabil diinkubasi pada temperatur 4°C dari pada -4°C dilihat dari lebih lamanya waktu kestabilan enzim. Hal ini dikarenakan, enzim yang diinkubasi didalam *freezer* akan terbentuk kristal es pada permukaan matriks yang mana akan mempengaruhi ikatan enzim dengan matriks pasir laut Ca- alginat. Hal ini juga akan berpengaruh pada pengukuran aktivitas yang dihasilkan. Selanjutnya enzim yang diinkubasi pada temperatur 30°C stabil hingga hari ke 3 lama penyimpanan dengan persen aktivitas enzim sisa sebesar 53,3%. Sedangkan enzim yang diinkubasi pada temperatur 50°C mengalami penurunan aktivitas yang sangat drastis pada hari pertama ditandai dengan persen aktivitas enzim hari pertama mencapai 45,9%. Sehingga dari data diatas dapat dibuat grafik hubungan antara aktivitas enzim dengan kestabilan berdasarkan variasi temperatur dan lama penyimpanan pada enzim xilanase amobil.



Gambar 4.4 Grafik Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi Temperatur dan Lama Penyimpanan

repository.ub.ac.id

Berdasarkan **Gambar 4.4**, dapat disimpulkan bahwa xilanase amobil yang diinkubasi pada temperatur -4°C (*freezer*), 4°C (*refrigerator*), 30°C dan 50°C semakin hari aktivitasnya semakin mengalami penurunan. Sehingga dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa xilanase yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat memiliki kestabilan yang lebih dibandingkan dengan xilanase hasil filtrasi gel yang diamobilkan pada matriks pasir laut saja, dimana kestabilan tertinggi berada pada temperatur 4°C dengan 6 hari lama penyimpanan [13]. Hal ini dikarenakan dengan ditambahkan matriks Ca-alginat enzim sulit untuk keluar dari matriks sehingga penurunan aktivitas yang terjadi juga semakin kecil. Menurut Prabowo [43] penurunan aktivitas enzim dapat disebabkan oleh rusaknya xilanase amobil, akibat dari perubahan konformasi enzim sehingga ada beberapa enzim yang keluar dari matriks. Hal inilah yang memengaruhi aktivitas suatu enzim. Enzim dapat dikatakan stabil apabila nilai persen aktivitas sisanya lebih dari 50% dari nilai awal. Penurunan aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya dipengaruhi oleh temperatur dan lama penyimpanan. Sehingga hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa xilanase amobil lebih stabil daripada xilanase bebas dengan dilihat dari kestabilan aktivitasnya.

Berdasarkan hasil uji statistika dinyatakan bahwa hasil F_{hitung} xilanase bebas pada variasi temperatur = 12,417 dan $F_{\text{tabel}}(0,05) = 2,70$ sehingga $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}(0,05)$, artinya perlakuan masing-masing variasi temperatur berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase bebas. F_{hitung} xilanase amobil pada variasi lama penyimpanan = 24,444 dan $F_{\text{tabel}}(0,05) = 2,13$ sehingga $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}(0,05)$, artinya perlakuan masing-masing lama penyimpanan berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase amobil.



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah saya lakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Konsentrasi substrat xilan memengaruhi aktivitas enzim bebas dan amobil. Nilai aktivitas tertinggi terjadi pada konsentrasi substrat sebesar 1%, yaitu sebesar 18,6 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ pada enzim bebas dan 39,8 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ pada enzim amobil.
2. Nilai V_{maks} dan K_M pada enzim bebas sebesar 15,89 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ dan 0,27%. Sedangkan pada enzim amobil nilai V_{maks} dan K_M sebesar 38,17 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$ dan 0,13%. Hal ini menunjukkan bahwa 1 mg xilanase amobil mampu menghidrolisis xilan menjadi xilosa lebih banyak daripada xilanase bebas.
3. Enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat dapat digunakan hingga lima kali pengulangan dengan aktivitas enzim sebesar 31,91 $\mu\text{g}/\text{mg}$ menit dan persen aktivitas sisa sebesar 52,96%.
4. Kestabilan enzim xilanase bebas tertinggi terjadi pada suhu -4°C (*freezer*) selama dua hari penyimpanan dengan persen aktivitas sisa sebesar 61,5%. Sedangkan enzim xilanase amobil terjadi pada suhu 4°C (*refrigerator*) selama tujuh hari penyimpanan dengan persen aktivitas sisa sebesar 50,2%.

5.2 Saran

Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan menambah matriks yang digunakan saat amobilisasi enzim, dikarenakan enzim yang diamobilisasi menggunakan matriks pasir laut Ca-alginat lebih unggul dibandingkan dengan menggunakan matriks pasir laut saja.



DAFTAR PUSTAKA

- [1] Susanti, R dan Fibriana, Fidia. 2017. **Teknologi Enzim**. Andi OFFSET: Yogyakarta
- [2] Lehninger, A. L., 1997. **“Dasar-dasar Biokimia.”** in *Principles of Biochemistry*. Erlangga: Jakarta
- [3] Richana, Nur. 2002. **“Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia”**. Bul. AgroBio. vol. 5.no. . pp. 29–36
- [4] Sutrisno, Aji. 2017. **Teknologi Enzim**. UB Press: Malang
- [5] Bachruddin, Z. 2014. **Teknologi Fermentasi Pada Industri Peternakan, 1st ed.** Gadjah Mada University Press: Yogyakarta
- [6] Sulistyanyingtyas, A. 2013. **“Pengaruh Penambahan Ion Fe³⁺ Terhadap Aktivitas Xilanase dari *Trichoderma viride*”**. Kim. Stud. J. vol. 2. no. 2. pp. 470–476
- [7] Adiningtyas, N. 2016. **“Karakterisasi Enzim Xilanase Hasil Isolasi dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Pasir Laut Teraktivasi HCl”**. Skripsi. Universitas Brawijaya: Malang
- [8] Laziba, Dihan., Sutrisno., Suratmo 2013. **“Optimasi Amobilisasi Xilanase Dari *Trichoderma viride* Menggunakan Matriks Pasir Laut”**. Kim. Stud. J. vol. 2. no. 1. pp. 456–462
- [9] Mesla, W., Mahdi, C., Sutrisno. 2014. **“Optimasi Amobilisasi Xilanase Dari *Trichoderma viride* Menggunakan Matriks Ca-Alginat-Kitosan”**. Kim. Stud. J. vol. 2. no. 1. pp. 428–434
- [10] Sukmana, M. E., Rosdiana, A., Sutrisno.2014. **“Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride*”**. Kim. Stud. J. vol. 2. no. 1. pp. 340–344
- [11] Widyasari, S. 2007. **“Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride*”**. Skripsi. Universitas Brawijaya: Malang
- [12] Ardian, A., Rosdiana, A., Sutrisno. 2014. **“Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Aktivitas Xilanase Diamobilisasi Dalam Pasir Laut”**. Kim. Stud. J. vol. 2. no. 1. pp. 386–392. 2014.

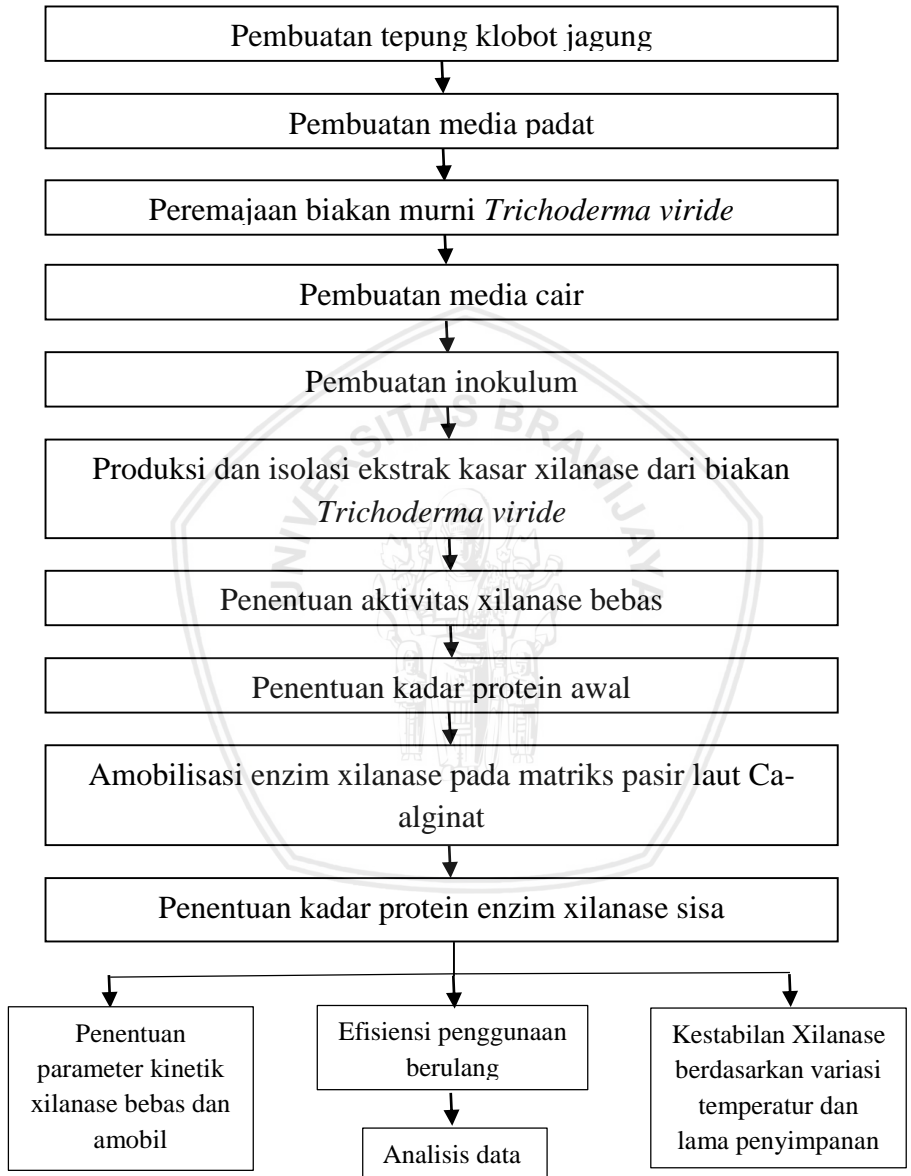
- [13] Aziz, S. 2017. **“Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Kestabilan Aktivitas Xilanase *Trichoderma viride* Hasil Filtrasi Gel yang Diamobilkan pada Matriks Pasir Laut dan Efisiensi Penggunaan Ulang”**. Skripsi. Universitas Brawijaya: Malang
- [14] Nurellyna, R.I. 2018. **“Optimasi Amobilisasi Xilanase dari *Trichoderma viride* pada Matriks Pasir Laut Ca-Alginat”**. Skripsi. Universitas Brawijaya: Malang
- [15] Rahmawati, R. D. 2018. **“Penentuan Kondisi pH, Temperatur, dan Waktu Inkubasi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang diamobilkan Pada Matriks Pasir Laut Ca-Alginat”**. Skripsi. Universitas Brawijaya: Malang
- [16] Wirahadikusumah, M. 1989. **Biokimia Protein, Enzim dan Asam Nukleat**. ITB Press: Bandung
- [17] Wolpert, L. **“How We Live and Why We Die: The Secret Lives Of Cells,”** in **The Miracle Of Cells: Rahasia Kehidupan dan Kecerdikan Sel**. 1st ed. Mizan Pustaka: Bandung
- [18] Hidayat, N., Wigyanto, S., Sumarsih., Putri, A. 2017. **Mikologi Industri**. UB Press: Malang
- [19] Prasetyawati, D. 2015. **“Pemanfaatan Kulit Jagung (*Zea mays*) Sebagai Bahan Dasar Pembuatan Kertas Seni dengan Penambahan Natrium Hidroksida (NaOH) dan Pewarna Alami”** .Naskah Publikasi. Muhammadiyah Surakarta: Surakarta
- [20] Rahayu, E. 2011. **Uji Kinerja Digester pada Proses Pulping Kulit Jagung dengan Variabel Suhu dan Waktu Pemasakan**. universitas Diponegoro Press: Semarang
- [21] Windari, H. A. 2014. **“Penentuan Waktu Fermentasi Optimum Produksi Xilanase dari *Trichoderma viride* Menggunakan Substrat Kulit Kedelai dan Kulit Kacang Hijau Melalui Fermentasi Semi Padat”**. Kim. Stud. J. vol. 1. no. 1. pp. 1–7.
- [22] Resita, E. **“Poduksi Selo-Oligosakarida dari Fraksi Selulosa Tongkol Jagung Oleh Selulase *Trichoderma viride*”**. Skripsi. Institut Pertanian Bogor: Bogor
- [23] Chibata, I. 1976. **Immobilized Enzymes**. Kodansha LTD: Tokyo

- [24] Mulyasuryani, Ani. 2018. **Elektroanalitik**. Deepublish: Yogyakarta
- [25] Santoso, S.J. 2010. **Dekontaminasi Ion Logam dengan Biosorben Berbasis Asam Humat, Kitin dan Kitosan**. Gadjah Mada University Press: Yogyakarta
- [26] Prima, R.E. 2012. **“Produksi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A”**. Skripsi. UI Press: Depok
- [27] Kusuma, T.S., Kurniawati, A.D., Rahmi Y., Rusdan, L., Widyanto, R.M. 2018. **Pengawasan Mutu Makanan**. UB Press: Malang
- [28] Simanjuntak, M. dan Silalahi, J. 2003. **Biokimia**. USU Digital Library: Sumatera Utara
- [29] P. Ganda. 2009. **“Penentuan Kinetika Enzim Galakturonase PG Endogenous dari Pulp Biji Kakao”**. Biol. J. vol. XIII. no. 1. pp. 21–24
- [30] P, Kuchel., G, B. Reltson. 2011. **“Schaum’s Easy Outlines Biochemistry,” in *Schaum’s Easy Outlines Biokimia***. Erlangga: Jakarta
- [31] Poncomulyo, T., Maryani, H., 2014. **Budidaya dan Pengelolaan Rumput Laut**. Mizan Pustaka: Yogyakarta
- [32] Subaryono. 2010. **“Modifikasi Alginat dan Pemanfaatan Produknya”**. Squalen. vol. 5. no. 1
- [33] Basmal, J. 2013. **Membuat Alginat dari Rumput laut Sargassum**. Penebar Swadaya: Jakarta
- [34] Hadi, S. 2014. **Sintesis Silika Berbasis Asam Bancar Menggunakan Metode Kopresipitasi**. ITS Press: Surabaya
- [35] Laziba, D., Sutrisno., Suratmo. 2013. **“Optimasi Amobilisasi Xilanase dari *Trichoderma viride* pada Matriks Pasir Laut”**. Kim. Stud. J. vol. 2. no. 1. pp. 456–462
- [36] Gandjar, I., Rohman, A. 2018. **Spektroskopi Molekuler Untuk Analisis Farmasi**. Gadjah Mada University Press: Yogyakarta
- [37] Larrasati, R.A., Rosdiana, A., Sutrisno. 2015. **“Pengaruh waktu Pengocokan dan Konsentrasi Xilanase dari *Trichoderma viride* Terhadap Xilanase Teradsorbsi dan Aktivitas Xilanase”**. Kim. Stud. J. vol. 1. no. . pp. 812–818

- [38] Saropah, D.A., Jannah, A., Maunatin, A. 2012. “**Kinetika Reaksi Enzimatis Ekstrak Kasar Enzim Selulase bakteri Selulolitik Hasil Isolasi Dari Bekatul**”. J. Alchemy. vol. 2. no. 1. pp. 34–45
- [39] Shoni, D.P. 2013. “**Pemanfaatan Pasir Laut Teraktivasi H₂SO₄ dan Tersalut Fe₂O₃ Sebagai Adsorben Ion Logam Cu (II) dalam Larutan**”. Skripsi. Universitas Negeri Semarang: Semarang
- [40] Zusfahair, D. N., Riana, D., Kartika, A., Fatoni., Permatawati, I. 2017. “**Immobilization and Characterization of *Bacillus thuringiensis* HCB6 Amylase in Calcium Alginate Matrix**”. Molekul. vol. 12. no. 1. pp. 70–77
- [41] Husni, A., Subaryono., Pranoto, Y., Tazwir., Ustadi. 2012 “**Pengembangan Metode Ekstraksi Alginat dari Rumput Laut *Sargassum sp.* Sebagai Bahan Pengental**”. Agritech. vol. 32. no. pp. 1–8
- [42] Setiawan, F. 2016. “**Karakterisasi Enzim Xilanase Hasil Isolasi dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Zeolit Teraktivasi Asam**”. Skripsi. Universitas Brawijaya: Malang
- [43] Prabowo, Gempar Aditya. 2017. “**Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Kestabilan Aktivitas Xilanase *Trichoderma viride* Hasil Filtrasi Gel yang Diamobilkan pada Matriks Zeolit dan Efisiensi Penggunaan Ulang**”. Skripsi. Universitas Brawijaya: Malang

LAMPIRAN

Lampiran A. Tahapan Penelitian



Lampiran B. Preparasi Larutan

B.1 Larutan asam asetat 0,2 M

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

B.2 Larutan natrium asetat 0,2 M

Natrium asetat (BM: 82,02 g/mol) sebanyak 1,64 g dilarutkan dengan aquades secukupnya dan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL kemudian diencerkan dengan aquades hingga tanda batas.

B.3 Buffer asetat pH 5

Larutan asam asetat 0,2 M sebanyak 25 mL dipipet dan dimasukkan ke dalam beaker glass, ditambahkan 45,5 mL larutan natrium asetat 0,2 M dan diaduk hingga homogen. Dipindahkan larutan campuran ke dalam labu ukur 100 mL dan dikocok hingga homogen.

B.4 Buffer asetat pH 6

Larutan asam asetat 0,2 M sebanyak 5 mL dipipet dan dimasukkan ke dalam beaker glass, ditambahkan 93 mL larutan natrium asetat 0,2 M dan diaduk hingga homogen. Dipindahkan larutan campuran ke dalam labu ukur 100 mL dan dikocok hingga homogen.

B.5 Reagen DNS

NaOH 1 g; $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$ 18,2 g; kristal fenol 0,2 g; dan Na_2SO_3 0,5 g dilarutkan dengan 50 mL aquades dalam beaker glass 100 mL. Ditambahkan 1 g asam dinitrosalisilat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan magnetik stirer. Setelah larut dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas.

B.6 Substrat xilan 1%

Xilan sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam beaker glass 100 mL dan dilarutkan dengan buffer asetat pH 5 secukupnya. Lalu

repository.ub.ac.id

dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan buffer asetat pH 5 hingga tanda batas.

B.7 Larutan NaOH 10%

NaOH ditimbang sebanyak 10 g dan dilarutkan dengan 50 mL aquades dalam beaker glass 100 mL. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambah akuades hingga tanda batas.

B.8 Reagen biuret

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,15 g; $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$ 0,6 g dilarutkan dengan aquades sebanyak 30 mL dalam beaker glass 100 mL. Larutan NaOH 10% ditambahkan sebanyak 30 mL sambil diaduk dengan magnetik stirer. Larutan campuran dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas.

B.9 Larutan HCl 0,4 M

Dipipet 3,84 mL larutan HCl 37%, dimasukkan ke dalam beaker glass 100 mL yang telah berisi aquades, dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambah akuades hingga tanda batas.

B.10 Air bebas reduktor

Aquades sebanyak 250 mL dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL. Kemudian ditambahkan dengan larutan KMnO_4 hingga berubah warna menjadi ungu. Selanjutnya dilakukan proses destilasi sehingga diperoleh air bebas reduktor yang tidak berwarna.

B.11 Larutan CaCl_2 0,15 M

CaCl_2 (BM: 110 g/mol) sebanyak 1,54 g dilarutkan dengan aquades secukupnya dan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL kemudian diencerkan dengan aquades hingga tanda batas.

B.12 Larutan Na-alginat 3%

Na-alginat sebanyak 3 g ditimbang. Kemudian disiapkan quades yang sudah dipanaskan sebanyak 100 mL. Selanjutnya Na-alginat dimasukkan ke dalam aquades sedikit demi sedikit hingga larut secara sempurna.

B.13 Unsur Renik

Sebanyak 3,02 g Na₂EDTA; 0,5 g NaOH; 0,25 g MgSO₄·7H₂O; 0,1 g ZnSO₄·7H₂O; 0,1 g MnSO₄·4H₂O; 0,025 CuSO₄·5H₂O; 2,5 g Na₂SO₄; 0,025 g NaMoO₄·2H₂O; 0,5 g FeSO₄·7H₂O; 0,125 mL H₂SO₄, dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL. Setelah itu ditambahkan 250 mL aquades dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga semua bahan larut sempurna.

Lampiran C. Perhitungan Preparasi Larutan

C.1 Larutan asam asetat 0,2 M

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

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

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

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

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:

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

$$\begin{aligned}\text{massa CH}_3\text{COONa} &= \text{mol CH}_3\text{COONa} \times \text{BM CH}_3\text{COONa} \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 82,02 \text{ g/mol} \\ &= 1,6 \text{ g}\end{aligned}$$

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

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

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

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

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

$$5 - 4,74 = -\log \frac{25}{v}$$

$$V = 45,495 \text{ mL}$$

Jadi perbandingan volume $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{CH}_3\text{COONa}$ adalah 25 mL : 45,495 mL.

C.4 Pembuatan Buffer Asetat (0,2 M) pH 6

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

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

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

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

$$6 - 4,74 = -\log \frac{5}{v}$$

$$V = 92,59 \text{ mL}$$

Jadi perbandingan volume $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{CH}_3\text{COONa}$ adalah 5 mL : 92,59 mL.

C.5 Larutan NaOH 0,1 M

Larutan NaOH 0,1 M (BM: 40 g/mol) dibuat sebanyak 100 mL

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

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

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

C.6 Larutan HCl 0,4 M

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

$$M = \frac{\text{massa}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{100}$$
$$= \frac{37}{35,5} \times 10 = 10,423 \text{ M}$$

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

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

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

C.7 Larutan CaCl₂ 0,15 M

Larutan CaCl₂ 0,15 M (BM: 110 g/mol) dibuat sebanyak 100 mL

$$\text{Mol CaCl}_2 = [\text{CaCl}_2] \times V \text{ larutan}$$

$$= 0,15 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L}$$

$$= 0,015 \text{ mol}$$

$$\text{massa CaCl}_2 = \text{mol CaCl}_2 \times \text{BM CaCl}_2$$

$$= 0,015 \text{ mol} \times 110 \text{ g/mol}$$

$$= 1,65 \text{ g}$$

Jadi untuk membuat larutan CaCl₂ 0,15 M sebanyak 100 mL dibutuhkan 1,65 gram padatan CaCl₂.

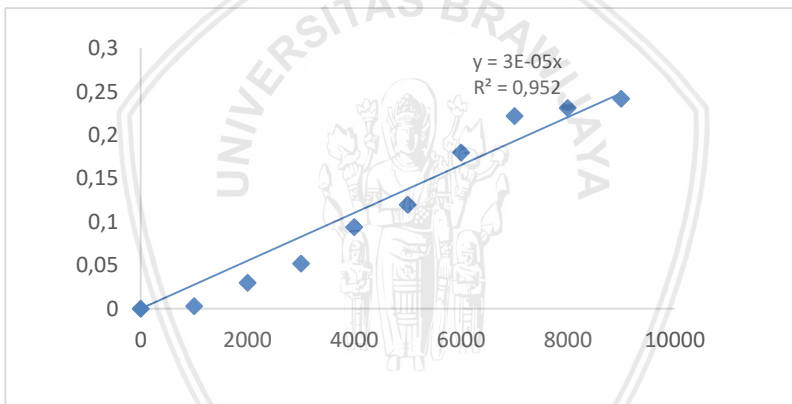
Lampiran D. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku Kasein

Tabel D.1 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Kasein

λ (nm)	\bar{A}
500	0,164
510	0,188
520	0,208
530	0,222
540	0,229
550	0,231
560	0,227
570	0,216
580	0,204
590	0,185

Tabel E. 2 : Kurva Baku Kasein

Konsentrasi (ppm)	A1	A2	A3	\bar{A}
0	0	0	0	0
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 D.1 : Kurva Baku Kasein

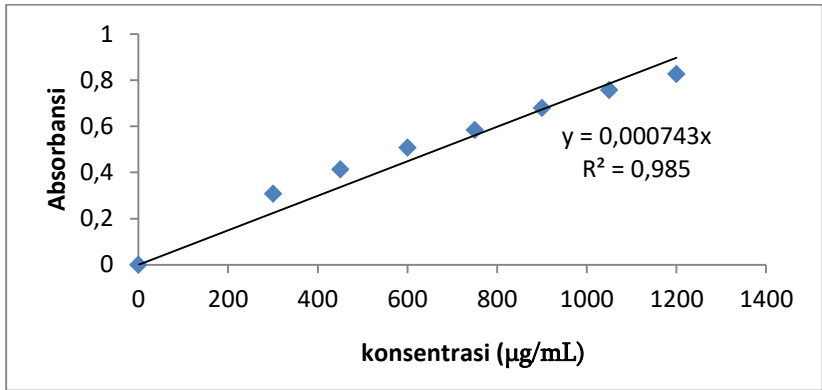
Lampiran E. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku Xilosa

Tabel E 1 : Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Xilosa

λ (nm)	A1	A2	A3	\bar{A}
Blanko	0	0	0	0
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

Tabel E. 2 : Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa

[Xilosa]	A1	A2	A3	\bar{A}
Blanko	0	0	0	0
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
1050	0,768	0,752	0,750	0,757
1200	0,900	0,890	0,895	0,895



Gambar E.1 : Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa

Lampiran F. Penentuan Kadar Protein Awal

Penentuan kadar protein awal dilakukan dengan menentukan konsentrasi protein awal yang diukur pada $\lambda_{maks} = 550 \text{ nm}$. Nilai absorbansi tersebut diplotkan pada persamaan kurva baku kasein ($y = 0,00003x$) untuk mendapatkan konsentrasi protein total.

Misal absorbansi $A = 0,192$
 $Y = 0,00003x$
 $0,192 = 0,00003x$
 $X = 6400 \text{ µg/mL}$
 $X = (6400 - 5000) \text{ µg/mL} = 950 \text{ µg/mL}$
 $X = 1,4 \text{ mg/MI}$

Tabel F.1 : Konsentrasi Protein Awal

Pengukuran	Absorbansi	X (mg/mL)
1	0,192	1,4
2	0,197	1,6
3	0,196	1,5

$X \text{ rata - rata} = 1,5 \text{ mg/mL}$

Massa protein awal (dalam 12 mL) = $X \text{ rata - rata} \cdot V \text{ total}$
 $= 1,5 \text{ mg/mL} \cdot 12 \text{ mL}$
 $= 18 \text{ mg}$

Kadar protein awal = $m \text{ protein awal} : 2 \text{ mL}$
 $= 18 \text{ mg} : 2 \text{ mL}$

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

Lampiran G. Penentuan Kadar Protein Akhir

Penentuan kadar protein akhir dilakukan dengan menentukan konsentrasi protein akhir yang diukur pada $\lambda_{\text{maks}} = 550 \text{ nm}$. Nilai absorbansi tersebut diplotkan pada persamaan kurva baku kasein ($y = 0,00003x$) untuk mendapatkan konsentrasi protein total.

Misal absorbansi $A = 0,218$

$$Y = 0,00003x$$

$$0,218 = 0,00003x$$

$$X = 7266 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$X = (7266 - 5000) \mu\text{g/mL}$$

$$= 2266 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$X = 2,26 \text{ mg/mL}$$

Tabel G.1: Konsentrasi Protein Akhir

Pengukuran	Absorbansi	X (mg/mL)
1	0,225	2,26
2	0,224	2,47

$$X \text{ rata-rata} = 2,36 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa protein sisa} &= X \text{ rata-rata} \cdot V \text{ filtrat} \\ &= 2,36 \text{ mg/mL} \cdot 5 \text{ mL} \\ &= 11,8 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa protein teramobil} &= \text{massa protein awal} - \text{massa protein sisa} \\ &= (18 - 11,8) \text{ mg} \\ &= 6,2 \text{ mg} \end{aligned}$$

Lampiran H. Penentuan Aktivitas Enzim

Lampiran H.1 Xilanase Bebas

Larutan yang diuji untuk menentukan aktivitas xilanase bebas diukur absorbansinya pada $\lambda_{\text{maks}} = 485 \text{ nm}$. Kemudian absorbansi tersebut diplotkan pada kurva baku xilosa ($y = 0,0007x$). sehingga dapat diketahui nilai konsentrasi xilosa.

Misal untuk nilai absorbansi enzim xilanase bebas 0,591 maka konsentrasi xilosanya dapat dihitung pada persamaan berikut :

$$Y = 0,0007x$$

$$0,591 = 0,0007x$$

$$X = 844,3 \mu\text{g/mL}$$

Kemudian aktivitas enzim xilanase bebas dapat dihitung pada persamaan berikut :

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

$$= \frac{844,3 \mu\text{g/mL} \times 6 \text{ mL} \times \frac{25\text{mL}}{6 \text{ mL}}}{1 \text{ mL} \times 55 \text{ menit}}$$

$$= 383,8 \mu\text{g/mL} \cdot \text{menit}$$

$$AE \text{ bebas} = \frac{383,8 \mu\text{g/mL} \cdot \text{menit}}{9 \text{ mg/mL}}$$

$$= 42,6 \mu\text{g/mg} \cdot \text{menit}$$

Tabel H. 1: Konsentrasi Xilanase Bebas

Pengukuran	Absorbansi	X (mg/mL)
1	0,594	0,85
2	0,591	0,84
3	0,588	0,84

X rata –rata = 0,84 mg/mL

Lampiran H.2 Xilanase Amobil

Misal untuk nilai absorbansi enzim xilanase amobil 0,355 maka konsentrasi xilosanya dapat dihitung pada persamaan berikut :

$$Y = 0,0007x$$

$$0,355 = 0,0007x$$

$$X = 507,1 \mu\text{g/mL}$$

Kemudian aktivitas enzim xilanase amobil dapat dihitung pada persamaan berikut :

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

$$= \frac{507,1 \mu\text{g/mL} \times 5 \text{ mL} \times \frac{25\text{mL}}{5 \text{ mL}}}{6,2 \text{ mg} \times 50 \text{ menit}}$$

$$= 40,89 \mu\text{g}/\text{mg. menit}$$

Tabel H.2: Konsentrasi Xilanase Amobil

Pengukuran	Absorbansi	X (mg/mL)
1	0,355	0,5
2	0,355	0,5
3	0,357	0,51

$$X \text{ rata-rata} = 0,5 \text{ mg/mL}$$

Berdasarkan data perhitungan diatas dihasilkan aktivitas enzim xilanase bebas sebesar 42,6 $\mu\text{g}/\text{mg. menit}$ dan aktivitas enzim xilanase amobil sebesar 40,89 $\mu\text{g}/\text{mg. menit}$.

Lampiran I. Penentuan V_{maks} dan K_M Xilanase

I.1 Xilanase Bebas

Misal untuk nilai absorbansi enzim xilanase amobil pada variasi konsentrasi substrat 0,1% 0,061, maka konsentrasi xilosanya dapat dihitung pada persamaan berikut :

$$Y = 0,0007x$$

$$0,061 = 0,0007x$$

$$X = 87,1/\text{mL}$$

Kemudian aktivitas enzim xilanase amobil dapat dihitung pada persamaan berikut :

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

$$= \frac{87,1 \mu\text{g}/\text{mL} \times 6 \text{ mL} \times \frac{25 \text{ mL}}{6 \text{ mL}}}{1 \text{ mL} \times 55 \text{ menit}}$$

$$= 39,6 \mu\text{g}/\text{mL. menit}$$

$$AE \text{ bebas} = \frac{39,6 \mu\text{g}/\text{mL. menit}}{9 \text{ mg}/\text{mL}}$$

$$= 4,4 \mu\text{g}/\text{mg. menit}$$

Tabel I.1: Data Absorbansi Variasi Substrat Xilanase Bebas

Variasi konsentrasi substrat (%)	A1	A2	A3	\bar{A}
0.1	0,069	0,057	0,057	0,061
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	0,230
2	0,219	0,227	0,225	0,223

Tabel I.2: Data Aktivitas Xilanase Bebas Pada Variasi Konsentrasi Substrat

Variasi konsentrasi substrat (%)	Xilanase bebas	
	Konsentrasi Xilosa ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas Enzim ($\mu\text{g/mg.menit}$)
0,1	87,1	4,4
0,5	130	6,5
1	370	18,7
1,5	328,6	16,6
2	318,6	16,1

I.2 Xilanase Amobil

Misal untuk nilai absorbansi enzim xilanase amobil pada variasi konsentrasi substrat 0,1% 0,145, maka konsentrasi xilosanya dapat dihitung pada persamaan berikut :

$$Y = 0,0007x$$

$$0,145 = 0,0007x$$

$$X = 207,1 \mu\text{g/mL}$$

Kemudian aktivitas enzim xilanase amobil dapat dihitung pada persamaan berikut :

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

$$= \frac{207,1 \mu\text{g/mL} \times 5\text{mL} \times \frac{25\text{mL}}{5\text{mL}}}{6,2 \text{ mg} \times 50 \text{ menit}}$$

$$= 16,7 \mu\text{g}/\text{mg. menit}$$

Tabel I.3: Data Absorbansi Variasi Substrat Xilanase Amobil

Konsentrasi substrat (%)	A1	A2	A3	\bar{A}
0.1	0,145	0,144	0,146	0,145
0.5	0,238	0,246	0,245	0,242
1	0,344	0,344	0,345	0,345
1.5	0,338	0,341	0,338	0,339
2	0,341	0,339	0,334	0,337

Tabel I.4: Data Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi Konsentrasi Substrat

Variasi konsentrasi substrat (%)	Enzim amobil	
	Konsentrasi Xilosa ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Aktivitas Enzim ($\mu\text{g}/\text{mg. menit}$)
0,1	207,1	16,7
0,5	345,7	27,9
1	492,9	39,8
1,5	484,3	39,1
2	481,4	38,8

Lampiran J. Efisiensi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil

Misal untuk nilai absorbansi enzim xilanase amobil pada pemakaian pertama adalah 0,523, maka konsentrasi xilosanya dapat dihitung pada persamaan berikut :

$$Y = 0,0007x$$

$$0,523 = 0,0007x$$

$$X = 747 \mu\text{g}/\text{mL}$$

Kemudian aktivitas enzim xilanase amobil dapat dihitung pada persamaan berikut :

$$\begin{aligned} \text{AE Amobil} &= \frac{X \times V \times fp}{p \times q} \\ &= \frac{747 \mu\text{g}/\text{mL} \times 5 \text{mL} \times \frac{25 \text{mL}}{5 \text{mL}}}{6,2 \text{mg} \times 50 \text{menit}} \\ &= 60,3 \mu\text{g}/\text{mg. menit} \end{aligned}$$

Tabel J.1: Data Absorbansi Penggunaan Ulang Xilanase Amobil

Penggunaan Ke-	A1	A2	A3	\bar{A}
1	0,516	0,527	0,528	0,523
2	0,505	0,497	0,496	0,499
3	0,427	0,434	0,430	0,430
4	0,368	0,387	0,388	0,381
5	0,280	0,281	0,272	0,277
6	0,234	0,246	0,245	0,240

Tabel J.2: Data Aktivitas Xilanase Amobil pada Efisiensi Penggunaan Ulang

Penggunaan Ke-	Xilanase amobil	
	X xilosa ($\mu\text{g/mL}$)	AE ($\mu\text{g/mg.menit}$)
1	747	60,3
2	712,9	57,5
3	614,3	49,5
4	544,3	43,9
5	395,7	31,9
6	342,9	27,6

Lampiran K. Kestabilan Xilanase Berdasarkan Variasi Temperatur dan Lama Penyimpanan

Lampiran K.1 Xilanase Bebas

Misal untuk nilai absorbansi enzim xilanase bebas pada suhu -4°C pada hari ke-0 adalah 0,591, maka konsentrasi xilosanya dapat dihitung pada persamaan berikut :

$$Y = 0,0007x$$

$$0,591 = 0,0007x$$

$$X = 844,3 \mu\text{g/mL}$$

Kemudian aktivitas enzim xilanase bebas dapat dihitung pada persamaan berikut :

$$\begin{aligned} \text{AE Bebas} &= \frac{X \times V \times fp}{p \times q} \\ &= \frac{844,3 \mu\text{g/mL} \times 6\text{mL} \times \frac{25\text{mL}}{6\text{mL}}}{1\text{mL} \times 55\text{menit}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= 383,8 \mu\text{g/mL. menit} \\
 \text{AE Bebas} &= \frac{383,8 \mu\text{g/mL. menit}}{9 \text{ mg/mL}} \\
 &= 42,6 \mu\text{g/mg. menit}
 \end{aligned}$$

Tabel K.1: Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Temperatur -4°C (freezer)

Hari ke-	Suhu -4°C			
	A1	A2	A3	\bar{A}
0	0,594	0,591	0,588	0,591
1	0,414	0,412	0,410	0,412
2	0,363	0,366	0,365	0,364
3	0,191	0,192	0,188	0,190

Tabel K.2: Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Temperatur 4°C (refrigerator)

Hari ke-	Suhu 4°C			
	A1	A2	A3	\bar{A}
0	0,594	0,591	0,588	0,591
1	0,357	0,354	0,351	0,354
2	0,216	0,223	0,219	0,219
3	0,190	0,187	0,189	0,189

Tabel K.3: Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Temperatur 30°C

Hari ke-	Suhu 30°C			
	A1	A2	A3	\bar{A}
0	0,594	0,591	0,588	0,591
1	0,318	0,321	0,315	0,318
2	0,161	0,155	0,157	0,158
3	0,141	0,137	0,139	0,139

Tabel K.4: Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Temperatur 50°C

Hari ke-	Suhu 50°C			
	A1	A2	A3	\bar{A}
0	0,594	0,591	0,588	0,591
1	0,157	0,160	0,158	0,158
2	0,133	0,131	0,132	0,132
3	0,098	0,102	0,097	0,099

Tabel K.5: Data Aktivitas Enzim Rata-rata pada Kestabilan Xilanase Bebas

Hari ke-	AE rata-rata ($\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$)			
	-4°C (freezer)	4°C (refrigerator)	30°C	50°C
0	42,9	42,6	42,6	42,6
1	29,6	30,2	23,4	11,6
2	26,3	15,6	11,3	9,5
3	13,7	13,6	10	7,1

Lampiran K.2 Xilanase Amobil

Misal untuk nilai absorbansi enzim xilanase bebas pada suhu -4°C pada hari ke-0 adalah 0,225, maka konsentrasi xilosanya dapat dihitung pada persamaan berikut :

$$Y = 0,0007x$$

$$0,225 = 0,0007x$$

$$X = 321,4 \mu\text{g}/\text{mL}$$

Kemudian aktivitas enzim xilanase amobil dapat dihitung pada persamaan berikut :

$$\begin{aligned} \text{AE Amobil} &= \frac{X \times V \times fp}{p \times q} \\ &= \frac{321,4 \mu\text{g}/\text{mL} \times 5 \text{mL} \times \frac{25 \text{mL}}{5 \text{mL}}}{6,2 \text{mL} \times 50 \text{menit}} \\ &= 25,9 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}. \end{aligned}$$

Tabel K.6: Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Temperatur -4°C
(freezer)

Hari ke-	Suhu -4°C			
	A1	A2	A3	\bar{A}
0	0,223	0,225	0,228	0,225
1	0,178	0,181	0,181	0,180
2	0,167	0,165	0,166	0,166
3	0,159	0,155	0,157	0,157
4	0,137	0,139	0,135	0,137
5	0,118	0,117	0,122	0,119
6	0,106	0,105	0,099	0,103
7	0,091	0,089	0,090	0,090

Tabel K.7: Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Temperatur 4°C
(refrigerator)

Hari ke-	Suhu 4°C			
	A1	A2	A3	\bar{A}
0	0,223	0,225	0,228	0,225
1	0,187	0,188	0,192	0,189
2	0,178	0,176	0,174	0,176
3	0,159	0,157	0,149	0,155
4	0,138	0,142	0,139	0,139
5	0,127	0,136	0,127	0,130
6	0,127	0,126	0,128	0,127
7	0,111	0,109	0,113	0,111

Tabel K.8: Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Temperatur 30°C

Hari ke-	Suhu 30°C			
	A1	A2	A3	\bar{A}
0	0,223	0,225	0,228	0,225
1	0,131	0,134	0,140	0,135
2	0,127	0,123	0,131	0,127
3	0,113	0,117	0,130	0,120
4	0,089	0,097	0,096	0,094
5	0,087	0,084	0,093	0,088
6	0,084	0,083	0,79	0,082
7	0,071	0,076	0,091	0,076

Tabel K.9: Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Temperatur 50°C

Hari ke-	Suhu 50°C			
	A1	A2	A3	\bar{A}
0	0,223	0,225	0,228	0,225
1	0,099	0,105	0,102	0,103
2	0,088	0,087	0,092	0,089
3	0,065	0,061	0,057	0,061
4	0,056	0,058	0,062	0,059
5	0,049	0,048	0,051	0,049
6	0,037	0,039	0,038	0,038
7	0,017	0,022	0,019	0,019

Tabel K.10: Data Aktivitas Enzim Rata-rata pada Kestabilan Xilanase Amobil

Hari ke	AE rata-rata ($\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$)			
	-4°C (freezer)	4°C (refrigerator)	30°C	50°C
0	25,96	25,96	25,96	25,96
1	20,74	21,77	15,55	11,90
2	19,12	20,28	14,63	10,25
3	18,09	17,86	13,82	7,03
4	15,78	16,09	10,83	6,76
5	13,71	14,98	10,14	5,68
6	11,90	14,63	9,45	4,38
7	10,37	12,79	9,12	2,23



Lampiran L. Analisa Statistika

Lampiran L.1 Pengaruh Konsentrasi Substrat Xilan terhadap Aktivitas Xilanase Bebas dan Amobil

Tabel L.1 : Uji ANOVA dan BNJ 5% pada Variasi Konsentrasi Substrat

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Enzim Bebas	Between Groups	518,540	4	129,635	912,879	,000
	Within Groups	1,420	10	,142		
	Total	519,960	14			
Enzim Amobil	Between Groups	455,400	4	113,850	192,256	,000
	Within Groups	5,922	10	,592		
	Total	461,332	14			

Berdasarkan hasil uji statistika dinyatakan bahwa hasil F_{hitung} xilanase bebas = 912,879 dan $F_{tabel (0.05)} = 3,48$ sehingga $F_{hitung} > F_{tabel (0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing konsentrasi substrat berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase bebas. F_{hitung} xilanase amobil = 192,256 dan $F_{tabel (0.05)} = 3,48$ sehingga $F_{hitung} > F_{tabel (0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing konsentrasi substrat berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase amobil.

Xilanase Bebas

Tukey HSD^a

Konsentra si substrat	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0,1%	3	4,40000	6,56333	16,13667	19,01333
0,5%	3				
2%	3				
1,5%	3				
1%	3				
Sig.		1,000	1,000	,685	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Xilanase Amobil

Tukey HSD^a

Konsentrasi substrat	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0,1%	3	10,46000	17,53333	23,38333
0,5%	3			
2%	3			
1,5%	3			
1%	3			
Sig.		1,000	1,000	,214

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran L.2 Penggunaan Berulang Xilanase Amobil

Tabel L.2 : Uji ANOVA dan BNJ 5% pada Penggunaan Ulang Xilanase Amobil

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1557,483	4	389,371	6418,198	,000
Within Groups	,607	10	,061		
Total	1558,089	14			

Berdasarkan hasil uji statistika dinyatakan bahwa hasil F_{hitung} xilanase amobil = 6418,198 dan $F_{tabel(0.05)} = 3,48$ sehingga $F_{hitung} > F_{tabel(0.05)}$, artinya penggunaan berulang xilanase amobil berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase amobil.

Xilanase Amobil

Tukey HSD^a

Penggunaan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Kelima	3	31,9000 0				
Keempat	3		43,7666 7			
Ketiga	3			49,5000 0		
Kedua	3				57,5000 0	
Pertama	3					60,3000 0
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran L.3 Pengaruh Temperatur dan Lama Penyimpanan terhadap Kestabilan Xilanase Amobil

Tabel L.3 : Uji ANOVA dan BNJ 5% pada Variasi Temperatur dan Lama Penyimpanan Xilanase Amobil

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Temperatur	Between Groups	1119,704	3	373,235	12,417	,000
	Within Groups	2765,314	92	30,058		
	Total	3885,019	95			
Lama Penyimpanan	Between Groups	2239,408	7	746,470	24,444	,000
	Within Groups	5530,628	88	60,116		
	Total	6770,038	95			

Berdasarkan hasil uji statistika dinyatakan bahwa hasil F_{hitung} xilanase amobil pada variasi temperatur = 12,417 dan $F_{tabel(0.05)} = 2,70$ sehingga $F_{hitung} > F_{tabel(0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing variasi temperatur berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase bebas. F_{hitung} xilanase amobil pada variasi lama penyimpanan = 24,444 dan $F_{tabel(0.05)} = 2,13$ sehingga $F_{hitung} > F_{tabel(0.05)}$, artinya perlakuan masing-

masing lama penyimpanan berpengaruh nyata terhadap aktivitas xilanase amobil.

Variasi Temperatur

Tukey HSD^a

Temperatur	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
50°C	24	9,27419	13,64247	16,95949
30°C	24			
-4°C	24		16,95949	
4°C	24		18,04435	
Sig.		1,000	,162	,902

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Variasi Lama Penyimpanan

Tukey HSD^a

Hari ke-	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
7	12	8,53500				
6	12	10,0891	10,0891			
		7	7			
5	12	11,1275	11,1275			
		0	0			
4	12	12,3633	12,3633	12,3633		
		3	3	3		
3	12		14,2016	14,2016	14,2016	
			7	7	7	
2	12			16,0708	16,0708	
				3	3	
1	12				17,4916	
					7	
0	12					25,9600
						0
Sig.		,244	,169	,282	,435	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.