

**PENENTUAN KONDISI OPTIMUM REAKSI HIDROLISIS
SELULOSA PADA KULIT PISANG MENJADI GLUKOSA
SECARA ENZIMATIS**

SKRIPSI

oleh :
ADITYA SIH MAHAYANA
0310920001-92



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2007

**PENENTUAN KONDISI OPTIMUM REAKSI HIDROLISIS
SELULOSA PADA KULIT PISANG MENJADI GLUKOSA
SECARA ENZIMATIS**

SKRIPSI

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

oleh :
ADITYA SIH MAHAYANA
0310920001-92



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2007

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Aditya Sih Mahayana

NIM : 0310920001-92

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

“ Penentuan Kondisi Optimum Reaksi Hidrolisis Selulosa Pada Kulit Pisang Menjadi Glukosa Secara Enzimatis”

Dengan ini menyatakan bahwa :

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Agustus 2007
Yang menyatakan,

(Aditya Sih Mahayana)
NIM. 0310920001-92

PENENTUAN KONDISI OPTIMUM REAKSI HIDROLISIS SELULOSA PADA KULIT PISANG MENJADI GLUKOSA SECARA ENZIMATIS

ABSTRAK

Limbah kulit pisang melimpah di Indonesia. Kandungan selulosa dalam limbah kulit pisang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan glukosa oleh enzim selulase. Enzim selulase memutus ikatan β 1-4 pada selulosa sehingga dihasilkan glukosa. Enzim selulase yang digunakan merupakan hasil isolasi dari *Trichoderma viridae* secara sentrifugasi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum, parameter kinetika (kecepatan maksimum dan Konstanta Michaelis Menten) aktivitas ekstrak kasar selulase serta efisiensi biokonversi pada reaksi hidrolisis selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa. Penentuan kondisi optimum pada variasi pH, temperatur, dan waktu inkubasi dilakukan dengan mengukur aktivitas ekstrak kasar selulase. Aktivitas selulase dinyatakan dalam unit yaitu banyak glukosa (μ mol) yang dihasilkan per ml enzim per menit. Kadar glukosa dari tiap perlakuan diukur dengan metode Nelson Somogyi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kondisi optimum terjadi pada pH 4,5, temperatur 50°C, dan waktu inkubasi selama 20 menit dengan efisiensi biokonversi 2,17%. Nilai kecepatan maksimumnya adalah 0,143 unit dan Konstanta Michaelis Menten adalah 3,73 %. Hasil dari tiap perlakuan (pH, temperatur, dan waktu inkubasi) berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim pada uji BNT 5%.

DETERMINATION OF OPTIMUM CONDITION OF BANANA PEEL CELLULOSE HYDROLYSIS BECOME GLUCOSE ENZIMATICALLY

ABSTRACT

Banana peel waste is abundance in Indonesia. The cellulose content in banana peel waste can be utilized to yield glucose by the action of cellulase which break up the binding of β 1-4 in cellulose. In this research, the cellulase was isolated from *Trichoderma viride* by sentrifugation method. The aims of this research were to determine the optimum condition, the kinetic parameter (maximum velocity and Michaelis Menten constant value) of crude cellulase activity and also the bioconversion efficiency of banana peel cellulose hydrolysis become glucose. The determination of optimum condition at various pH, temperature, and incubation period have been done by measuring crude cellulase activity. The unit activity of crude celullase was calculated as quantity of glucose (μ mol) per ml enzyme per minute. The concentration of glucose was determined through the method of Nelson Somogyi. The result was indicated that optimum condition occured at pH 4.5, temperature 50°C, and 20 minutes of incubation period within bioconversion efficiency 2.17%. The maximum velocity was 0.143 unit, and constant value of Michaelis Menten was 3.73%. Each treatment (pH, temperature, and incubation period) showed significantly different at α =0.05.



KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Allah atas segala kasih dan kemurahanNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “PENENTUAN KONDISI OPTIMUM REAKSI HIDROLISIS SELULOSA PADA KULIT PISANG MENJADI GLUKOSA SECARA ENZIMATIS” dengan baik.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains pada jenjang pendidikan Strata 1 Kimia IPA Universitas Brawijaya Malang.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Arie Srihardyastutie, S.Si.,M.Kes. dan Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc. selaku Dosen Pembimbing I dan II, yang telah membimbing, mengarahkan, memberi kritik dan saran dalam penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Soebiantoro, Apt.MSc. selaku Dosen Penasehat Akademik, yang telah memberikan masukan dan arahan kepada penulis selama masa studi.
3. Dr. Atikah, Apt.Msi., Ir. Bambang Ismuyanto, MS., Dra. Tutik Setianingsih, Msi., Elvina Dhiaul Ifitah, S.SI., M.Si., selaku dosen penguji yang memberikan kritik dan saran dalam penyusunan skripsi ini.
4. Seluruh Dosen dan Staff Jurusan Kimia atas segala ilmu dan bantuannya.
5. Kedua orang tua dan Keluarga penulis yang memberikan kasih sayang, doa, semangat, dan perhatian hingga terselesainya skripsi ini.

Dengan keterbatasan ilmu, penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pihak yang berkepentingan.

Malang, Agustus 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	2
1.3. Batasan Masalah.....	2
1.4. Tujuan Penelitian.....	2
1.5. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Pisang dan Kulit Pisang.....	5
2.2. <i>Trichoderma viride</i>	5
2.3. Selulosa dan Enzim Selulase.....	6
2.3.1. Pengaruh pH.....	7
2.3.2. Pengaruh Temperatur.....	8
2.3.3. Pengaruh Waktu Inkubasi.....	8
2.4. Konstanta Michaelis Menten (K_M).....	9
2.4.1. Penurunan Konstanta Michaelis Menten (K_M).....	9
2.4.2. Penentuan Harga Konstanta Michaelis Menten (K_M).....	10
2.5. Hidrolisis Selulosa oleh Enzim Selulase.....	10
2.6. Penentuan Kadar D-Glukosa dengan metode Nelson-Somogyi.....	12
2.7. Hipotesis.....	13

BAB III. METODE PENELITIAN	15
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.2. Bahan dan Alat Penelitian.....	15
3.2.1 Bahan Penelitian.....	15
3.2.2. Bahan Kimia.....	15
3.2.3. Alat Penelitian.....	15
3.3. Metode Analisis Data.....	15
3.4. Tahapan Kerja.....	16
3.5. Cara Kerja.....	16
3.5.1. Pembuatan Substrat Bubur Kulit Pisang.....	16
3.5.2. Pembuatan Media Padat.....	17
3.5.3. Pembuatan Media Cair.....	17
3.5.4. Penanaman Biakan Kapang <i>Trichoderma viride</i>	17
3.5.5. Pembuatan kurva pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	17
3.5.6. Pembuatan Inokulum.....	18
3.5.7. Produksi Enzim.....	18
3.5.8. Isolasi Ekstrak Kasar Selulase.....	18
3.5.9. Penentuan Kadar Selulosa dalam Kulit Pisang.....	18
3.5.10. Perhitungan Kadar Selulosa dalam Kulit Pisang.....	19
3.5.11. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Standar Glukosa.....	19
3.5.12. Pembuatan Kurva Baku Larutan Glukosa.....	19
3.5.13. Penentuan Kondisi Optimum.....	20
3.5.13.a. Penentuan pH Optimum.....	20
3.5.13.b. Penentuan Temperatur Optimum.....	20
3.5.13.c. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum.....	20
3.5.13.d. Penentuan V_{maks} dan K_M	21
3.5.14. Perhitungan Kadar Glukosa.....	21
3.5.15. Penentuan Kadar Gula Pereduksi dengan Nelson Somogyi.....	21
3.5.16. Pengukuran Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase.....	22
3.5.17. Perhitungan Efisiensi Biokonversi Glukosa.....	22
3.5.18. Analisa Data.....	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1. Isolasi Ekstrak Kasar Selulase dari <i>Trichoderma viride</i>	23
4.2. Penentuan pH Optimum.....	23
4.3. Penentuan Temperatur Optimum.....	26

4.4.	Penentuan Waktu Inkubasi Optimum.....	28
4.5.	Penentuan V_{max} dan K_M	30
4.6.	Efisiensi Biokonversi Glukosa dari Hidrolisis Selulosa Kulit Pisang Secara Enzimatis.....	32
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....		35
5.1.	Kesimpulan.....	35
5.2.	Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA.....		36
LAMPIRAN		



DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 2.1. Struktur Bangun Selulosa.....	7
Gambar 2.2. Reaksi Hidrolisis Selulosa oleh Enzim Selulase.....	11
Gambar 2.3. Struktur Bangun Molybdenum Blue.....	13
Gambar 4.1. Grafik Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase.....	24
Gambar 4.2. Mekanisme Reaksi Enzim Selulase dalam Menghidrolisis Selulosa.....	25
Gambar 4.3. Grafik Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase.....	27
Gambar 4.4. Grafik Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase.....	29
Gambar 4.5. Grafik Hubungan Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase.....	30
Gambar 4.6. Grafik Hubungan $1/[S]$ terhadap $1/V_0$	31
Gambar 4.7. Ikatan Hidrogen antara Gugus Karboksilat Enzim dengan Gugus Fenol Tanin.....	33
Gambar 4.8. Ikatan Hidrogen antara Selulosa dengan Tanin....	33
Gambar L.3.1. Kurva Pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i> dalam Media Cair CMC-Mineral 1%.....	51
Gambar L.4.1. Grafik Panjang Gelombang Maksimum Larutan Baku Glukosa.....	52
Gambar L.5.1. Kurva Standart Larutan Glukosa.....	53

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 4.1. Kadar Glukosa dan Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase dengan Variasi pH.....	24
Tabel 4.2. Kadar Glukosa dan Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase dengan Variasi Temperatur.....	27
Tabel 4.3. Kadar Glukosa dan Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase dengan Variasi Waktu Inkubasi.....	28
Tabel L.3.1. Data Berat Kering pada Berbagai Waktu.....	51
Tabel L.5.1. Data Serapan pada Larutan Glukosa Baku.....	53
Tabel L.6.1. Serapan Glukosa terhadap Pengaruh pH.....	54
Tabel L.6.2. Serapan Glukosa terhadap Pengaruh Temperatur..	54
Tabel L.6.3. Serapan Glukosa terhadap Pengaruh Waktu Inkubasi.....	54
Tabel L.6.4. Serapan Glukosa terhadap Pengaruh Konsentrasi Substrat.....	55
Tabel L.9.1. Pengaruh pH terhadap Kadar Glukosa yang Dihasilkan.....	58
Tabel L.9.2. Pengaruh Temperatur terhadap Kadar Glukosa yang Dihasilkan.....	58
Tabel L.9.3. Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Kadar Glukosa yang Dihasilkan.....	58
Tabel L.9.4. Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Kadar Glukosa yang Dihasilkan.....	59
Tabel L.11.1. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Selulase.....	61
Tabel L.11.2. Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Selulase..	61
Tabel L.11.3. Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Selulase.....	61
Tabel L.11.4. Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Selulase.....	62
Tabel L.12. Data Efisiensi Biokonversi Glukosa pada Kondisi Optimum.....	63
Tabel L.13.1. Penentuan F_{hitung} pada Variasi pH.....	64
Tabel L.13.2. Analisa Ragam Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase.....	65
Tabel L.13.3. Uji BNT 5% pada Variasi pH.....	66
Tabel L.14.1. Penentuan F_{hitung} pada Variasi Temperatur.....	67

Tabel L.14.2. Analisa Ragam Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase.....	68
Tabel L.14.3. Uji BNT 5% pada Variasi Temperatur.....	69
Tabel L.15.1. Penentuan F_{hitung} pada Variasi Waktu Inkubasi.....	70
Tabel L.15.2. Analisa Ragam Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase.....	71
Tabel L.15.3. Uji BNT 5% pada Variasi Waktu Inkubasi.....	72

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1. Preparasi Larutan.....	39
Lampiran 2. Skema kerja.....	43
Lampiran 3. Kurva Pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	51
Lampiran 4. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Baku Glukosa.....	52
Lampiran 5. Kurva Standard Larutan Glukosa.....	53
Lampiran 6. Data Serapan Glukosa Dari Berbagai Perlakuan.....	54
Lampiran 7. Perhitungan Kadar Selulosa dalam Kulit Pisang.....	56
Lampiran 8. Perhitungan Kadar Glukosa.....	57
Lampiran 9. Data Berbagai perlakuan Terhadap Kadar Glukosa yang Dihasilkan.....	58
Lampiran 10. Perhitungan Aktivitas Selulase.....	60
Lampiran 11. Data Berbagai Perlakuan Terhadap Aktivitas Selulase.....	61
Lampiran 12. Perhitungan Efisiensi Biokonversi Glukosa Pada Kondisi Optimum.....	63
Lampiran 13. Uji Statistik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Selulase.....	64
Lampiran 14. Uji Statistik Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Selulase.....	67
Lampiran 15. Uji Statistik Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Selulase.....	70

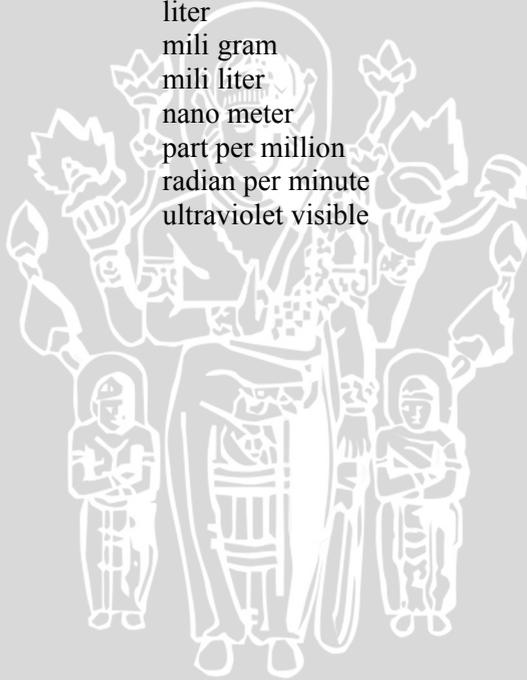


DAFTAR LAMBANG DAN ISTILAH

Simbol/singkatan

Keterangan

β	beta
μ g	mikro gram
μ mol	mikro mol
Bj	berat jenis
BM	berat molekul
cm	centi meter
CMC	carboxy methyl cellulose
g	gram
l	liter
mg	mili gram
ml	mili liter
nm	nano meter
ppm	part per million
rpm	radian per minute
UV-vis	ultraviolet visible



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pisang merupakan salah satu buah yang digemari dan jumlahnya melimpah di Indonesia. Menurut Hajar (2007), produksi pisang dapat mencapai 45.447,15 ton hingga 209.603 ton tiap tahunnya di daerah Banten dan Pasuruan. Pada umumnya, masyarakat Indonesia menggunakan pisang untuk membuat berbagai jenis makanan namun penanganan limbahnya belum optimal. Selama ini masyarakat Indonesia menggunakan kulit pisang sebagai nata (Setiawan, 2006).

Volk (2004) menyatakan bahwa *Trichoderma viridae* merupakan mikroba yang dapat digunakan untuk biokonversi selulosa menjadi glukosa karena mengandung enzim selulase. Secara umum, enzim selulase yang dihasilkan oleh *Trichoderma viridae* terdiri atas tiga enzim yaitu enzim eksoglukanase, enzim endoglukanase, dan enzim β -glukosidase (Beldman, 1995). Aktivitas enzim selulase dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, yaitu: temperatur, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH, adanya inhibitor dan aktivator berupa kofaktor atau berupa molekul organik (Lehninger, 1993), serta aktivitas enzim selulase diukur dalam satuan unit (Suhartono, 1989).

Ketiku (2006) menuliskan bahwa kulit pisang dari buahnya yang masak mengandung selulosa. Menurut Subramanian *et al.* (1988) kulit pisang mengandung 34,6% selulosa, 15,5% hemiselulosa, dan 6% lignin. Kandungan selulosa tersebut dapat dihidrolisis untuk menghasilkan glukosa dengan memecah ikatan β 1 \rightarrow 4 glikosida oleh enzim selulase (Voet *and* Voet, 2004). Saat ini sedang dikembangkan teknologi-teknologi pengelolaan limbah selulosa secara tepat guna salah satunya adalah pemanfaatan klobot jagung yang mengandung 38% selulosa (Hettenhaus, 2002) sebagai penghasil glukosa melalui proses hidrolisis selulosa klobot secara enzimatik yang dilakukan oleh Khoiriyah (2006).

Kemampuan hidrolisis suatu enzim sangat dipengaruhi oleh sumber (mikroorganisme) dan substrat yang digunakan. Penelitian yang dilakukan oleh Khoiriyah (2006), melaporkan bahwa kondisi kerja optimum hidrolisis selulosa klobot jagung menjadi glukosa

menggunakan ekstrak kasar selulase dari *Trichoderma viridae* berada pada pH 4,5, temperatur 50°C, dan waktu inkubasi selama 20 menit dengan efisiensi biokonversi 6,91%. Karena kondisi kerja optimum bagi setiap enzim berbeda-beda, tergantung jenis media yang digunakan. Oleh sebab itu, dalam penelitian ini dilakukan observasi terhadap kondisi optimum (pH, temperatur, dan waktu inkubasi) ekstrak kasar selulase hasil isolasi Kapang *Trichoderma viridae* pada reaksi hidrolisis selulosa menjadi glukosa dalam substrat kulit pisang sebagai studi perbandingan.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana kondisi optimum (pH, temperatur, dan waktu inkubasi) ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* pada reaksi hidrolisis selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa?
2. Bagaimana parameter kinetika (V_{maks} dan K_m) ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* pada reaksi hidrolisis selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa?
3. Berapakah efisiensi biokonversi hidrolisis selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa oleh ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* pada kondisi optimum?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Penelitian ini menggunakan ekstrak kasar selulase yang diisolasi dari kapang *Trichoderma viridae*.
2. Kulit pisang diperoleh dari buah pisang kepok yang telah masak.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

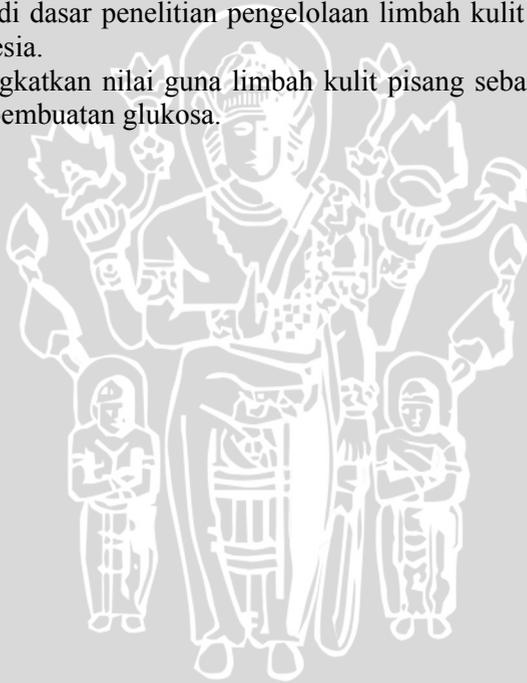
1. Mengetahui kondisi optimum (pH, temperatur, dan waktu inkubasi) ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* reaksi hidrolisis selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa.

2. Mengetahui parameter kinetika (V_{maks} dan K_m) ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* pada reaksi hidrolisis selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa.
3. Mengetahui efisiensi biokonversi hidrolisis selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa oleh ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* pada kondisi optimum.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat:

1. Memberikan data acuan reaksi hidrolisis selulosa dalam kulit pisang oleh ekstrak kasar selulase hasil isolasi dari Kapang *Trichoderma viride*.
2. Menjadi dasar penelitian pengelolaan limbah kulit pisang di Indonesia.
3. Meningkatkan nilai guna limbah kulit pisang sebagai bahan baku pembuatan glukosa.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pisang dan Kulit Pisang

Pisang merupakan buah yang multimanfaat. Bagian-bagian pisang dapat dimanfaatkan dengan baik. Misalnya kulit pisang yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan pembuat cuka dan sebagai penghasil glukosa sebagai bahan pemanis alternatif pengganti fruktosa (Huda, 2007). Secara ilmiah, pisang dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Syafa'at, 2006):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Famili	: Musaceae
Genus	: <i>Musa</i>

Kulit pisang dari buahnya yang masak mengandung selulosa (Ketiku, 2006). Menurut Subramanian *et al.* (1988) kulit pisang mengandung 34,6% selulosa, 15,5% hemiselulosa, dan 6% lignin. Kulit pisang dapat dimanfaatkan sebagai penghasil glukosa. Glukosa sangat bermanfaat sebagai gula alkohol, yaitu alternatif bahan pemanis pengganti gula tebu (sukrosa). Selain itu, glukosa sangat penting dalam tubuh kita. Glukosa tersebut terutama diperoleh dari sirkulasi darah otak karena glikogen sebagai cadangan glukosa sangat terbatas keberadaannya. Glukosa darah terutama didapat dari asupan makanan sumber karbohidrat. Pisang adalah alternatif terbaik untuk menyediakan energi di saat-saat istirahat atau jeda, pada waktu otak sangat membutuhkan energi yang cepat tersedia untuk aktivitas biologis (Richana, 2005).

2.2 *Trichoderma viridae*

Klasifikasi tentang Kapang *Trichoderma viridae* menurut Volk (2004) :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Eumycota
Kelas	: Deuteromycetes
Sub Kelas	: Hypomycetes
Ordo	: Moniliaeae

Familia : Trichoderma
Genus : *Trichoderma viridae*

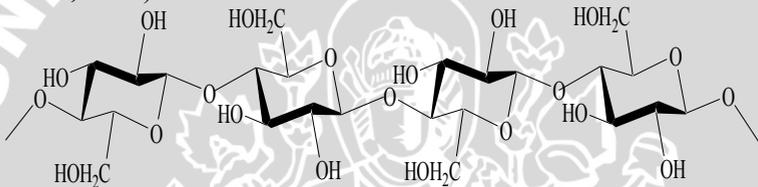
Dalam kelompok fungi terdapat beberapa spesies selulolitik tinggi. Mereka berbeda dari mikroorganisme lain yang dinyatakan bahwa filtrat kultur mereka mampu menyempurnakan proses hidrolisa selulosa alam. *Trichoderma viridae* merupakan salah satu spesies dari kapang jenis Trichoderma. Kapang ini memiliki aktivitas selulolitik karena dapat menghasilkan enzim selulosa yang cukup banyak dan bersifat cukup stabil. Spesies lain yang diketahui penghasil selulosa adalah *Trichoderma resei* dan *Trichoderma koninggi* (Judoamidjojo dkk., 1992).

Trichoderma viridae banyak dijumpai dalam tanah dan aktif pada proses amonifikasi serta dekomposisi selulosa. Ciri-ciri spesifik dari *Trichoderma viridae* adalah misellium berseptat, konidiovora bercabang banyak, septat dan ujung cabangnya merupakan sterigma, membentuk konidia bulat atau oval, berwarna hijau terang dan berbentuk bola-bola berlendir. *Trichoderma viridae* aktif dalam proses amonifikasi dan dekomposisi selulosa. *Trichoderma viridae* juga memproduksi antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan organisme lain (Fardiaz, 1989). *Trichoderma viridae* mempunyai kelebihan dibanding jenis kapang lainnya dalam mendekomposisi selulosa pada tanah, yaitu mampu berkembang biak meskipun pada suasana cukup asam pada pH berkisar 2,1-2,5 (De Hoog *et al.*, 2000).

Trichoderma viridae merupakan jamur yang banyak dijumpai pada lahan yang telah mati dan mempunyai aktivitas selulolitik (Beuchat, 1978). Spesies *Trichoderma viridae* strainnya digambarkan mempunyai aktivitas selulolitik tinggi (Rose, 1980). Aktivitas ini ditunjukkan dengan ditemukannya enzim selulase. Lima komponen enzim yang bekerja secara sinergis dalam selulase antara lain: enzim Ci yang telah diidentifikasi sebagai selobiohidrolase pada *Trichoderma viridae* dan *Trichoderma koninggi* (Agustien, 2003). Kemudian Beldman (1995) memisahkan enzim selulase dari *Trichoderma viridae* ke dalam 4 fraksi yaitu dua endo glukranase, sebuah eksoglukase, dan sebuah selobiase.

2.3 Selulosa dan Enzim Selulase

Selulosa merupakan polimer linear yang terdiri dari residu-residu D-glukosa. Jumlah residu D-Glukosa dalam selulosa dapat mencapai 15.000 residu dimana antar residunya dihubungkan oleh ikatan β 1 \rightarrow 4 glikosida (Voet, 2004). Selulosa sulit larut dalam air karena struktur selulosa merupakan bentuk kristalin. Bentuk ini akibat adanya ikatan hidrogen antar rantai polimer selulosa. Pembentukan struktur ini sangat mungkin karena bentuk polimer yang linear. Struktur yang demikian menyebabkan dalam proses biokonversi memerlukan kompleks enzim yang bekerja secara konsekutif atau paralel (Lehninger, 1995). Selulosa dapat ditentukan kuantitasnya melalui proses hidrolisis, biasanya dengan menggunakan asam mineral atau asam sulfat 72% (Ucar *and* Balaban, 2003).



Gambar 1. Struktur bangun selulosa

Menurut Voet (2004), selulase dapat memecah selulosa menjadi glukosa dengan memutus ikatan β 1 \rightarrow 4 glikosida. Secara umum aktivitas enzim selulase dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, yaitu: temperatur, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH, adanya inhibitor dan aktivator berupa kofaktor atau berupa molekul organik (Lehninger, 1995). Dan aktivitas enzim selulase diukur dalam satuan unit (Suhartono, 1989).

2.3.1 Pengaruh pH

Aktivitas selulase sangat dipengaruhi oleh perubahan pH.. Menurut Kulp (1975), bahwa pH optimum untuk aktivitas selulase kapang berkisar pada 4,5-6,5. Pada umumnya enzim hanya aktif pada kisaran pH yang terbatas. Nilai pH optimum suatu enzim ditandai dengan menurunnya aktivitas pada kedua sisi yang lain dari kurva, yang disebabkan oleh turunya afinitas atau stabilitas enzim (Irawadi, 1991).

Pengaruh pH pada aktivitas selulase disebabkan oleh terjadinya perubahan tingkat ionisasi pada sisi aktif selulase yaitu

pada rantai samping (gugus R) atau pada substrat sebagai akibat dari perubahan pH (Irawadi, 1991). Di dalam sel dan lingkungan sel sekelilingnya, pH dalam keadaan normal harus tetap, sebab adanya perubahan menyebabkan pergeseran enzim. Hal ini akan mempengaruhi dan mengacaukan sistem katabolitik dan anabolitik dalam sel dan jaringan (Girindra, 1993).

2.3.2 Pengaruh temperatur

Reaksi kimia sangat dipengaruhi oleh temperatur, maka reaksi yang dikatalis oleh enzim juga peka terhadap temperatur. selulase bekerja pada kondisi temperatur tertentu. Enzim ini akan menghasilkan aktivitas lebih besar pada kondisi optimum. Menurut Ahary (1996), temperatur optimum bagi kerja selulase umumnya berkisar antara 50°C-60°C. Selulase cenderung tahan terhadap pemanasan. Peningkatan aktivitas enzim cenderung sejalan dengan peningkatan temperatur reaksi. Jika temperatur dinaikkan, enzim akan mengalami denaturasi, akibatnya daya kerja menurun. Denaturasi merupakan peristiwa penyimpangan dari sifat alamiah protein (Girindra, 1993).

2.3.3 Pengaruh waktu inkubasi

Waktu inkubasi memiliki pengaruh terhadap enzim. Makin lama waktu inkubasi makin banyak enzim yang berikatan dengan substrat dan makin banyak pula produk yang terbentuk. Pada saat enzim telah jenuh dengan substrat, maka waktu inkubasi tidak lagi berpengaruh (Wirahadikusumah, 1994).

2.3.4 Isolasi selulase

Enzim dapat di isolasi dari jaringan hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Proses isolasi selulase dapat dilakukan dengan beberapa cara, seperti halnya isolasi pada enzim antara lain: metode ekstraksi, presipitasi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi, dan kromatografi (Judoamidjojo, dkk., 1992).

Pemisahan partikel dari larutan pada metode sentrifugasi merupakan operasi isolasi enzim. Ini termasuk pemisahan sel-sel dari medium biakan, pemisahan atau penyingkiran hancuran sel serta pengumpulan endapan (Judoamidjojo, dkk., 1989).

2.4 Konstanta Michaelis Menten (K_M)

Konstanta Michaelis Menten menunjukkan konsentrasi substrat pada saat kecepatan mencapai setengah dari kecepatan maksimum (Murray, 2006).

2.4.1 Penurunan konstanta Michaelis Menten

Mekanisme terbentuknya produk dari suatu substrat oleh enzim dapat digambarkan secara sederhana melalui persamaan (Mathews, 2000):



Enzim E dengan Substrat S pertama-tama bergabung dalam reaksi dapat balik, membentuk kompleks enzim-substrat ES. Kemudian kompleks ES membentuk produk.

Laju reaksi persamaan diatas dapat didefinisikan dalam persamaan:

$$V = k_2[ES] \quad (2.2)$$

[ES] biasanya merupakan besaran yang tidak dapat diukur. Besaran yang dapat diukur adalah konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim total, yaitu jumlah dari enzim bebas dan enzim dalam kompleks ES:

$$[E]_i = [E] + [ES] \quad (2.3)$$

Enzim total Enzim bebas Enzim dalam kompleks ES

Pada keadaan *steady state*, laju pembentukan dan penguraian kompleks ES adalah sama, sehingga dapat dinyatakan:

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (2.4)$$

$$[ES] = \left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \right) [E][S] \quad (2.5)$$

Kemudian konstanta laju reaksi digabungkan menjadi satu konstanta, yaitu K_M :

$$K_M = \left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \right) \quad (2.6)$$

sehingga persamaan (2.5) dapat ditulis:

$$K_M [ES] = [E][S] \quad (2.7)$$

Dengan memasukkan persamaan (2.3) didapat:

$$K_M [ES] = [E]_t[S] - [ES][S] \quad (2.8)$$

$$[ES] \cdot (K_M + [S]) = [E]_t[S] \quad (2.9)$$

$$[ES] = \frac{[E]_t[S]}{K_M + [S]} \quad (2.10)$$

Selanjutnya persamaan (2.10) dimasukkan ke persamaan (2.2):

$$V = \frac{k_2[E]_t[S]}{K_M + [S]} \quad (2.11)$$

Pada saat laju reaksi mencapai kecepatan maksimum (V_{max}), nilai $K_M \ll [S]$ sehingga jumlah K_M dan $[S]$ sama dengan nilai $[S]$ pada persamaan (2.11). Maka persamaan untuk V_{max} :

$$V_{max} = k_2[E]_t \quad (2.12)$$

Dengan mensubstitusikan persamaan (2.12) ke dalam persamaan (2.11) akan didapat persamaan Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.13)$$

2.4.2 Penentuan harga konstanta Michaelis-Menten

Penentuan secara langsung nilai laju reaksi maksimum dan harga konstanta Michaelis-Menten akan selalu membutuhkan konsentrasi substrat yang tinggi untuk mencapai kondisi yang jenuh. Persamaan linear Michaelis Menten mampu mengatasi kesulitan ini tanpa membuat konsentrasi substrat mencapai titik jenuh (Murray, et al., 2000). Persamaan ini didapat dengan memodifikasi persamaan (2.13) sehingga didapat :

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_M}{V_{max}} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.14)$$

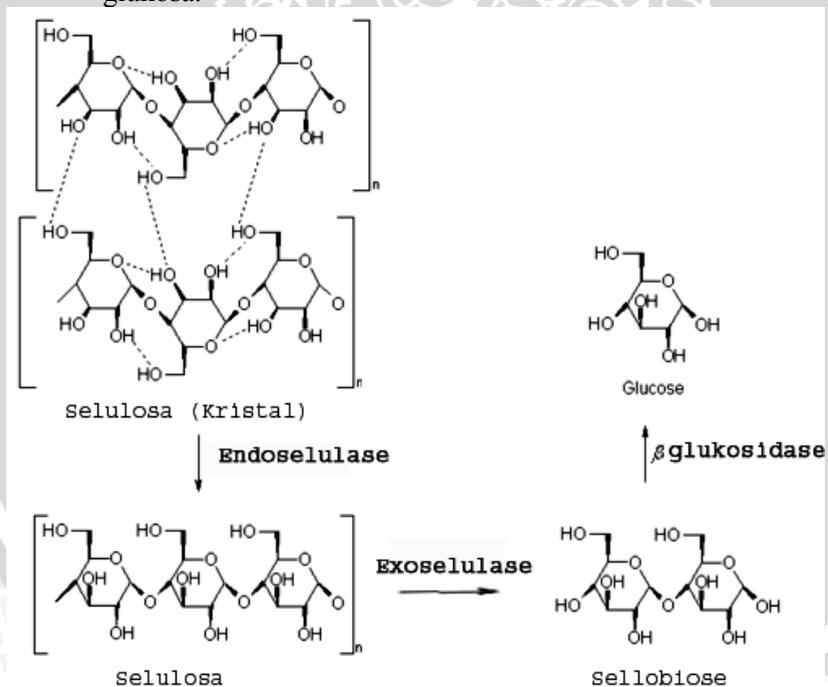
Persamaan (2.14) merupakan persamaan linear, $y = ax + b$, dimana $y = 1/v$ dan $x = 1/S$. Intersep garis (b) yang didapat adalah $1/V_{max}$ dan Slope (a) yang didapat adalah K_M/V_{max} .

2.5 Hidrolisis selulosa oleh enzim selulase

Hidrolisis merupakan proses pemecahan suatu substrat menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana dengan pertolongan air (Winarno, 1986).

Mekanisme hidrolisis selulosa oleh selulase dapat dilakukan karena enzim selulase memiliki 3 komponen enzim, yaitu (Rahman, 1992) :

1. Komponen C1 merupakan komponen yang mengubah struktur selulase kristalin sehingga dapat dicerna oleh komponen-komponen enzim selulase lainnya.
2. Komponen Cx (β -glukanase) terdiri dari endo- β -1,4 glukanase, dan exo- β -1,4 glukanase. Produk utama hasil aktivitas komponen Cx ini adalah selobiosa.
3. β -glukosidase merupakan komponen yang menghidrolisa selobiosa menjadi glukosa.

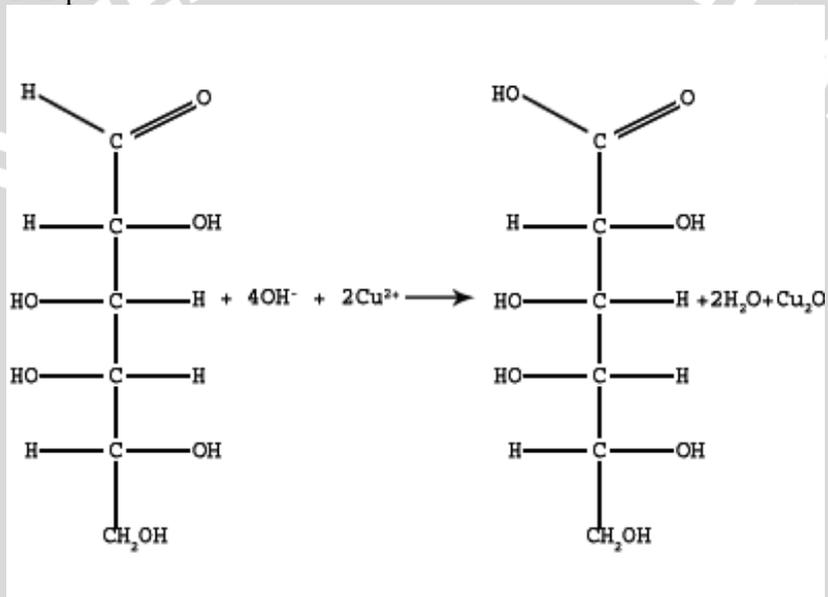


Gambar 2. Reaksi hidrolisis selulosa oleh enzim selulase

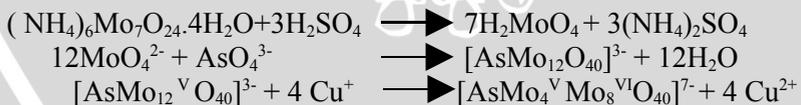
2.6 Penentuan kadar D-glukosa dengan metode Nelson-Somogyi

Penentuan kadar D-glukosa dengan metode ini melibatkan dua tahap reaksi yaitu reaksi D-glukosa dengan pereaksi Nelson menghasilkan produk Cu_2O berupa endapan merah bata. Kemudian reaksi kedua adalah antara Cu_2O dengan pereaksi Arsenomolibdat, di mana reaksinya sebagai berikut:

Tahap I:

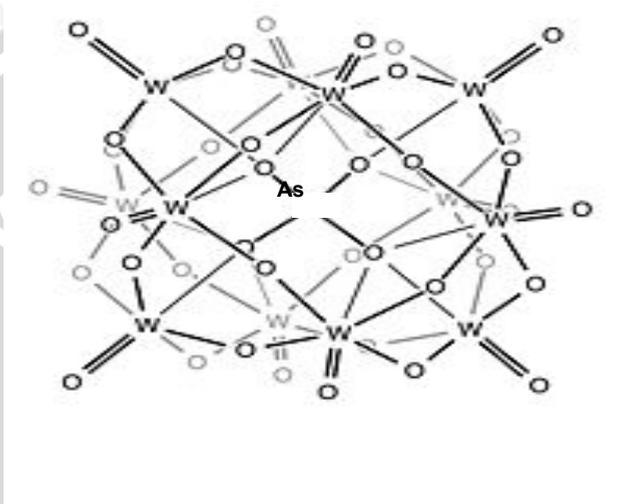


Tahap II:



Untuk pembuatan pereaksi arsenomolibdat, ammonium molibdat ditambah asam sulfat untuk menghasilkan asam molibdat (H_2MoO_4) yang larut pada kondisi asam berlebih. Arsenat dengan ammonium molibdat (dari asam molibdat) bereaksi menghasilkan

heteropoli molibdioarsenat (arsenomolibdat) yang dapat direduksi oleh tembaga (I) oksida menghasilkan kompleks berwarna biru $[\text{AsMo}_4^{\text{V}}\text{Mo}_8^{\text{VI}}\text{O}_{40}]^{7-}$ (Molybdenum blue) dengan λ_{maks} 740 nm dan intensitas ini tidak mengalami perubahan dalam 24 jam (Vogel, 1994).



Gambar 3. Struktur bangun molybdenum blue

Untuk penentuan kadar D-glukosa digunakan persamaan lambert-beer $A=c.b.c$ (mol/l) yang menyatakan hubungan antara besarnya serapan (A) terhadap konsentrasi D-glukosa, di mana jika dibuat grafik hubungan A dan C merupakan garis lurus dengan kemiringan ϵb dengan menggunakan kurva baku larutan D-glukosa untuk sampel yang belum diketahui kadar D-glukosanya bila ditentukan (Underwood, 1993).

2.7 Hipotesis

Ekstrak kasar selulase yang diisolasi dari *Trichoderma viridae* memiliki aktivitas dalam reaksi hidrolisis selulosa menjadi glukosa pada kulit pisang.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret – Mei 2007 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan penelitian

Kapang *Trichoderma viridae* diperoleh di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2.2. Bahan kimia

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: akuades, tween 80, Bacto pepton, Tepung agar. Sedangkan bahan-bahan lainnya memiliki tingkat kemurnian pro analisa (pa) antara lain: *Carboxy methyl cellulose*, Natrium hidroksida, Glukosa, Asam asetat, Natrium asetat, Kalium natrium tartrat tetrahidrat, Natrium karbonat anhidrat, Natrium sulfat anhidrat, Natrium hidrogen karbonat, Tembaga sulfat pentahidrat, Kalium permanganate, Natrium nitrat, Kalium hipofosfat, Magnesium sulfat heptahidrat.

3.2.3. Alat penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain: Seperangkat alat gelas, Autoclave, Jarum ose, Magnetik stirer, Oven, Neraca analitik, Inkubator, pH meter, Penangas air, Shaker, Spektrofotometer UV-Vis.

3.3. Metode Analisis Data

Metode analisis yang digunakan adalah metode percobaan dengan menggunakan ekstrak kasar selulase dari *Trichoderma*

viridae dalam menentukan kondisi optimumnya yang diaplikasikan pada substrat selulosa dari kulit pisang. Data yang diperoleh

dianalisa dengan menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL) klasifikasi satu arah dengan tiga variasi: pH, Temperatur dan Waktu inkubasi yang masing-masing dikenakan lima perlakuan dengan tiga kali pengulangan.

3.4. Tahapan Kerja

1. Pembuatan pereaksi
2. Penyiapan substrat
3. Pembuatan media
 - 3.1. media padat
 - 3.2. media cair
4. Penanam biakan murni *Trichoderma viridae*
5. Pembuatan kurva pertumbuhan *Trichoderma viridae*
6. Pembuatan inokulum
7. Produksi enzim
8. Isolasi ekstrak kasar selulase dari biakan *Trichoderma viridae*
9. Penentuan kadar selulosa dalam kulit pisang
10. Perhitungan kadar selulosa dalam kulit pisang
11. Tahapan analisa kadar gula pereduksi
 - 11.1. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan glukosa
 - 11.2. Pembuatan kurva baku larutan glukosa
 - 11.3. Uji kadar gula pereduksi dengan Nelson-Somogyi
12. Penentuan kondisi optimum ekstrak kasar selulase
 - 12.1. pH optimum
 - 12.2. Temperatur optimum
 - 12.3. Waktu inkubasi optimum
13. Penentuan V_{maks} dan K_M
14. Perhitungan kadar glukosa sampel
15. Pengukuran Aktivitas ekstrak kasar selulase
16. Perhitungan efisiensi biokonversi glukosa
17. Analisa data.

3.5. Cara Kerja

3.5.1. Pembuatan substrat bubur kulit pisang

Kulit pisang dicuci dan dipotong-potong kurang lebih 2 cm. Selanjutnya ditambahkan 10 ml akuades lalu kulit pisang diblender.

3.5.2. Pembuatan media padat

30 gram kentang dikupas dan dipotong kecil-kecil kemudian ditambahkan dengan 100 ml akuades. Selanjutnya dipanaskan selama 1 jam dan disaring. Filtrat ditambah 3 gram dekstrosa dan 2,3 gram agar sambil dididihkan hingga bercampur baik.

Untuk membuat agar miring, dipipet 5 ml ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas. Lalu disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit, pada temperatur 121°C, dan tekanan 15 psi. Setelah itu tabung reaksi diletakkan dalam posisi miring dan dibiarkan memadat.

3.5.3. Pembuatan media cair

Larutan CMC-mineral 1% sebanyak 800 ml dimasukkan dalam beaker glass 1L dan diatur pada pH 5 dengan menambahkan larutan asam asetat sedikit demi sedikit (pH awal campuran 5,1). Kemudian larutan ditambah dengan 1 ml bufer asetat pH 5. Lalu larutan diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya larutan ditutup dengan kapas dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit, 121°C, 15 psi. Lalu larutan dibiarkan dingin.

3.5.4. Penanaman biakan kapang *Trichoderma viridae*

Disiapkan jarum ose, kemudian dilakukan pemindahan secara aseptis kapang *Trichoderma viridae* ke dalam media padat (3.5.2) lalu diinkubasi selama 4 hari pada temperatur 30°C.

3.5.5 Pembuatan kurva pertumbuhan *Trichoderma viridae*

Diambil spora biakan murni *Trichoderma viridae* yang telah berumur 4 hari dari satu agar miring (3.5.4), kemudian disuspensikan dalam 10 ml akuades steril. Suspensi di ambil masing-masing 0,1 ml dan ditanam ke dalam 24 tabung erlenmeyer, dimana tiap tabung telah berisi 10 ml media cair steril. Biakan lalu diinkubasi di atas shaker pada temperatur kamar. Pengamatan dilakukan selama 0-100 jam. Pada 64 jam pertama dilakukan pengamatan setiap 12 jam

sekali. Sedangkan inkubasi jam 64 – 84 diamati setiap interval 4 jampertumbuhan dilakukan dengan cara menimbang berat kering sel yang diambil pada masing-masing interval. Selanjutnya di buat kurva pertumbuhan yang menunjukkan hubungan waktu (Sb. X) dengan berat kering (Sb. Y).

3.5.6. Pembuatan inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan dengan mengambil spora dari biakan murni *Trichoderma viridae* yang telah berumur 4 hari dari salah satu agar miring pada percobaan (3.5.4). Kemudian disuspensikan dalam 10 ml akuades steril. Suspensi di ambil masing-masing 2 ml dan ditanam ke dalam tiga buah erlenmeyer yang masing-masing berisi 13 ml media cair steril. Selanjutnya media diinkubasi dalam shaker sampai mencapai fasa setengah logaritmik yaitu pada jam ke-36.

3.5.7. Produksi enzim

Disiapkan 3 buah erlenmeyer 250 ml yang masing-masing berisi 150 ml media cair lalu disterilkan. Kemudian ditambahkan secara aseptis 15 ml inokulum (3.5.6). Selanjutnya media tersebut diinkubasi dalam shaker pada temperatur kamar sampai mencapai awal fase stasioner yaitu pada jam ke-60.

3.5.8. Isolasi ekstrak kasar selulase

Selulase diisolasi dari percobaan (3.5.7) dengan menambahkan 10 ml bufer asetat pH 5 pada tiap 150 ml media yang telah difermentasi (3.5.7) lalu disentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Kemudian dipipet supernatnya. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim selulase.

3.5.9. Penentuan kadar selulosa dalam kulit pisang

Substrat kulit pisang sebanyak 2,1600 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambah 150 mL akuades selanjutnya dipanaskan selama 2 jam kemudian disaring dan residu dicuci dengan akuades. Residu yang telah diperoleh ditambah dengan 150 mL H₂SO₄ 1 N dan direfluks selama 1 jam pada temperatur 100°C. Residu disaring kembali dan dicuci dengan

akuades panas selanjutnya dikeringkan dalam oven 105°C sampai berat konstan. Bahan kering dipindahkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambah 10 mL H₂SO₄ 72% dan direndam selama 4 jam. Setelah itu diencerkan dengan 150 mL larutan H₂SO₄ 1N dan direfluks pada temperatur 100°C selama 1 jam kemudian disaring dan residu dicuci dengan akuades panas dan dikeringkan dalam oven hingga berat konstan.

3.5.10. Perhitungan kadar selulosa dalam kulit pisang

Kadar selulosa dalam kulit pisang dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{W_{\text{residu 1}} - W_{\text{residu 2}}}{W_{\text{awal}}} \times 100\%$$

Dimana : W_{awal} = berat substrat kulit pisang awal

$W_{\text{residu 1}}$ = berat residu sebelum direndam dengan H₂SO₄ 72%

$W_{\text{residu 2}}$ = berat residu akhir

3.5.11. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan standar glukosa

Dibuat larutan baku glukosa 30 mg/L selanjutnya dipipet sebanyak 1,0 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambah 1,0 mL air bebas reduktor dan 1,0 mL pereaksi *Nelson* dan tabung reaksi dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit. Tabung diambil dan didinginkan. Setelah dingin ditambahkan 1,0 mL pereaksi Arsenomolibdat, dihomogenkan sampai semua endapan Cu₂O yang ada larut kembali dengan cara mengocok tabung reaksi yang telah berisi larutan uji. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambah air bebas reduktor sampai tanda batas. Selanjutnya dibaca serapannya pada panjang gelombang 500-800 nm.

3.5.12. Pembuatan kurva baku larutan glukosa

Disiapkan 10 tabung reaksi, masing-masing diisi dengan larutan baku glukosa 1,0 ml dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 mg/l. Kemudian semua tabung ditambah 1,0 ml akuades bebas

reduktor dan 1,0 ml pereaksi Nelson. Tabung ditutup dengan aluminium foil kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit. Tabung didinginkan, ditambah 1,0 ml pereaksi Arsenomolibdat lalu dikocok dan didiamkan beberapa menit. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambah air bebas reduktor sampai tanda batas. Selanjutnya dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan pada percobaan sebelumnya yaitu pada 746,5 nm.

Blanko yang digunakan diperlakukan seperti sampel tetapi penambahan 1 ml larutan baku glukosa diganti dengan 1 ml air bebas reduktor.

3.5.13. Penentuan kondisi optimum

a. Penentuan pH optimum

Substrat kulit pisang 3% (w/v) yang pHnya telah diatur sebelumnya pada pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 dimasukkan ke dalam 5 buah tabung reaksi masing-masing sebanyak 1,0 ml. Kemudian diinkubasi di atas penangas air pada temperatur 50°C selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 1,0 ml ekstrak kasar enzim selulase dan ditambahkan masing-masing 1 ml bufer asetat pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 pada tabung 1, 2, 3, 4, 5. Tiap campuran ini diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Setelah selesai diinkubasi, maka untuk menghentikan hidrolisis, tabung dimasukkan dalam penangas air mendidih selama 20 menit. Kemudian didinginkan dalam air es sampai temperatur kamar. Lalu dilakukan sentrifugasi dan diambil supernatannya. Kadar gula reduksi tiap tabung dianalisis dengan metode Nelson Somogyi. pH optimum dapat diketahui dari uji aktivitas enzim yang maksimum (3.5.13).

b. Penentuan temperatur optimum

Dilakukan prosedur seperti pada penentuan pH optimum (3.5.9.a) dengan kondisi pH 4,5 (pH optimum) dengan variasi temperatur antara lain : 40, 45, 50, 55, dan 60°C selama 30 menit. Kemudian dilakukan uji aktivitas untuk menentukan temperatur optimum.

c. Penentuan waktu inkubasi optimum

Dilakukan prosedur seperti pada penentuan temperatur optimum (3.5.9.b) dengan kondisi pH 4,5, temperatur 50°C (pH dan temperatur optimum) dengan variasi waktu inkubasi antara lain : 10; 15; 20; 25; 30 menit. Kemudian dilakukan uji aktivitas untuk menentukan temperatur optimum.

d. Penentuan V_{maks} dan K_M

Dilakukan uji aktivitas ekstrak kasar enzim pada konsentrasi substrat dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8% (w/v) dan dilakukan pada kondisi optimum yaitu pada pH 4,5, temperatur 50°C, dan waktu inkubasi 20 menit.

3.5.14. Perhitungan kadar glukosa

Kadar glukosa sampel dinyatakan dalam mg/L, yang dihitung dari nilai absorbansi yang dihasilkan dari tiap perlakuan kemudian diplotkan pada persamaan baku linear $y=ax$ pada kurva baku larutan glukosa. Kadar glukosa yang dihasilkan dikalikan dengan faktor pengenceran (fp).

3.5.15. Penentuan kadar gula pereduksi dengan Nelson Somogyi

Satu ml larutan yang akan diukur diencerkan sampai 10 ml dengan air bebas reduktor dalam labu ukur 10 ml. Kemudian dipipet 1,0 ml, ditambah 1,0 ml air bebas reduktor dan 1,0 ml pereaksi Nelson. Tabung ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit. Kemudian didinginkan dan ditambahkan 1,0 ml pereaksi Arsenomolibdat, dikocok dan didiamkan beberapa menit. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambah air bebas reduktor sampai tanda batas lalu dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum yaitu pada 746,5 nm.

Blanko yang digunakan diberi perlakuan sama dengan sampel tanpa substrat tetapi filtrat enzim dimatikan aktivitasnya dengan cara memanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit. Sedangkan kontrol yang digunakan diberi perlakuan sama dengan sampel tetapi filtrat enzim dimatikan aktivitasnya dengan cara memanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit sebelum dicampur dengan substrat.

3.5.16. Pengukuran aktivitas ekstrak kasar selulase

Aktivitas selulase dinyatakan dalam unit yaitu banyaknya μ mol produk yang dihasilkan per ml enzim tiap menit. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh, pada konsentrasi glukosa standar, kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa } (\mu \text{ g/ml}) \times V/p.q}{\text{BMproduk}} \times f_p$$

Dimana:

V = Volume total sampel tiap tabung (ml)

P = jumlah enzim (ml)

q = waktu reaksi (menit)

3.5.17. Perhitungan efisiensi biokonversi glukosa

Efisiensi biokonversi glukosa dari reaksi hidrolisis selulosa pada kulit pisang oleh ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* adalah perbandingan jumlah glukosa yang terbentuk terhadap jumlah selulosa pada kulit pisang, sehingga perhitungan efisiensi biokonversi glukosa dapat dirumuskan :

$$\text{efisiensi biokonversi} = \frac{\text{g glukosa}}{\text{g selulosa pada kulit pisang}} \times 100\%$$

3.5.18. Analisa data

Data yang diperoleh dari ketiga perlakuan berupa pH, Temperatur dan Waktu inkubasi dianalisa secara statistika dengan menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL). Apabila terdapat perbedaan diantara perlakuan akan diuji lebih lanjut dengan uji beda nyata terkecil (Yitnosumarto, 1993). Semua data percobaan diuji dengan tingkat kepercayaan 95 % atau beda nyata terkecil (BNT) 5%.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Ekstrak Kasar Selulase dari *Trichoderma viridae*

Isolasi ekstrak kasar selulase dilakukan dalam 3 tahap yaitu tahap pembuatan inokulum, produksi enzim, dan isolasi enzim. Pada tahapan awal, pembuatan inokulum dilakukan sampai fase setengah logaritma yaitu sampai jam ke 36. Sedangkan pada tahapan produksi enzim dilakukan sampai fasa awal stationer yaitu sampai jam ke 60. Setelah jam ke 60, pertumbuhan *Trichoderma viridae* tidak lagi efektif untuk memproduksi karena kapang semakin mendekati fasa kematian. Proses isolasi dilakukan dengan menambahkan bufer asetat ke dalam 3 buah erlenmeyer berisi 150 ml media cair. Kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm. Setelah itu diambil supernatannya. Supernatan yang diperoleh sebanyak 300 ml yang merupakan ekstrak kasar selulase.

Keberhasilan isolasi ekstrak kasar selulase ini diketahui dengan melakukan uji aktivitas pada substrat kulit pisang. Kondisi pengukuran dilakukan pada kondisi optimum literatur (Khoiriyah, 2006) yaitu pada pH 4,5; temperatur 50°C, dan waktu inkubasi 20 menit. Dari hasil uji aktivitas didapatkan aktivitas sebesar 0,567 unit. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Trisna (2007), ekstrak kasar selulase yang didapatkan memiliki konsentrasi enzim sebesar 3,858 mg/ml.

4.2 Penentuan pH Optimum

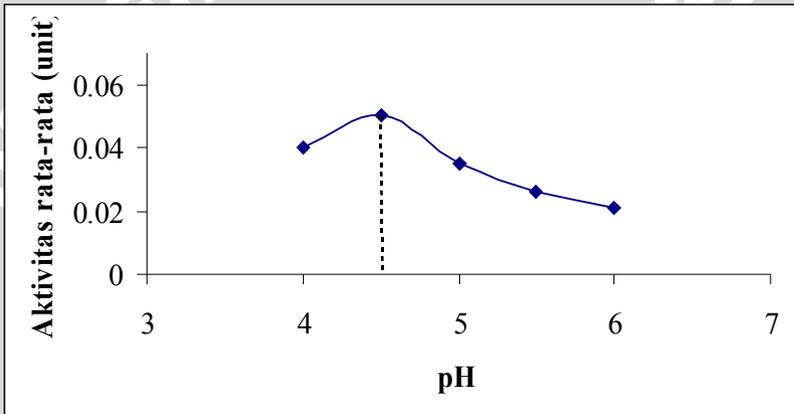
Aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh pH. Pada pH optimum, enzim akan memiliki aktivitas yang lebih besar karena enzim berada pada tingkat ionisasi yang sesuai untuk berikatan dengan substratnya.

Penentuan pH optimum reaksi hidrolisis selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa oleh ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* dilakukan dengan melakukan reaksi secara enzimatik dengan memvariasikan pH yaitu pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; dan 6,0.

Dari hasil penelitian, didapatkan kadar glukosa dan nilai aktivitas ekstrak kasar selulase selama proses biokonversi pada berbagai pH yang ditampilkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kadar Glukosa dan aktivitas ekstrak kasar selulase dengan variasi pH

pH	Rataan kadar glukosa (mg/L)	Rataan aktivitas selulase (unit)
4,0	72,679 ± 0	0,040 ± 0,707.10 ⁻³
4,5	89,245 ± 0,707.10 ⁻³	0,050 ± 0,707.10 ⁻³
5,0	62,391 ± 0,707.10 ⁻³	0,035 ± 0,707.10 ⁻³
5,5	46,760 ± 0	0,026 ± 0,707.10 ⁻³
6,0	37,408 ± 0	0,021 ± 0,707.10 ⁻³

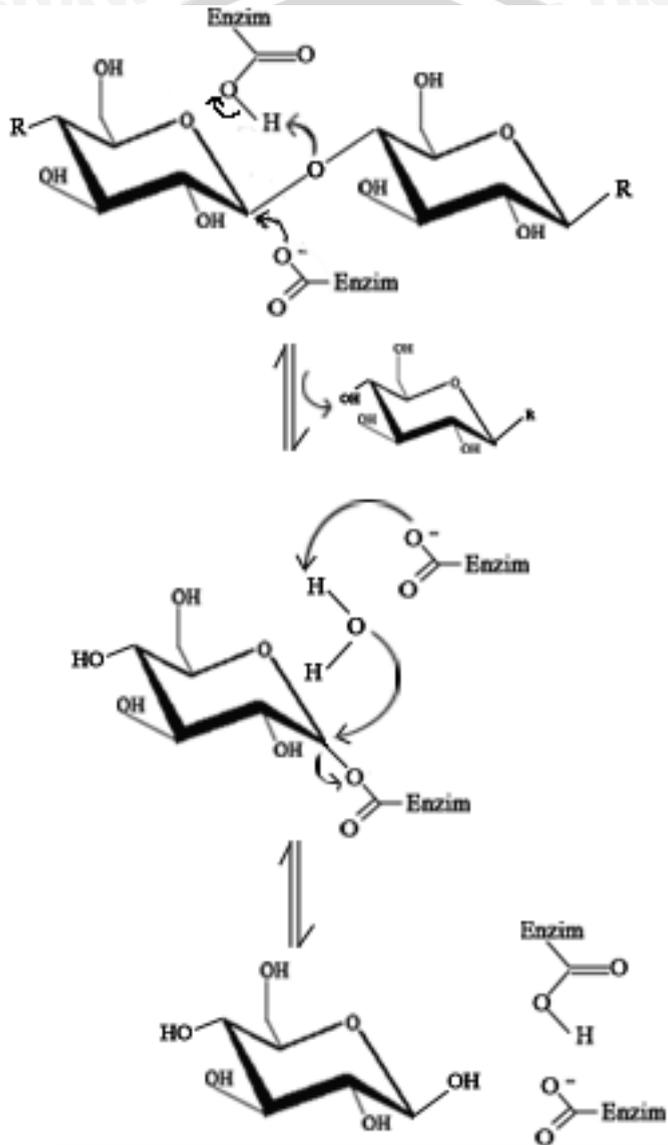


Gambar 4.1 Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase

Aktivitas tertinggi ekstrak kasar selulase dicapai pada pH 4,5 sehingga pH optimum ekstrak kasar selulase berada pada pH 4,5. Kenaikan aktivitas enzim terjadi pada pH 4 sampai pH 4,5 kemudian terjadi penurunan aktivitas ekstrak kasar selulase hingga pH 6,0. Dari hasil uji statistik (lampiran 12), didapat $F_{hitung} > F_{tabel0,05}$ sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan perlakuan pH terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* yang ditunjukkan berdasarkan pengukuran aktivitas. Untuk mengetahui perbedaan perlakuan masing-masing temperatur maka dilakukan uji $BNT_{0,05}$ sehingga diketahui perlakuan pada masing-masing temperatur terdapat perbedaan satu sama lain.

Enzim memiliki sisi aktif dengan gugus tertentu yang memungkinkan pembentukan kompleks enzim substrat. Menurut Wood (1990), gugus aktif selulase adalah gugus karboksilat

(-COOH). Mekanisme reaksi enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Mekanisme reaksi enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa

Gugus karboksilat $-\text{COOH}$ pada enzim memprotonasi atom O pada ikatan glikosida sementara gugus karboksilat $-\text{COO}^-$ enzim, yang bertindak sebagai nukleofil, menyerang atom C nomor satu yang berdekatan dengan ikatan glikosida terprotonasi. Hal ini menyebabkan ikatan glikosida tersebut putus dan terbentuk kompleks enzim substrat. Selanjutnya molekul H_2O sebagai nukleofil akan menyerang kompleks enzim substrat sehingga enzim akan terlepas kembali dan dihasilkan monomer glukosa.

Kenaikan aktivitas enzim terjadi pada pH 4 sampai dengan 4,5. Hal ini disebabkan karena terjadi ionisasi pada gugus aktif enzim ($-\text{COOH}$). Semakin tinggi pH maka gugus $-\text{COOH}$ asam amino akan cenderung terionisasi untuk melepaskan H^+ membentuk gugus karboksilat. Dengan bertambahnya gugus karboksilat yang terbentuk, maka enzim akan semakin mudah menyerang substrat untuk membentuk kompleks enzim-substrat sehingga produk yang terbentuk makin banyak. Pada pH optimum 4,5 jumlah ion H^+ yang terionisasi pada gugus karboksilat ($-\text{COOH}$) telah sesuai sehingga jumlah gugus karboksilat yang terbentuk juga sesuai untuk mengikat substrat. Kesesuaian ini mengakibatkan enzim memiliki aktivitas tertinggi. Aktivitas enzim mengalami penurunan setelah pH optimum 4,5. Hal ini disebabkan karena gugus karboksilat terlalu banyak yang terionisasi sehingga gugus karboksilat semakin sedikit sementara gugus karboksilat yang terbentuk semakin banyak. Akibatnya peluang enzim untuk memprotonasi substrat semakin kecil sehingga kompleks enzim substrat yang terbentuk semakin sedikit. Semakin sedikit kompleks enzim substrat yang terbentuk maka produk glukosa yang terbentuk juga semakin sedikit.

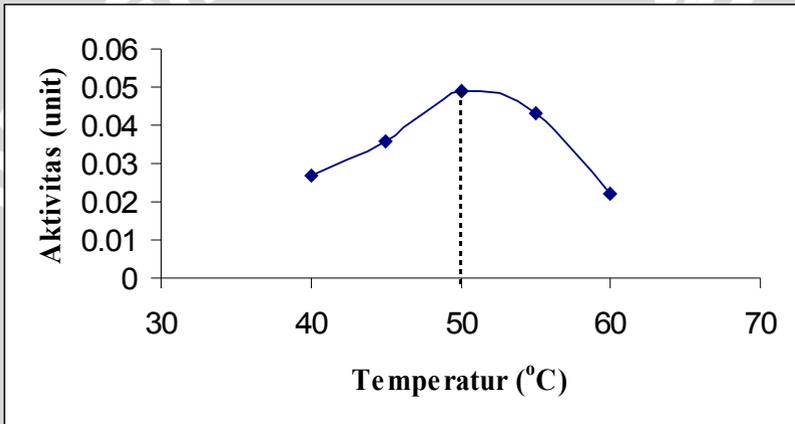
4.3 Penentuan Temperatur Optimum

Untuk menentukan temperatur optimum reaksi hidrolisis selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa oleh ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae*, dilakukan pengukuran pada pH optimum 4,5 dan dilakukan variasi temperatur antara lain 40°C , 45°C , 50°C , 55°C , dan 60°C .

Dari hasil penelitian, didapatkan kadar glukosa dan nilai aktivitas ekstrak kasar selulase yang ditampilkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Kadar Glukosa dan aktivitas ekstrak kasar selulase dengan variasi temperatur

Temperatur (°C)	Rataan kadar glukosa (mg/L)	Rataan aktivitas selulase (unit)
40	47,829 ± 0	0,027 ± 0,141.10 ⁻²
45	65,063 ± 0,707.10 ⁻³	0,036 ± 0
50	88,577 ± 0,141.10 ⁻²	0,049 ± 0,707.10 ⁻³
55	77,488 ± 0,707.10 ⁻³	0,043 ± 0
60	40,214 ± 0	0,022 ± 0,707.10 ⁻³



Gambar 4.3 Grafik pengaruh temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase

Aktivitas tertinggi ekstrak kasar selulase dicapai pada temperatur 50°C sehingga temperatur optimum ekstrak kasar selulase berada pada temperatur 50°C. Kenaikan aktivitas enzim terjadi pada temperatur 40°C sampai 50°C, dan penurunan aktivitas ekstrak kasar selulase terjadi pada temperatur 55°C hingga 60°C. Berdasarkan analisis statistik (lampiran 13) didapat $F_{hitung} > F_{tabel0,05}$, dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan perlakuan temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* yang ditunjukkan berdasarkan pengukuran aktivitas. Untuk mengetahui perbedaan perlakuan masing-masing temperatur maka dilakukan uji BNT_{0,05} sehingga diketahui perlakuan pada masing-masing temperatur terdapat perbedaan satu sama lain.

Kenaikan aktivitas ekstrak kasar selulase dari 40°C sampai dengan 50°C dapat terjadi karena adanya kenaikan energi kinetik

seiring dengan kenaikan temperatur. Kenaikan energi kinetik akan menyebabkan meningkatnya tumbukan-tumbukan antara enzim dan substrat untuk mencapai kompleks enzim-substrat ES sehingga produk semakin meningkat. Setelah mencapai 50°C, aktivitas ekstrak kasar selulase menurun. Penurunan aktivitas ini diperkirakan karena terjadi kerusakan partial pada struktur enzim. Perubahan temperatur yang semakin tinggi mengakibatkan tersedianya energi untuk merusak interaksi pada gugus polar (ikatan hidrogen, interaksi dipol-dipol) begitu pula pada interaksi gugus non polar dengan struktur enzim. Pada saat energi ini mengubah interaksi dalam enzim, maka struktur sekunder, tersier, atau kuaterner akan berubah. Perubahan ini mengakibatkan konformasi enzim berubah sehingga substrat akan mengalami kesulitan untuk masuk ke dalam sisi aktif enzim dan memungkinkan tidak terjadinya reaksi enzimatik. Jika temperatur terlalu tinggi, maka enzim akan terdenaturasi dan menyebabkan enzim menjadi tidak aktif.

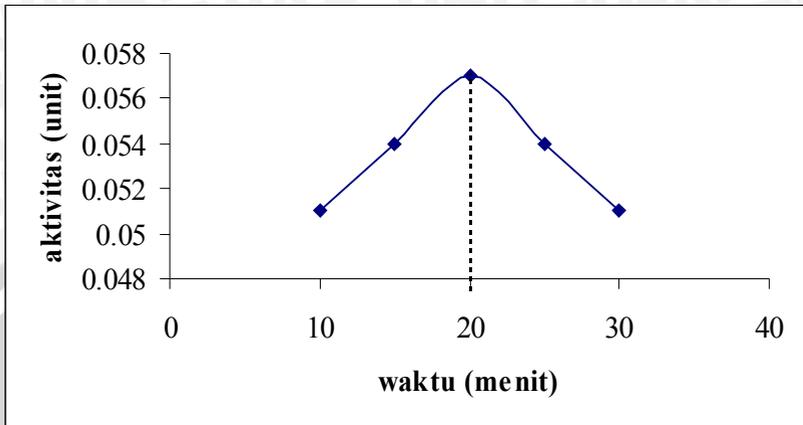
4.4 Penentuan Waktu inkubasi Optimum

Untuk menentukan waktu inkubasi optimum reaksi hidrolisis selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa oleh ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae*, dilakukan pengukuran pada pH optimum 4,5 temperatur 50°C dan dilakukan variasi waktu inkubasi antara lain 10, 15, 20, 25, dan 30 menit.

Dari hasil penelitian, didapatkan kadar glukosa dan nilai aktivitas ekstrak kasar selulase selama proses biokonversi pada berbagai pH yang ditampilkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.3 Kadar Glukosa dan aktivitas ekstrak kasar selulase dengan variasi waktu inkubasi

Waktu Inkubasi (menit)	Rataan kadar glukosa (mg/L)	Rataan aktivitas selulase (unit)
10	30,728 ± 0	0,051 ± 0
15	48,631 ± 0	0,054 ± 0,707.10 ⁻³
20	67,869 ± 0	0,057 ± 0,141.10 ⁻²
25	80,294 ± 0	0,054 ± 0,141.10 ⁻²
30	91,116 ± 0	0,051 ± 0,707.10 ⁻³



Gambar 4.4 Grafik pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase

Aktivitas tertinggi ekstrak kasar selulase dicapai pada waktu inkubasi 20 menit sehingga waktu inkubasi optimum ekstrak kasar selulase berada pada waktu inkubasi 20 menit. Kenaikan aktivitas enzim terjadi pada waktu 10 menit sampai 20 menit, dan penurunan aktivitas ekstrak kasar selulase terjadi pada waktu inkubasi 25 menit dan 30 menit. Berdasarkan analisis statistik (lampiran 14) didapat $F_{hitung} > F_{tabel0,05}$ sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan perlakuan waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* yang ditunjukkan berdasarkan pengukuran aktivitas. Untuk mengetahui perbedaan perlakuan masing-masing temperatur maka dilakukan uji $BNT_{0,05}$ sehingga diketahui perlakuan pada masing-masing temperatur terdapat perbedaan satu sama lain.

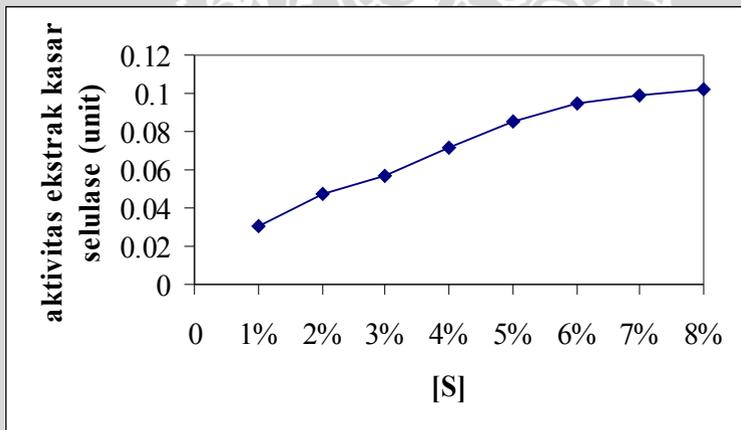
Pada waktu inkubasi belum mencapai 20 menit, aktivitas ekstrak kasar selulase belum mencapai aktivitas tertingginya. Hal ini disebabkan karena tidak semua enzim dan substrat membentuk kompleks enzim-substrat sehingga produk yang dihasilkan tidak maksimal. Waktu inkubasi mempengaruhi jumlah kompleks enzim-substrat yang terbentuk. Sebelum mencapai waktu inkubasi optimum, maka kompleks enzim-substrat yang terbentuk akan berbanding lurus dengan waktu inkubasi. Semakin lama waktu inkubasi maka semakin banyak kompleks enzim-substrat yang terbentuk yang akan menyebabkan produk juga semakin banyak terbentuk. Namun aktivitas ekstrak kasar selulase mengalami

penurunan setelah waktu inkubasi mencapai 20 menit. Hal ini disebabkan karena kompleks enzim-substrat telah jenuh sehingga produk yang akan dihasilkan akan tetap sedangkan waktu inkubasi semakin lama. Atau dengan kata lain semakin lama waktu inkubasi tidak lagi sebanding dengan penambahan jumlah produk sehingga aktivitas ekstrak kasar selulase menurun.

4.5 Penentuan V_{max} dan K_M

Penentuan kecepatan maksimum dan parameter kinetika dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi substrat antara lain 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, dan 8% pada reaksi hidrolisis selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa. Reaksi ini dilakukan pada kondisi optimumnya yaitu pada pH 4,5, temperatur 50°C, dan waktu inkubasi 20 menit.

Dari hasil penelitian diperoleh nilai aktivitas ekstrak kasar selulase pada berbagai konsentrasi substrat yang ditampilkan pada Gambar 4.5.



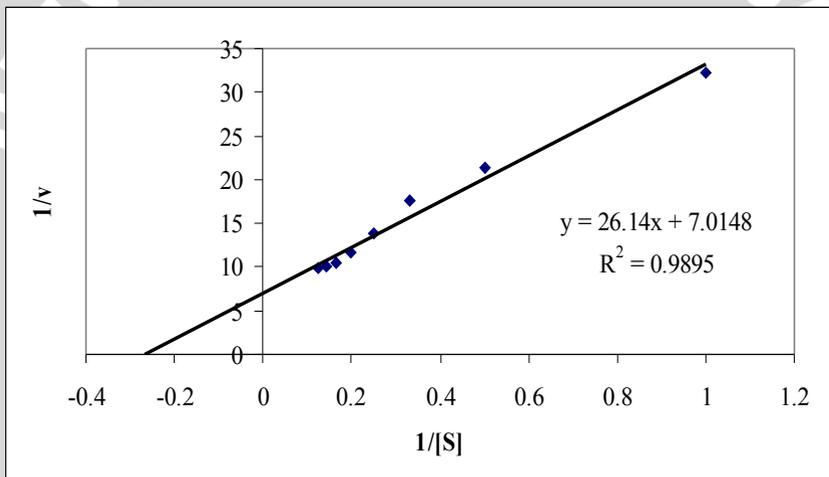
Gambar 4.5 Grafik hubungan konsentrasi substrat terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase

Gambar 4.5 tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi substrat yang rendah, maka aktivitas enzim juga rendah. Hal ini disebabkan karena kompleks enzim-substrat masih sedikit terbentuk sehingga glukosa yang dihasilkan juga sedikit. Semakin besar konsentrasi substrat, semakin banyak kompleks enzim-substrat yang terbentuk sehingga glukosa yang dihasilkan semakin banyak.

Persamaan Lineweaver-Burk digunakan untuk menentukan besarnya kecepatan maksimum dan konstantan Michaelis Menten. Persamaan tersebut adalah sebagai berikut:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (4.1)$$

Persamaan ini diperoleh dengan membuat grafik hubungan $1/[S]$ (sebagai sumbu x) terhadap $1/V_o$ (sebagai sumbu y). Dari grafik ini akan didapat persamaan linear $y = ax + b$. Intersep garis (b) yang didapat adalah $1/V_{\max}$ dan Slope (a) yang didapat adalah K_M / V_{\max} . Dari hasil penelitian, diperoleh grafik Lineweaver-Burk yang ditampilkan pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Grafik hubungan $1/[S]$ terhadap $1/V_o$

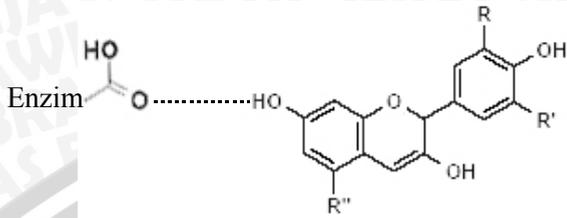
Berdasarkan grafik pada Gambar 4.6 diperoleh persamaan linear $y = 26,14x + 7,0147$ sehingga nilai V_{\max} sebesar 0,143 unit dan K_M sebesar 3,73%. K_M menunjukkan konsentrasi substrat pada saat kecepatan mencapai setengah dari kecepatan maksimum. Jadi reaksi hidrolisis selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa oleh ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* akan mencapai setengah dari kecepatan maksimum saat konsentrasi substrat kulit pisang yang digunakan sebesar 3,73%.

4.6 Efisiensi biokonversi glukosa dari hidrolisis selulosa kulit pisang secara enzimatis

Ekstrak kasar selulase hasil isolasi dari *Trichoderma viridae* bekerja menghidrolisis selulosa dalam substrat kulit pisang menjadi glukosa. Mekanisme kerja selulase dimulai dari aktivitas endoglukanase yang memecah selulosa murni dan menghasilkan selluloligosakarida yang merupakan substrat bagi eksoglukanase untuk dipecah menjadi sellobiosa. Selanjutnya, β -glukanase memutuskan ikatan β -1-4 glikosida pada sellobiose tersebut menjadi glukosa yang memiliki berat molekul lebih kecil.

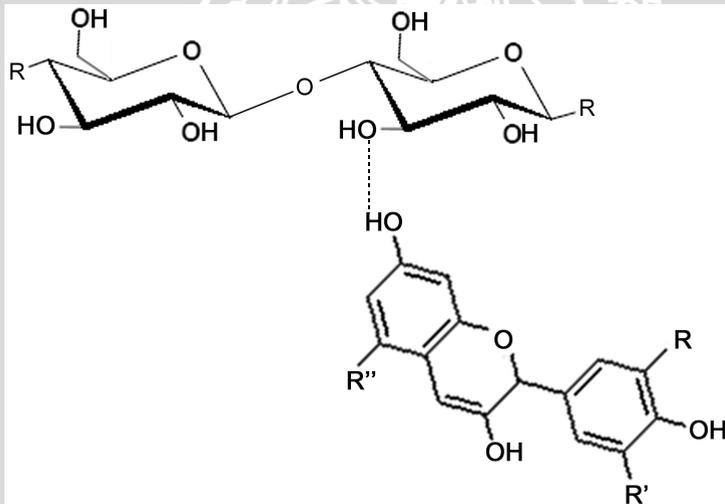
Efisiensi biokonversi glukosa dari reaksi hidrolisis selulosa pada kulit pisang oleh ekstrak kasar selulase hasil isolasi dari *Trichoderma viridae* adalah 2,17% (lampiran 11) pada kondisi optimum (pH 4,5, suhu 50°C, dan waktu inkubasi 20 menit). Menurut Khoiriyah (2006), efisiensi biokonversi glukosa pada klobot jagung oleh ekstrak kasar selulase hasil isolasi dari *Trichoderma viridae* yang diinduksi dengan klobot jagung adalah 6,91% pada kondisi optimum (pH, temperatur, waktu inkubasi) dan konsentrasi substrat yang sama. Dari kedua data tersebut diketahui bahwa efisiensi biokonversi yang dihasilkan dalam reaksi hidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan substrat kulit pisang lebih kecil daripada yang dihasilkan dengan menggunakan substrat klobot jagung. Hal ini mungkin disebabkan karena kulit pisang mengandung tanin sekitar 30% sampai 40 % (Mackay, 2001) sehingga terjadi inhibisi dalam proses pembentukan glukosa. Sedangkan pada klobot jagung tidak mengandung tanin (Lowry, 1992).

Tanin merupakan senyawa polifenol yang memiliki berat molekular cukup tinggi yang mengandung gugus hidroksil dan gugus-gugus lain seperti karboksil sehingga dapat membentuk kompleks yang kuat dengan protein dan beberapa makromolekul (Reed, 1995). Terdapat 2 macam tanin yaitu *hydrolizables* tanin dan *condensed* tanin. Sementara itu, Haslam (1998) menyatakan bahwa tanin dapat membentuk kompleks dengan protein, mineral, polisakarida, karbohidrat dan membran sel bakteri. Gugus fenol dari tanin merupakan donor hidrogen yang sangat baik untuk membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karboksil dari protein (Van Soest, 1994). Interaksi yang terjadi ditampilkan pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Ikatan hidrogen antara gugus karboksilat enzim dengan gugus fenol tanin

Sehingga interaksi yang terjadi antara tanin dengan ekstrak kasar selulase menyebabkan jumlah sisi katalitik ekstrak kasar selulase menjadi berkurang sehingga kompleks enzim-substrat terbentuk dalam jumlah yang sedikit. Hal ini mengakibatkan glukosa yang terbentuk sedikit. Van Soest (1994) menyatakan bahwa tanin, terutama *condensed* tanin, berinteraksi secara langsung dengan selulosa. Interaksi yang terjadi dimungkinkan melalui ikatan hidrogen yang ditampilkan pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Ikatan hidrogen antara selulosa dengan tanin

Interaksi ini akan menghalangi penetrasi enzim ke dalam substrat sehingga semakin sedikit proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa. Oleh sebab itu, untuk mendapatkan nilai efisiensi biokonversi yang

lebih besar, maka selulosa yang akan dihidrolisis dan enzim selulase yang akan digunakan harus bebas dari interaksi dengan senyawa-senyawa lain. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah dengan mengisolasi selulosa kulit pisang.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Kondisi optimum ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* pada reaksi hidrolisis selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa dicapai pada saat pH 4,5; dengan temperatur 50°C dan waktu inkubasi optimum selama 20 menit.
2. Kecepatan maksimum ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma viridae* pada reaksi hidrolisis selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa adalah 0,143 unit dengan Konstanta Michaelis- Menten (K_m) sebesar 3,73%.
3. Efisiensi biokonversi pada reaksi hidrolisis selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa oleh ekstrak kasar selulase hasil isolasi *Trichoderma Viridae* pada kondisi optimumnya adalah 2,17%

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan mengisolasi selulosa pada kulit pisang sebelum dilakukan reaksi hidrolisis.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustien, A. 2003. Isolasi, Pemurnian, Karakterisasi, dan Amobilisasi Enzim Selulase dari *Volvariella Volvacea*. Universitas Gunadarma. Jakarta.
- Ahary, A.. 1996. Penentuan Kondisi Optimum Produksi Enzim Selulase Pada Medium Semi Padat Dedak Padi. Departemen Biologi ITB. Bandung.
- Beldman, G. 1995. The Cellulase of *Trichoderma viridae*. Purification, Characterization, and Comparison of All Detectable Endoglucanases, Exoglucanases, and Beta Glucosidases. *European Journal of Biochemistry*. 146:301-308.
- Beuchat, R.L. 1978. Food and Beverage Mycology. Avi Publishing company Inc. Westport connecticut.
- De Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gene dan M. J. Figueras. 2000. Atlas of Clinical Fungi Vol. 1. Second Ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht. The Netherlands.
- Fardiaz, S. 1989. Mikrobiologi Pangan. P.A.U. Pangan dan Gizi IPB Bogor. hal. 15-21.
- Fay, R.C. dan J.M.Murry. 2004. Chemistry. Fourth Ed., Pearson Education Inc. New Jersey. hal. 318.
- Girindra, A. 1993. Biokimia 1. PT. Gramedia. Jakarta. hal. 43, 62.
- Hajar. 2007. Berita Pariwisata Dinas Informasi dan Komunikasi. <http://www.jatim.go.id/news.php> tanggal akses : 4 Februari 2007.
- Haslam, E. 1998. Practical Polyphenolics: from Structure to Molecular Recognition and Physiological Function. Cambridge University Press. Cambridge U.K.
- Hettenhaus, J. 2002. Talking About Corn Stover With Jim Hettenhaus. Biotechnol. Issue No.2, V.4.
- Huda, M.S.. 2007. Manfaat Pisang Terutama Buat Yang Kecanduan Rokok. <http://egi.acidblog.net/?p=13> tanggal akses : 23 Januari 2007.
- Irawadi, T.T. 1991. Produksi Enzim Ekstraseluler dari *Neurospora sitophila* Pada Substrat Limbah Padat Kelapa Sawit. Disertasi Program Pascasarjana IPB. Bogor.

- Judoamidjojo, M. Darwis dan G.E. Said. 1992. Teknologi Fermentasi. Rajawali Press. Jakarta. hal. 174-202.
- Ketiku, A.O. 2006. Chemical Compositon of Unripe (Green) and Ripe Plantain (*Musa Paradisiaca*). *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 24:703-707.
- Khoiriyah, A. 2006. Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Selulase dari *Trichoderma viridae* Untuk Biokonversi Selulosa dalam Klobot Jagung Menjadi Glukosa. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya
- Kulp, K. 1975. Carbohydrates. In G. Reed (Ed). Academic Press. New York. hal. 62.
- Lehninger, A.L. 1993. Dasar-Dasar Biokimia. Erlangga. Jakarta. hal. 86-88.
- Lowry, J.B., R.J. Petheram dan B. Tangendjaja. 1992. Plants Fed to Village Ruminants in Indonesia. Technical Reports No. 22. ACIAR. Canberra.
- Mackay dan B. Estates. 2001. Food Uses. <http://www.mackays.com> tanggal akses : 10 Juli 2007.
- Mathews, C.K., K.E.V.Holde, dan G.Ahern. 2000. Biochemistry. Third Ed., Adisson Wesley Publishing Company. San Fransisco.
- Murray, R.K., D.K.Granner dan V.W. Rodwell. 2006. Harper's Illustrated Biochemistry. 27th Ed., Mc Graw Hill. New York.
- Rahman, A. 1992. Teknologi Fermentasi. Penerbit ARCAN. Jakarta. hal. 134-138.
- Reed, J.D. 1995. Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *Journal of Animal Science*. 73:1516-1528.
- Richana, N. 2005. Mencari Alternatif Bahan Baku Gula. http://www.Republika_co_id.htm, tanggal akses : 24 Januari 2007.
- Rose, A.H. 1980. Microbial Enzymes and Bioconversions. Academic Press. New York.
- Setiawan, B. 2006. Kabupaten Pisang. <http://bsetiawan55.bloggerteam.com/entry.php> tanggal akses : 4 Februari 2007.

- Schalagel. 1990. General Microbiology. Sixth Ed., Cambridge University Press. New York. hal. 176-177.
- Subramanian, P.R., R.Kadirvel, K. Viswanathan dan Chandrasekaran. 1988. In Vitro Studies and Short-term Feeding Trial in Lambs To Evaluate Plantain Sheath (*Musa sapientum*) As A Feed For Ruminants. <http://musalit.inibap.org.mht> tanggal akses : 10 Juli 2007.
- Suhartono. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB. Bogor. hal. 142-150.
- Syafa'at, N. 2006. Pisang. <http://www.rusnasbuah.or.id>. tanggal akses : 4 Februari 2007.
- Ucar, G. dan M. Balaban. 2003. Hydrolysis of Polysaccharides with 77% Sulfuric Acid for Quantitative Saccharification. *Journal of Agriculture Forestr.* 27:361-365
- Underwood, A. L. dan R.A.Day Jr. 1993. Analisa Kimia Kuantitatif. Edisi keempat. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminants. Second Ed., Cornell University Press. Ithaca. New York. USA.
- Voet, D. dan J.G.Voet. 2004. Biochemistry. Third Ed., John Willey & Sons, Inc. USA. hal. 364-366.
- Vogel, A. I. 1994. A Textbook of Macro and Semimicro Qualitative Inorganic Analysis. Fourth Ed., Longmans. Green and Co Ltd. hal. 241-242.
- Volk, T. J. 2004. *Trichoderma viridae*, The Dark Green Parasitic Mold and Maker of Fungal-Digested Jeans. University of Wisconsin-La Crosse. USA.
- Wood, T.M. dan V. Garcia. 1990. Enzymology of Cellulose Degradation. Springer. Netherlands. hal. 147-161.
- Yitnosumarto, S. 1993. Percobaan Perancangan, Analisis dan Interpretasinya. Edisi kedua. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. hal. 18-20.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Preparasi larutan

1.1 Pembuatan larutan CMC mineral 1%:

Ditimbang bahan-bahan sebagai berikut:

❖ NaNO ₃	6 g
❖ KH ₂ PO ₄	2 g
❖ MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
❖ KCl	1 g
❖ FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,02 g
❖ Tween 80	2 ml
❖ Bacto Pepton	1 g
❖ CMC	10 g

Kemudian bahan-bahan tersebut dicampur dan dilarutkan dengan akuades sampai volume 1000 ml.

1.2 Pembuatan substrat kulit pisang 3% (w/v)

Ditimbang 3 gram bubuk kulit pisang kemudian dicampur dengan akuades, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

1.3 Pembuatan larutan asam asetat 0,2 M

Asam asetat 0,2 M dibuat dari larutan asam asetat glasial 100% (Bj : 1,05 g/ml; BM : 60 g/mol) dengan cara :

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

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

$$\begin{aligned} n_1 &= n_2 \\ V_1 \times 17,5 &= 100 \times 0,2 \\ V_1 &= 1,143 \text{ ml} \end{aligned}$$

Diambil 1,15 ml asam asetat dengan pipet ukur 5 ml. Kemudian diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 100 ml sampai tanda batas.

1.4 Pembuatan larutan H_2SO_4 1N

Larutan H_2SO_4 1 N dibuat dari larutan H_2SO_4 98%(v/v) dengan berat jenis 1,8 g/ml.

Tiap 1L, berat H_2SO_4 = 1000 ml x 1,8 g/ml x 98%

$$= 1800 \text{ g}$$

$$\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 98\%} = \frac{98}{100} \times 1800 \text{ g}$$

$$= \frac{98 \times 18 \text{ g}}{\text{Mr (98 g/mol)}}$$

$$= 18 \text{ mol}$$

Mol ekivalen

$$\frac{\text{Volume (ml)}}{\text{Volume (ml)}} = N, \text{ mol ekivalen } \text{H}_2\text{SO}_4 = \text{mol } \text{H}_2\text{SO}_4 \times \sum \text{H}^+$$

Untuk mendapatkan H_2SO_4 1N maka :

Mol ekivalen H_2SO_4 = 18 mol x 2 = 36 mol ekivalen \rightarrow 36 mol ek/L

36 mol ek = 36 N

Untuk membuat konsentrasi 1 N dilakukan pengenceran dengan rumus sebagai berikut:

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

$$V_1 \times 36 = 500 \times 1$$

$$V_1 = 13,9 \text{ ml}$$

Diambil 13,9 ml H_2SO_4 98%, kemudian diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 500 ml.

1.5 Pembuatan Larutan H_2SO_4 72%

Untuk membuat konsentrasi H_2SO_4 72% dilakukan pengenceran dengan rumus sebagai berikut :

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

$$V_1 \times 98\% = 10 \times 72\%$$

$$V_1 = 7,4 \text{ mL}$$

Diambil 7,4 mL H_2SO_4 98%, kemudian diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas.

1.6 Pembuatan larutan Na-asetat 0,2 M

BM Na-asetat = 82,0 g/mol

Gram Na-asetat = BM x M

$$= 82,0 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L}$$

$$= 16,4 \text{ g/L}$$

Jadi Na-asetat 0,2 M dibuat dengan menimbang 1,64 gram Na-asetat dan dimasukkan labu ukur 100 ml kemudian diencerkan dengan aquades sampai tanda batas.

1.7 Pembuatan akuades steril

Akuades dimasukkan ke dalam gelas kimia dan ditutup aluminium foil hingga rapat. Kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklav selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 15 psi.

1.8 Pembuatan air bebas reduktor

Akuades ditambah dengan KMnO_4 (6 - 8 tetes) kemudian didestilasi. Distilat yang diperoleh merupakan air bebas reduktor.

1.9 Pembuatan larutan stok glukosa 1000 mg/l

Ditimbang 0,1000 g glukosa anhidrat dengan neraca analitik dan dilarutkan dengan akuades dalam gelas beaker. Kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml dan diencerkan sampai tanda batas.

1.10 Pembuatan larutan baku glukosa

Dipipet 10,0 ml sediaan larutan baku glukosa 1000 mg/l, dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml dan diencerkan sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan baku glukosa 100 mg/l. Kemudian diambil berturut 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; dan 5,0 ml; dimasukkan labu ukur 10 ml dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan baku glukosa dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 mg/l.

1.11 Pembuatan pereaksi Nelson

Pereaksi Nelson merupakan campuran pereaksi Nelson A dan pereaksi Nelson B dengan perbandingan 25:1

1.12 Pembuatan pereaksi Nelson A

Dilarutkan 1,20 g K Na-tartrat, 2,40 g Na_2CO_3 anhidrat, 1,60 g NaHCO_3 dan 14,40 g Na_2SO_4 anhidrat ke dalam 80 ml akuades dengan pemanasan.

1.13 Pembuatan pereaksi Nelson B

Dilarutkan 2,00 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 18,00 g Na_2SO_4 anhidrat ke dalam 100 ml akuades.

1.14 Pembuatan pereaksi Somogyi

Dilarutkan 25,00 g Amonium molibdat dalam 450 ml akuades, ditambahkan 25 ml H_2SO_4 pekat. Dilarutkan pada yang lain 3,00 g $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 25 ml akuades, kemudian larutan ini dituang ke dalam larutan pertama dan disimpan dalam botol yang bagian luarnya dibungkus aluminium foil agar tidak tembus cahaya. Lalu diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam.

1.15 Pembuatan larutan bufer asetat

Untuk mendapat larutan bufer dengan pH yang diharapkan, dibuat dengan mencampur larutan asam asetat 0,2 M (lampiran 1.3) dan larutan Na-asetat 0,2 M (lampiran 1.4) berdasarkan persamaan dibawah ini :

$$\text{pH} = \text{pKa} - \log \frac{[\text{HOAc}]}{[\text{OAc}^-]}$$

Misalkan untuk membuat larutan bufer asetat dengan pH 4, maka 50 ml larutan asam aseta 0,2 M ditambah dengan 9,1 ml larutan Na-asetat 0,2 M dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{pKa} [\text{HOAc}] = 4,74$$

$$4 = 4,74 - \log \frac{(50,0 \text{ ml} \times 0,2 \text{ mmol/l})}{(v \text{ ml} \times 0,2 \text{ mmol/ml})}$$

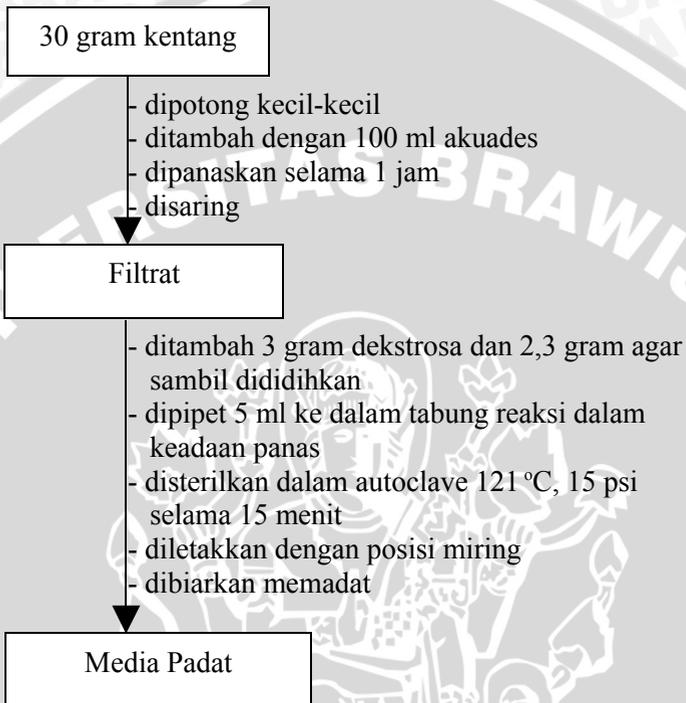
$$4 = 4,74 - \log \frac{50}{v}$$

$$v = 9,1 \text{ ml}$$

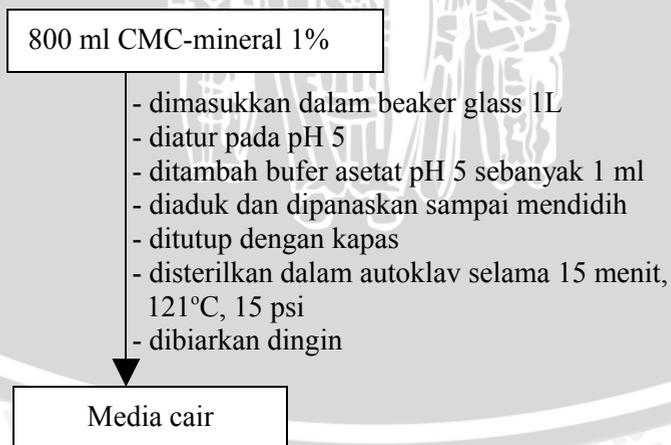
Lampiran 2. Skema kerja

1. Pembuatan media

1.1. media padat



1.2. media cair



2. Penanambian *Trichoderma viridae*

Trichoderma viridae

- dipindah secara aseptis ke dalam media padat
- ditutup dengan kapas
- diinkubasi selama 4 hari pada temperatur 30°C

Hasil biakan

3. Pembuatan kurva pertumbuhan

Hasil biakan *T. viridae*

- disuspensikan ke dalam 10 ml akuades steril
- dikerok spora *T. viridae* dengan jarum ose
- diambil masing-masing 0,1 ml
- dimasukkan ke dalam 24 tabung erlenmeyer yang masing-masing berisi media cair 10 ml
- diinkubasi di atas shaker pada temperatur kamar
- diamati pada setiap interval 12 jam dan sisanya pada interval 4 jam
- ditimbang berat kering sel
- dilakukan pengulangan sampai tiga kali

data

4. Pembuatan Inokulum

Kapang dari media padat

- ditransfer ke dalam 10 ml akuades steril
- dikocok
- diambil masing-masing 2 ml
- dimasukkan ke dalam 3 buah tabung erlenmeyer masing-masing berisi media cair steril 13 ml
- diinkubasi diatas shaker selama 36 jam

Larutan Inokulum

5. Produksi dan isolasi ekstrak kasar selulase

Larutan inokulum

- dipindah secara aseptis ke dalam 3 buah tabung erlenmeyer masing-masing berisi 150 ml media cair steril
- diinkubasi dalam shaker pada temperatur kamar sampai jam ke 52

Hasil inkubasi

- ditambah masing-masing 15 ml bufer asetat pH 5
- disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit

Ekstrak kasar selulase

7. Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar Glukosa

1 ml Larutan Baku Glukosa
(10, 20, 30, 40, 50 mg/l)

- ditambah 1 ml air bebas reduktor
- ditambah 1 ml pereaksi Nelson
- dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit
- didinginkan hingga temperatur tabung mencapai 25 °C
- ditambah 1 ml pereaksi Arsenomolibdat
- dikocok sampai semua endapan Cu_2O larut kembali
- ditambah 6 ml air bebas reduktor
- dikocok sampai homogen
- diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum

Kurva Standar

8. Pengukuran glukosa dengan Nelson-Somogyi

Larutan uji

- di ambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambah 1 ml air bebas reduktor
- ditambah 1 ml pereaksi Nelson
- ditutup dengan alumunium foil
- dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit
- didinginkan pada temperatur kamar
- ditambah 1 ml pereaksi Arsenomolibdat
- diaduk dan didiamkan beberapa menit
- ditambah 6 ml air bebas reduktor
- dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum dengan blanko yang sama dengan perlakuan pada sampel tapi filtrat enzim dimatikan

data

9. Penentuan kondisi optimum

9.1. pH optimum

1 ml Subtrat kulit pisang 3%

- dimasukkan masing-masing ke dalam 5 buah tabung reaksi
- di inkubasi di atas penangas air pada temperatur 50 °C selama 15 menit
- ditambah masing-masing 1 ml ekstrak kasar selulase
- ditambah 1ml bufer asetat pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0
- diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 30 menit
- dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar
- diuji kadar gula pereduksi dengan pereaksi Nelson-Somogyi

data

9.2. Temperatur optimum

1 ml Subtrat kulit pisang 3%

- dimasukkan masing-masing ke dalam 5 buah tabung reaksi
- di inkubasi di atas penangas air pada temperatur 50 °C selama 15 menit
- ditambah masing-masing 1 ml ekstrak kasar selulase
- ditambah 1ml bufer asetat pH 4,5
- diinkubasi pada temperatur 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, selama 30 menit
- dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar
- diuji kadar gula pereduksi dengan pereaksi Nelson-Somogyi

data

9.3 Waktu Inkubasi Optimum

1 ml Subtrat kulit pisang 3%

- dimasukkan masing-masing ke dalam 5 buah tabung reaksi
- di inkubasi di atas penangas air pada temperatur 50 °C selama 15 menit
- ditambah masing-masing 1 ml ekstrak kasar selulase
- ditambah 1ml bufer asetat pH 4,5
- diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 10, 15, 20, 25, 30 menit
- dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar
- diuji kadar gula pereduksi dengan pereaksi Nelson-Somogyi

data

9.4 Penentuan V_{maks} dan K_M

1 ml Subtrat kulit pisang 1,2,3,4,5%

- dimasukkan masing-masing ke dalam 5 buah tabung reaksi
- di inkubasi di atas penangas air pada temperatur 50 °C selama 15 menit
- ditambah masing-masing 1 ml ekstrak kasar selulase
- ditambah 1ml bufer asetat pH 4,5
- diinkubasi pada temperatur 50 °C dan waktu 20 menit
- dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar
- diuji kadar gula pereduksi dengan pereaksi Nelson-Somogyi

data

10. Penentuan kadar selulosa dalam kulit pisang

2,16 g kulit

- dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml
- ditambahkan 150 ml akuades
- dipanaskan selama 2 jam
- disaring

Residu

- dicuci dengan akuades
- ditambah 150 ml H_2SO_4 1 N
- direfluks selama 1 jam pada temperatur $100^\circ C$
- disaring dan dicuci dengan akuades panas
- dikeringkan dalam oven
- ditimbang beratnya

Bahan kering

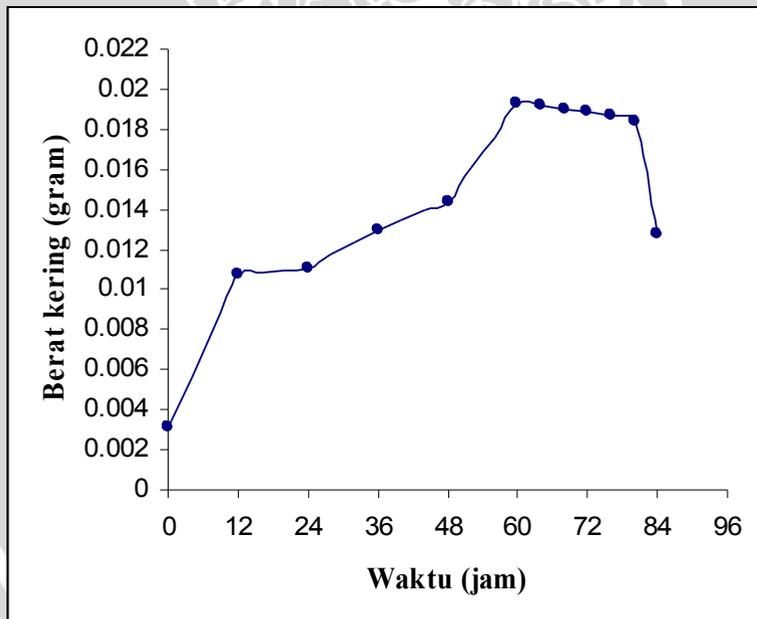
- ditambah 10 ml H_2SO_4 72%
- dibiarkan selama 4 jam
- diencerkan dengan 150 ml larutan H_2SO_4 1N
- direfluks pada temperatur $100^\circ C$ selama 1 jam
- disaring dan dicuci dengan akuades panas
- dikeringkan dalam oven
- ditimbang beratnya

data

Lampiran 3. Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viridae*

Tabel L.3.1 Data berat kering pada berbagai waktu

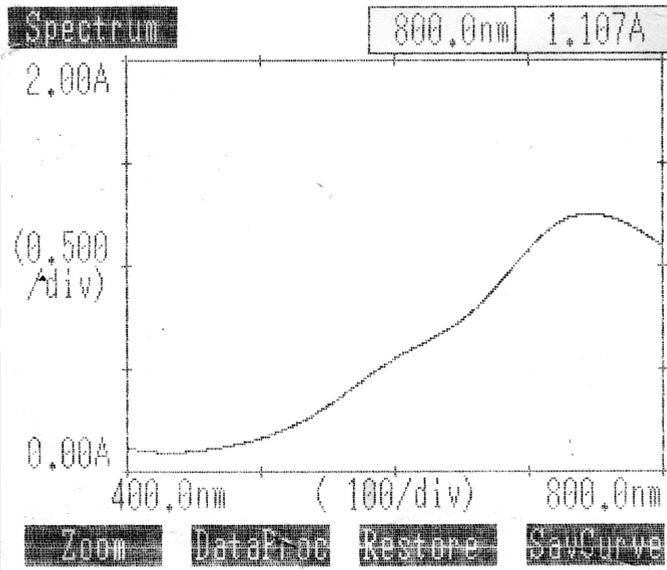
Waktu (jam)	Berat I (gram)	Berat II (gram)	Berat rata-rata
0	0.0026	0.0036	0.0031
12	0.0106	0.0108	0.0107
24	0.0109	0.0112	0.0111
36	0.0139	0.0121	0.0130
48	0.0157	0.0131	0.0144
60	0.0194	0.0192	0.0193
64	0.0193	0.0190	0.0192
68	0.0192	0.0188	0.0190
72	0.0190	0.0187	0.0189
76	0.0186	0.0187	0.0187
80	0.0183	0.0184	0.0184
84	0.0126	0.0130	0.0128



Gambar L.3.1 Kurva pertumbuhan *Trichoderma viridae* dalam media cair CMC-mineral 1%

Lampiran 4. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Baku Glukosa

08/Mar/07 11:50:19



08/Mar/07 11:49:05

Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
746.5	1.260		

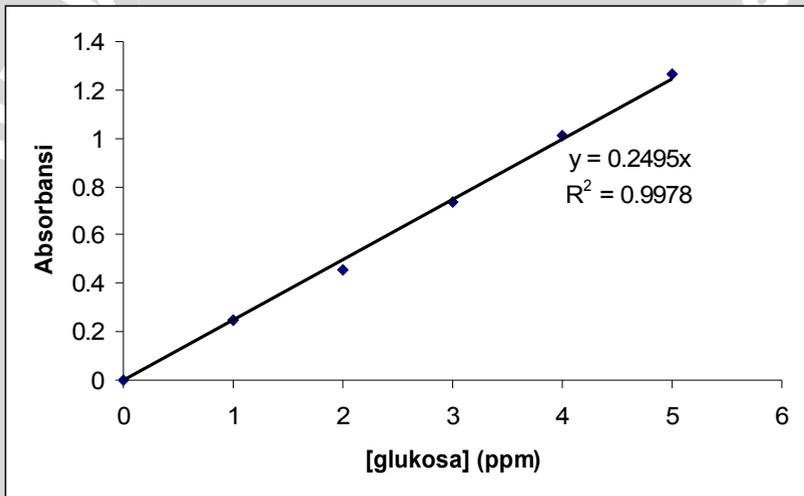
Graph Valley

Gambar L.4.1. Grafik panjang gelombang maksimum larutan baku glukosa

Lampiran 5. Kurva Standard Larutan Glukosa

Tabel L.5.1 Data serapan pada larutan glukosa baku

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (A1)	Absorbansi (A2)	Absorbansi Rata-rata
0	0	0	0
1	0,272	0,226	0,249
2	0,474	0,436	0,455
3	0,759	0,713	0,736
4	1,033	0,987	1,010
5	1,306	1,220	1,263



Gambar L.5.1 Kurva standart larutan glukosa

Lampiran 6. Data Serapan Glukosa dari berbagai perlakuan

Tabel L.6.1 Serapan glukosa terhadap pengaruh pH

pH	Serapan (A1)	Serapan (A2)	Serapan (A3)	Rata-rata Serapan
4,0	0,180	0,183	0,181	0,181
4,5	0,219	0,224	0,225	0,223
5,0	0,158	0,155	0,154	0,156
5,5	0,119	0,117	0,114	0,117
6,0	0,092	0,094	0,094	0,093

Tabel L.6.2 Serapan glukosa terhadap pengaruh temperatur

Temperatur (°C)	Serapan (A1)	Serapan (A2)	Serapan (A3)	Rata-rata Serapan
40	0,117	0,122	0,119	0,119
45	0,166	0,153	0,168	0,162
50	0,224	0,216	0,223	0,221
55	0,189	0,194	0,197	0,193
60	0,103	0,101	0,097	0,100

Tabel L.6.3 Serapan glukosa terhadap pengaruh waktu inkubasi

Waktu (menit)	Serapan (A1)	Serapan (A2)	Serapan (A3)	Rata-rata Serapan
10	0,078	0,075	0,077	0,077
15	0,122	0,120	0,122	0,121
20	0,168	0,171	0,169	0,169
25	0,200	0,199	0,202	0,200
30	0,230	0,227	0,225	0,227

Serapan di atas adalah serapan setelah dikurangi kontrol sebesar 0,46

Tabel L.6.4 Serapan glukosa terhadap pengaruh konsentrasi substrat

Konsentrasi Substrat	Serapan (A1)	Serapan (A2)	Serapan (A3)	Rata-rata Serapan
1%	0,091	0,096	0,095	0,094
2%	0,139	0,131	0,136	0,135
3%	0,170	0,168	0,173	0,170
4%	0,213	0,218	0,214	0,215
5%	0,253	0,258	0,255	0,255
6%	0,281	0,288	0,287	0,285
7%	0,299	0,293	0,296	0,296
8%	0,305	0,308	0,305	0,306

Serapan di atas adalah serapan setelah dikurangi kontrol sebesar 0,46



Lampiran 7. Perhitungan kadar selulosa dalam kulit pisang

Berat bubur kulit pisang awal = 2,16 gram

Berat residu 1 = 1,5668 gram

Berat residu 2 = 0,8916 gram

Perhitungan kadar selulosa (prosedur 3.5.11) adalah :

$$\begin{aligned}\text{Kadar selulosa} &= \frac{1,5668 - 0,8916}{2,16} \times 100\% \\ &= 31,26\%\end{aligned}$$



Lampiran 8. Perhitungan kadar glukosa

Perhitungan kadar glukosa didasarkan pada hasil absorbansi yang diplotkan pada persamaan kurva standar glukosa yaitu $y = 0,0249x$. Jika diperoleh serapan sebesar 0,180, maka:

$$y = 0,2495 x$$

$$0,180 = 0,2495 x$$

$$x = 0,721$$

Kadar glukosa yang terbentuk dihitung sebagai $x \cdot fp$, dimana fp (faktor pengenceran) adalah 100. Sehingga :

$$\text{Kadar glukosa} = 0,721443 \times 100 = 72,144 \text{ mg/L}$$



Lampiran 9. Data berbagai perlakuan terhadap kadar glukosa yang dihasilkan

Tabel L.9.1 Pengaruh pH Terhadap Kadar Glukosa yang Dihasilkan

pH	Kadar Glukosa (mg/L)			Rataan kadar glukosa
	I	II	III	
4,0	72,144	73,347	72,545	72,679 ± 0
4,5	87,776	89,780	90,180	89,245 ± 0,707.10 ⁻³
5,0	63,327	62,124	61,723	62,391 ± 0,707.10 ⁻³
5,5	47,695	46,894	45,691	46,760 ± 0
6,0	36,874	37,675	37,675	37,408 ± 0

Tabel L.9.2 Pengaruh Temperatur Terhadap Kadar Glukosa yang Dihasilkan

Temperatur (°C)	Kadar Glukosa (mg/L)			Rataan kadar glukosa
	I	II	III	
40	46,894	48,898	47,695	47,829 ± 0
45	66,533	61,323	67,335	65,063 ± 0,707.10 ⁻³
50	89,780	86,573	89,379	88,577 ± 0,141.10 ⁻²
55	75,752	77,756	78,958	77,488 ± 0,707.10 ⁻³
60	41,283	40,481	38,878	40,214 ± 0

Tabel L.9.3 Pengaruh Waktu Terhadap Kadar Glukosa yang Dihasilkan

Waktu (menit)	Kadar Glukosa (mg/L)			Rataan kadar glukosa
	I	II	III	
10	31,263	30,060	30,862	30,728 ± 0
15	48,898	48,096	48,898	48,631 ± 0
20	67,335	68,537	67,735	67,869 ± 0
25	80,160	79,760	80,962	80,294 ± 0
30	92,184	90,982	90,180	91,116 ± 0

Tabel L.9.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Kadar Glukosa yang Dihasilkan

[Substrat]	Kadar Glukosa (mg/L)			Rataan kadar glukosa
	I	II	III	
1%	36,473	38,477	38,076	$37,675 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
2%	55,711	52,505	54,509	$54,242 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
3%	68,136	67,335	69,339	$68,270 \pm 0$
4%	85,371	87,375	85,772	$86,172 \pm 0,141 \cdot 10^{-3}$
5%	101,403	103,407	102,204	$102,338 \pm 0$
6%	112,625	115,431	115,030	$114,362 \pm 0$
7%	119,840	117,435	118,637	$118,637 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
8%	122,245	123,447	122,245	$122,646 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$



Lampiran 10. Perhitungan aktivitas selulase

Perhitungan aktivitas selulase dinyatakan dalam persamaan:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa } (\mu \text{ g/ml}) \times V/p.q}{\text{BMproduk}} \times \text{fp}$$

Dimana:

V = Volume total sampel tiap tabung (ml)

P = jumlah enzim (ml)

q = waktu reaksi (menit)

fp = faktor pengenceran = 100 kali

BMproduk = BM glukosa ($180 \mu \text{ g/ml}$)

Contoh perhitungan:

Pengukuran aktivitas ekstrak kasar selulase pada pH 4.0 dengan data sebagai berikut:

Absorbansi = 0.180

p = 1 ml

V = volume substrat 1 ml+ volume bufer asetat
1 ml+volume ekstrak kasar selulase 1 ml
= 3 ml

q = 30 menit

Karena $y = 0.138x$, maka:

$0.180 = 0.2495x$

$x = 0,721 (\mu\text{g/ml})$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{0,721443 (\mu\text{g/ml}) \times 3 \text{ ml} \times 100}{180 (\mu\text{g}/\mu\text{mol}) \times 1 \text{ ml} \times 30 \text{ menit}} \\ &= 0,040 \mu\text{mol/ml menit} \\ &= 0,040 \text{ Unit} \end{aligned}$$

Dengan perhitungan yang sama akan diperoleh aktivitas ekstrak kasar selulase secara keseluruhan.

Lampiran 11. Data berbagai perlakuan terhadap Aktivitas Selulase

Tabel L.11.1 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Selulase

Perlakuan (pH)	Aktivitas Selulase (unit)			Rataan aktivitas selulase
	I	II	III	
4,0	0,040	0,041	0,040	$0,040 \pm 0,707.10^{-3}$
4,5	0,049	0,050	0,050	$0,050 \pm 0,707.10^{-3}$
5,0	0,035	0,035	0,034	$0,035 \pm 0,707.10^{-3}$
5,5	0,026	0,026	0,025	$0,026 \pm 0,707.10^{-3}$
6,0	0,020	0,021	0,021	$0,021 \pm 0,707.10^{-3}$

Tabel L.11.2 Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Selulase

Temperatur (°C)	Aktivitas Selulase (unit)			Rataan aktivitas selulase
	I	II	III	
40	0,026	0,027	0,026	$0,027 \pm 0,141.10^{-2}$
45	0,037	0,034	0,037	$0,036 \pm 0$
50	0,050	0,048	0,050	$0,049 \pm 0,707.10^{-3}$
55	0,042	0,043	0,044	$0,043 \pm 0$
60	0,023	0,022	0,022	$0,022 \pm 0,707.10^{-3}$

Tabel L.11.3 Pengaruh Waktu Terhadap Aktivitas Selulase

Waktu (menit)	Aktivitas Selulase (unit)			Rataan aktivitas selulase
	I	II	III	
10	0,052	0,050	0,051	$0,051 \pm 0$
15	0,054	0,053	0,054	$0,054 \pm 0,707.10^{-3}$
20	0,056	0,057	0,056	$0,057 \pm 0,141.10^{-2}$
25	0,053	0,053	0,054	$0,054 \pm 0,141.10^{-2}$
30	0,051	0,051	0,050	$0,051 \pm 0,707.10^{-3}$

Tabel L.11.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Selulase

[Substrat]	Aktivitas Selulase (unit)			Rataan aktivitas selulase
	I	II	III	
1%	0,030	0,032	0,032	$0,031 \pm 0,707.10^{-3}$
2%	0,046	0,044	0,045	$0,045 \pm 0$
3%	0,057	0,056	0,058	$0,057 \pm 0$
4%	0,071	0,073	0,071	$0,072 \pm 0,707.10^{-3}$
5%	0,085	0,086	0,085	$0,085 \pm 0,707.10^{-3}$
6%	0,094	0,096	0,096	$0,095 \pm 0,707.10^{-3}$
7%	0,100	0,098	0,099	$0,099 \pm 0$
8%	0,102	0,103	0,102	$0,102 \pm 0,707.10^{-3}$



Lampiran 12. Perhitungan efisiensi biokonversi glukosa pada kondisi optimum

Efisiensi glukosa pada kondisi optimum dapat dihitung dari kadar glukosa yang terbentuk pada kondisi optimum dengan rumus:

$$\text{efisiensi biokonversi} = \frac{\text{g glukosa}}{\text{g selulosa pada kulit pisang}} \times 100\%$$

Contoh perhitungan :

Pada kondisi optimum (pH 4,5, suhu 50°C, dan waktu inkubasi 20 menit) didapat kadar glukosa sebesar 67,735 mg/L, dari 3 ml larutan sampel (terdiri dari 1 ml substrat 3%, 1ml bufer, dan 1 ml enzim). Dalam 1 ml substrat mengandung 30 mg kulit pisang. Kulit pisang mengandung 31,26% selulosa sehingga dalam 1 ml substrat kulit pisang mengandung 9,378 mg selulosa.

$$\begin{aligned}\text{efisiensi biokonversi} &= \frac{3 \times 67,735 \cdot 10^{-3} \text{ mg}}{9,378 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 2,17\%\end{aligned}$$

Dari perhitungan yang serupa maka akan didapat efisiensi biokonversi glukosa pada kondisi optimum sebagai berikut:

Tabel L.12 Data efisiensi biokonversi glukosa pada kondisi optimum

Substrat (%)	Efisiensi biokonversi glukosa (%)			Rata-rata efisiensi biokonversi glukosa
	I	II	III	
3	2,15	2,19	2,17	2,17 ± 0

Lampiran 13. Uji Statistik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Selulase

Data aktivitas ekstrak kasar selulase dianalisa secara statistik dengan menggunakan metode Rancang Acak Lengkap (RAL) sebagai berikut:

Tabel L.13.1 Penentuan F_{hitung} pada variasi pH

pH	Aktivitas Selulase (unit)			Total	Rataan aktivitas
	I	II	III		
4,0	0,040	0,041	0,040	0,121	$0,040 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
4,5	0,049	0,050	0,050	0,149	$0,050 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
5,0	0,035	0,035	0,034	0,104	$0,035 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
5,5	0,026	0,026	0,025	0,078	$0,026 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
6,0	0,020	0,021	0,021	0,062	$0,021 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
				0,514	0,171

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

1. Menghitung faktor koreksi (FK)

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{0,263}{15} = 0,018$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK)

- a. Jktotal (JKT)

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

$$= (0,040^2 + \dots + 0,021^2) - 0,018 = 1,602 \cdot 10^{-3}$$

- b. Jkperlakuan (JKP)

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

$$= (0,121^2 + \dots + 0,062^2) - 0,018 = 1,599 \cdot 10^{-3}$$

c. Jkgalat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 1,602.10^{-3} - 1,599.10^{-3} = 3.10^{-6}$$

3. Menghitung kuadrat tengah (KT)

$$a. \text{KTperlakuan} = \frac{JKP}{dbperlakuan} = \frac{1,599.10^{-3}}{4} = 3,998.10^{-4}$$

$$b. \text{KTgalat percobaan} = \frac{JKG}{dbpercobaan} = \frac{3.10^{-6}}{10} = 3.10^{-7}$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{3,998.10^{-4}}{3.10^{-7}} = 1,333.10^3$$

5. $F_{tabel} 5\% = F(0.05; 4, 10) = 3,48$

Karena $F_{hitung} > F_{tabel}$ maka H_0 ditolak, artinya variasi pH berpengaruh terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase. Untuk mengetahui variasi pH mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0.05$.

$$\begin{aligned} BNT_{5\%} &= t_{(\alpha/2; db)} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 3.10^{-7}/3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 4,472.10^{-4} = 9,964.10^{-4} \end{aligned}$$

Tabel L.13.2 Analisa ragam pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase

Sumber Keragaman	dB	JK	KT
Perlakuan	4	$1,599.10^{-3}$	$3,998.10^{-4}$
Galat Percobaan	10	3.10^{-6}	3.10^{-7}

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

Tabel L.13.3 Uji BNT 5% pada variasi pH

pH	Rataan	6,0	5,5	5,0	4,0	4,5
		0,021	0,026	0,035	0,040	0,050
6,0	0,021	0	0,005*	0,014*	0,019*	0,029*
5,5	0,026		0	0,009*	0,014*	0,024*
5,0	0,035			0	0,005*	0,015*
4,0	0,040				0	0,010*
4,5	0,050					0

Keterangan: * berarti berbeda nyata karena lebih besar dari BNT pada $\alpha = 0,05$



Lampiran 14. Uji Statistik Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Selulase

Data aktivitas ekstrak kasar selulase dianalisa secara statistik dengan menggunakan metode Rancang Acak Lengkap (RAL) sebagai berikut:

Tabel L.14.1 Penentuan F_{hitung} pada variasi temperatur

Temperatur (°C)	Aktivitas Selulase (unit)			Total	Rataan aktivitas
	I	II	III		
40	0,026	0,027	0,026	0,079	$0,027 \pm 0,141 \cdot 10^{-2}$
45	0,037	0,034	0,037	0,108	$0,036 \pm 0$
50	0,050	0,048	0,050	0,148	$0,049 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
55	0,042	0,043	0,044	0,129	$0,043 \pm 0$
60	0,023	0,022	0,022	0,067	$0,022 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
				0,531	0,177

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

1. Menghitung faktor koreksi (FK)

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{0,282}{15} = 0,019$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK)

- a. Jk_{total} (JKT)

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

$$= (0,026^2 + \dots + 0,022^2) - 0,019 = 1,527 \cdot 10^{-3}$$

- b. $Jk_{perlakuan}$ (JKP)

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

$$= (0,079^2 + \dots + 0,067^2) - 0,019 = 1,515 \cdot 10^{-3}$$

c. Jkgalat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 1,527 \cdot 10^{-3} - 1,515 \cdot 10^{-3} = 1,2 \cdot 10^{-5}$$

3. Menghitung kuadrat tengah (KT)

$$a. \text{KTperlakuan} = \frac{JKP}{dbperlakuan} = \frac{1,515 \cdot 10^{-3}}{4} = 3,788 \cdot 10^{-4}$$

$$b. \text{KTgalatpercobaan} = \frac{JKG}{dbpercobaan} = \frac{1,2 \cdot 10^{-5}}{10} = 1,2 \cdot 10^{-6}$$

4. Menghitung nilai F

$$\text{Fhitung} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{3,788 \cdot 10^{-4}}{1,2 \cdot 10^{-6}} = 3,157 \cdot 10^2$$

5. Ftabel 5% = F(0.05; 4, 10) = 3,48

Karena Fhitung > Ftabel maka Ho ditolak, artinya variasi temperatur berpengaruh terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase. Untuk mengetahui variasi temperatur mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0.05$.

$$\begin{aligned} \text{BNT}_{5\%} &= t_{(\alpha/2; dB)} \times (2KTG/n)^{0.5} \\ &= t_{(0,025; 10)} \times (2 \times 1,2 \cdot 10^{-6} / 3)^{0.5} \\ &= 2,228 \times 8,944 \cdot 10^{-4} = 1,993 \cdot 10^{-3} \end{aligned}$$

Tabel L.14.2 Analisa ragam pengaruh temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase

Sumber Keragaman	dB	JK	KT
Perlakuan	4	$1,515 \cdot 10^{-3}$	$3,788 \cdot 10^{-4}$
Galat Percobaan	10	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$

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

Tabel L.14.3. Uji BNT 5% pada variasi temperatur

Temperatur	Rataan	60	40	45	55	50
		0,022	0,027	0,036	0,043	0,049
60	0,022	0	0,005*	0,014*	0,021*	0,027*
40	0,027		0	0,009*	0,016*	0,022*
45	0,036			0	0,007*	0,013*
55	0,043				0	0,006*
50	0,049					0

Keterangan: * berarti berbeda nyata karena lebih besar dari BNT pada $\alpha = 0,05$



Lampiran 15. Uji Statistik Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Selulase

Data aktivitas ekstrak kasar selulase dianalisa secara statistik dengan menggunakan metode Rancang Acak Lengkap (RAL) sebagai berikut:

Tabel L.15.1 Penentuan F_{hitung} pada variasi waktu inkubasi

Waktu (menit)	Aktivitas Selulase (unit)			Total	Rataan aktivitas
	I	II	III		
10	0,052	0,050	0,051	0,153	$0,051 \pm 0$
15	0,054	0,053	0,054	0,161	$0,054 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
20	0,056	0,057	0,056	0,169	$0,057 \pm 0,141 \cdot 10^{-2}$
25	0,053	0,053	0,054	0,160	$0,054 \pm 0,141 \cdot 10^{-2}$
30	0,051	0,051	0,050	0,152	$0,051 \pm 0,707 \cdot 10^{-3}$
				0,795	0,266

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

1. Menghitung faktor koreksi (FK)

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{0,632}{15} = 0,042$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK)

- a. Jktotal (JKT)

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - \text{FK} \\ &= (0,052^2 + \dots + 0,050^2) - 0,042 = 6,800 \cdot 10^{-5} \end{aligned}$$

- b. Jkperlakuan (JKP)

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - \text{FK} \\ &= (0,153^2 + \dots + 0,152^2) - 0,042 = 6,333 \cdot 10^{-5} \end{aligned}$$

c. Jkgalat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 6,800 \cdot 10^{-5} - 6,333 \cdot 10^{-5} = 4,7 \cdot 10^{-6}$$

3. Menghitung kuadrat tengah (KT)

$$a. \text{KTperlakuan} = \frac{JKP}{dbperlakuan} = \frac{6,33 \cdot 10^{-5}}{4} = 1,580 \cdot 10^{-5}$$

$$b. \text{KTgalatpercobaan} = \frac{JKG}{dbpercobaan} = \frac{4,7 \cdot 10^{-6}}{10} = 4,7 \cdot 10^{-7}$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{1,580 \cdot 10^{-5}}{4,7 \cdot 10^{-7}} = 3,362 \cdot 10^{-3}$$

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

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

$$\begin{aligned} BNT_{5\%} &= t_{(\alpha/2; dB)} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= t_{(0,025; 10)} \times (2 \times 4,7 \cdot 10^{-3} / 3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 5,597 \cdot 10^{-4} = 1,247 \cdot 10^{-3} \end{aligned}$$

Tabel L.15.2 Analisa ragam pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase

Sumber Keragaman	dB	JK	KT
Perlakuan	4	$6,333 \cdot 10^{-5}$	$1,580 \cdot 10^{-5}$
Galat Percobaan	10	$4,7 \cdot 10^{-6}$	$4,7 \cdot 10^{-7}$

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

Tabel L.15.3. Uji BNT 5% pada variasi waktu inkubasi

Waktu (menit)	Rataan	30	10	25	15	20
		0,051	0,051	0,054	0,054	0,057
30	0,051	0	0	0,003*	0,003*	0,006*
10	0,051		0	0,003*	0,003*	0,006*
25	0,054			0	0	0,003*
15	0,054				0	0,003*
20	0,057					0

Keterangan: * berarti berbeda nyata karena lebih besar dari BNT pada $\alpha = 0,05$

