

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM XILANASE DARI  
*Bacillus sp* MENGGUNAKAN INDUSER KLOBOT JAGUNG

SKRIPSI

oleh :

MARDIANA PRASETYANI PUTRI

0510923034



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2009

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM XILANASE DARI  
*Bacillus* sp MENGGUNAKAN INDUSER KLOBOT JAGUNG

SKRIPSI

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

oleh :  
**MARDIANA PRASetyani PUTRI**  
**0510923034**



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN  
ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2009

LEMBAR PENGESAHAN

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM XILANASE DARI  
*Bacillus* sp MENGGUNAKAN INDUSER KLOBOT JAGUNG

oleh:

MARDIANA PRASETYANI PUTRI  
0510923034

Setelah dipertahankan di depan Majelis Pengaji

pada tanggal .....

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains dalam bidang ilmu kimia

Pembimbing I

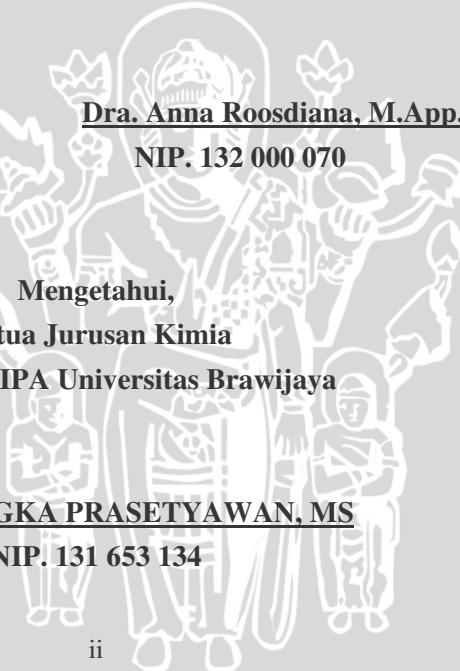
Drs. Sutrisno, M.Si

NIP. 131 879 407

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana, M.App, Sc

NIP. 132 000 070



DR. SASANGKA PRASETYAWAN, MS

NIP. 131 653 134

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Mardiana Prasetyani Putri  
NIM : 0510923034  
Jurusan : Kimia  
Penulis skripsi berjudul :

"ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM  
XILANASE DARI *Bacillus* sp MENGGUNAKAN INDUSER  
KLOBOT JAGUNG"

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 dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Agustus 2009

Yang menyatakan,

MARDIANA PRASETYANI PUTRI

0510923034

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM XILANASE DARI  
*Bacillus* sp MENGGUNAKAN INDUSER KLOBOT JAGUNG****ABSTRAK**

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase diisolasi dari *Bacillus* sp dengan menggunakan induser yaitu tepung klobot jagung. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi optimum aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase dari *Bacillus* sp dan menentukan parameter kinetika reaksi enzimatis. Ekstrak kasar xilanase diperoleh dengan cara menumbuhkan *Bacillus* sp dalam media cair selama 14 jam dan dilanjutkan dengan produksi enzim pada jam ke 24. Isolasi enzim dilakukan dengan sentrifugasi pada 3000 rpm, 4 °C selama 30 menit dan dilanjutkan uji aktivitas xilanase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas xilanase dipengaruhi oleh pH, temperatur, dan waktu inkubasi. Kondisi kerja optimum aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase terjadi pada pH 8, temperatur 60 °C, dan waktu inkubasi selama 50 menit dan dihasilkan aktivitas enzim 15,1462 U sedangkan parameter kinetik ekstrak kasar xilanase menunjukkan nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$ , 0,14 % (b/v) dan 24,10  $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{menit}$ .

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION XYLANASE  
ENZYME FROM *Bacillus* sp WITH THE USE INDUCER  
A CORN STOVER**

**ABSTRACT**

Xylanase is an extracellular enzyme that hydrolyze xylan become xylose and xylo-oligosacaride. Xylanase was isolated from *Bacillus* sp using the corn stover flour as inducer. The research was carried out to determine optimum condition of *Bacillus* sp crude xylanase activity and the kinetic parameter of enzymatic reaction. The crude xylanase was obtained by growing the *Bacillus* sp in liquid medium for 14 hours and followed by producing enzyme in 24 hours. Xylanase was isolated by centrifugation at 3000 rpm, 4 °C for 30 minutes prior to measurement of xylanase activity. The result showed that the xylanase activity was affected by pH, temperature, and incubation time. The optimum condition of crude xylanase was pH 8, temperature 60 °C, and the incubation time for 50 minutes yielding in 15,1462 U of xylanase activity, while kinetic parameters of xylanase crude had  $K_m$  and Vmax of 0.14 % (w/v) and 24.10  $\mu\text{mol/mL minute}$  respectively.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kehadirat Allah SWT, karena hanya dengan rahmatNya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **“Isolasi Dan Karakterisasi Enzim Xilanase Dari *Bacillus sp* Menggunakan Induser Klobot Jagung”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang.

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

1. Kedua orang tua dan keluarga besar penulis atas semua dukungan dan kasih sayang pada penulis selama masa studi penulis.
2. Drs. Sutrisno, M.Si, selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan, serta nasehat selama masa studi penulis.
3. Drs. Sutrisno, M.Si dan Dra. Anna Roosdiana,M.App,Sc selaku dosen pembimbing I dan II yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, dukungan, serta nasehat dalam penyelesaian tugas akhir.
4. Dosen penguji yang telah memberikan bimbingan, kritik, dan saran kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tugas akhir ini.
5. DR. Sasangka Prasetyawan., MS, selaku Ketua Jurusan Kimia, serta segenap staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia untuk semua perhatian yang telah diberikan kepada penulis.
6. Rekan – rekan kimia angkatan 2005 yang telah memberikan warna kehidupan yang mengesankan selama masa studi penulis
7. Rekan – rekan kerja di Laboratorium Biokimia atas semua bimbingan, dukungan, dan semangatnya.
8. Semua pihak yang telah membantu penyelesaian tugas akhir ini.

Tugas akhir ini tentunya masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi penyempurnaan tugas akhir ini. Akhirnya, penulis berharap agar tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, Agustus 2009

Penulis

# UNIVERSITAS BRAWIJAYA



vii

**DAFTAR ISI****Halaman**

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Xilan.....	4
2.2 Sumber Karbon.....	5
2.3 Sumber Nitrogen.....	6
2.4 <i>Bacillus sp.</i> .....	7
2.5 Enzim.....	7
2.5.1 Isolasi Enzim.....	9
2.5.2 Enzim Xilanase.....	11
2.6 Penentuan Kadar Gula Pereduksi Dengan Metode Nelson-Samogyi.....	12
2.7 Laju Reaksi Enzimatik.....	13
2.7.1 Persamaan Michaelis Menten.....	13
2.7.2 Persamaan Lineweaver -Burk.....	14
2.8 Hipotesis.....	15
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	16
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	16
3.2.1 Bahan Penelitian.....	16
3.2.2 Bahan Kimia.....	16

3.2.3 Alat Penelitian.....	16
3.3 Metode Penelitian.....	17
3.4 Tahapan Kerja.....	17
3.5 Prosedur Kerja.....	18
3.5.1 Pembuatan Tepung Klobot Jagung.....	18
3.5.2 Pembuatan Media.....	18
3.5.2.1 Media Padat.....	18
3.5.2.2 Media Cair.....	18
3.5.3 Penanam Biakan Murni <i>Bacillus sp</i> .....	19
3.5.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan.....	19
3.5.5 Produksi Enzim.....	19
3.5.6 Isolasi Enzim Xilanase.....	19
3.5.7 Pembuatan Kurva Baku Glukosa.....	20
3.5.8 Penentuan Kondisi Optimum.....	20
3.5.8.1 Penentuan pH Optimum.....	20
3.5.8.2 Penentuan Temperatur Optimum.....	21
3.5.8.3 Penentuan Waktu Inkubasi optimum.....	21
3.5.9 Pengukuran Aktivitas Enzim Xilanase.....	21
3.5.10 Penentuan $V_m$ dan $K_M$ .....	22
3.5.11 Analisis Data.....	22
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Isolasi Ekstrak kasar Enzim Xilanase dari <i>Bacillus sp</i> .....	23
4.2 Penentuan Kondisi Optimum.....	24
4.2.1 Penentuan pH Optimum.....	24
4.2.2 Penentuan Temperatur Optimum.....	27
4.2.3 Penentuan Waktu Inkubasi optimum.....	28
4.3 Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis.....	30
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran.....	33
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	34
<b>LAMPIRAN</b> .....	39

## DAFTAR GAMBAR

### Halaman

Gambar 2.1 Struktur bangun Xilan.....	4
Gambar 2.2 Sisi aktif enzim xilanase.....	12
Gambar 2.3 Grafik hubungan antara konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzimatik.....	14
Gambar 2.4 Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> (hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_o$ ).....	15
Gambar 4.1 Kurva Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase.....	24
Gambar 4.2 Mekanisme Reaksi Enzimatik Antara Enzim Xilanase dengan Substrat Xilan.....	26
Gambar 4.3 Kurva Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase.....	27
Gambar 4.4 Kurva Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase.....	29
Gambar 4.5 Kurva Hubungan Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase.....	30
Gambar 4.6 Kurva Hubungan $1/[S]$ terhadap $1/V$ .....	32
Gambar L.6 Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus sp.</i> .....	58
Gambar L.7 Spektrum Absorbsi.....	58
Gambar L.8 Kurva Standar Gula Pereduksi.....	60

**DAFTAR TABEL****Halaman**

Tabel 2.1 Komposisi Kimia Kulit Jagung.....	6
Tabel L.6 Data Absorbansi Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus sp</i> pada Berbagai Waktu.....	57
Tabel L.8 Data Absorbansi Kurva Standar Gula Pereduksi.....	59
Tabel L.9.1 Data Serapan Gula Pereduksi.....	60
Tabel L.9.2 Data Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase.....	60
Tabel L.10.1 Pengaruh pH terhadap Serapan Gula Pereduksi.....	61
Tabel L.10.2 Pengaruh Temperatur terhadap Serapan Gula Pereduksi.....	61
Tabel L.10.3 Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Serapan Gula Pereduksi.....	62
Tabel L.10.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat Xilan terhadap Serapan Gula Pereduksi.....	62
Tabel L.12.1 Perlakuan pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim .....	64
Tabel L.12.2 Perlakuan Temperatur terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim.....	65
Tabel L.12.3 Perlakuan Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim.....	65
Tabel L.12.4 Perlakuan Konsentrasi Substrat Xilan terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim.....	66
Tabel L.13.1 Penentuan $F_{hitung}$ Pada Variasi pH.....	66
Tabel L.13.2 Data Uji BNT 5% terhadap Pengaruh pH.....	69
Tabel L.13.3 Penentuan $F_{hitung}$ Pada Variasi Temperatur.....	69
Tabel L.13.4 Data Uji BNT 5% terhadap Pengaruh Temperatur.....	72
Tabel L.13.5 Penentuan $F_{hitung}$ Pada Variasi Waktu Inkubasi.....	72
Tabel L.13.6 Data Uji BNT 5% terhadap Pengaruh Waktu Inkubasi.....	75

**DAFTAR LAMPIRAN****Halaman**

Lampiran 1. Komposisi Media Pertumbuhan.....	39
1.1 Media Padat.....	39
1.2 Media Cair.....	39
Lampiran 2. Preparasi Larutan.....	39
2.1 Pembuatan Reagen.....	39
2.1.1 Pembuatan Reagen Nelson.....	39
2.1.2 Pembuatan Reagen Samogyi.....	39
2.2 Pembuatan Air Bebas Reduktor.....	40
2.3 Pembuatan Larutan Stok Glukosa 1000 ppm.....	40
2.4 Pembuatan Larutan Baku Gula Pereduksi.....	40
2.5 Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,2 M.....	40
2.6 Pembuatan Larutan Na-Asetat 0,2 M.....	41
2.7 Pembuatan Buffer tris-HCl.....	41
2.8 Pembuatan Buffer Fosfat.....	41
2.9 Pembuatan substrat xilan 1% (b/v).....	42
Lampiran 3. Perhitungan Harga pH Buffer Asetat 0,2 M.....	43
Lampiran 4. Tahapan Kerja.....	44
Lampiran 5. Skema Kerja.....	45
1 Pembuatan Substrat Klobot Jagung.....	45
2 Pembuatan Media.....	45
2.1 Media Padat.....	45
2.2 Media Cair.....	46
3 Penanambian Murni <i>Bacillus sp.</i> .....	46
4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan.....	47
5 Pembuatan Inokulum.....	47
6 Produksi Enzim.....	48
7 Isolasi Enzim.....	48
8 Tahap Analisis Gula Pereduksi.....	49
8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Nelson-Samogyi.....	49
8.2 Pembuatan Kurva Baku Larutan Gula Pereduksi.....	50
9 Penentuan Kondisi Optimum Ekstrak Kasar Enzim Xilanase.....	51
9.1 Penentuan pH Optimum.....	51
9.2 Penentuan Temperatur Optimum.....	52

9.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum.....	53
10 Penentuan Nilai $V_{maks}$ dan $K_M$ .....	54
11 Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase.....	55
12 Analisis Kadar Gula Pereduksi dengan Metode Nelson-Samogyi.....	57
Lampiran 6. Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus sp</i> .....	56
Lampiran 7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Gula Pereduksi.....	58
Lampiran 8. Pembuatan Kurva Standar Gula Pereduksi.....	59
Lampiran 9.....	60
Lampiran 10.....	61
Lampiran 11. Pengukuran Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase.....	63
Lampiran 12. Data Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase.....	64
Lampiran 13. Analisis Statistika.....	66
Lampiran 14. Penentuan Nilai $V_{maks}$ dan $K_M$ .....	75



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu  $\beta$ -xilosidase, eksilanase, dan endoxilanase.  $\beta$ -xilosidase, yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Eksilanase mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Endoxilanase mampu memutus ikatan  $\beta$  1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur (Reilly, 1991; Dekker, 1983).

Xilanase dapat dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme seperti: *Trichoderma viride*, *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureo-basidium*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Humicola* (Haltrich, *et al.*, 1996). *Bacillus* sp penghasil xilanase yang bersifat alkalofilik yang telah diteliti adalah *Bacillus* sp. YC 335 (Park *et al.*, 1992), *Bacillus* sp. 41M-1 (Nakamura *et al.*, 1993), dan *Bacillus* sp. TAR-1 yang juga bersifat termofilik (Nakamura *et al.*, 1994). Richana *et al.* (2000) telah melakukan isolasi bakteri penghasil xilanase alkalofilik yang berasal dari tanah berkapur pH 7,9. *Bacillus* sp dapat tumbuh pada media yang mengandung nutrien polisakarida yang berfungsi sebagai sumber karbon. Sumber karbon yang dapat digunakan sebagai media pertumbuhan *Bacillus* sp antara lain klobot jagung, kulit kedelai, kulit pisang, kulit melon, dan kulit apel.

Klobot jagung merupakan limbah pertanian yang sangat melimpah, sehingga perlu mendapat perhatian agar lebih bermanfaat. Komposisi klobot jagung sebagian besar merupakan polisakarida, sehingga dapat digunakan sebagai sumber karbon dan induser pada media pertumbuhan bakteri. Menurut penelitian Mayasari (2008), xilanase dengan induser klobot jagung mempunyai aktivitas spesifik xilanase rata-rata tertinggi ( $140,1948 \pm 7,8759$ ) U/mg protein bila dibandingkan dengan kulit buah yang lain. Komposisi kimia klobot jagung terdiri dari serat kasar 38%, protein kasar 6,41%, hemiselulosa 32%, lignin 6,3%, selulosa 12,82%, dan abu 4,47% (Chuzaemi *et al.*, 1983).

Pemanfaatan xilanase dalam dunia industri memiliki peranan yang sangat penting, misalnya untuk proses pemutih kertas, campuran pakan ternak, penjernihan sirup, pembuatan gula xilosa, produksi makanan dan minuman, peningkatan kualitas roti, penyerap air dan produksi biofuel (Dashek, 1997). Untuk proses pemutih kertas dipilih xilanase yang bersifat termostabil dan tahan pada pH alkali (Beg et al., 2001).

Menurut Trismilah, Deden dan Sumaryanto (2006), proses produksi enzim menggunakan mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, sehingga untuk memproduksi enzim yang maksimum maka faktor – faktor lingkungan yang berperan harus dioptimalkan diantaranya pH, temperatur dan waktu inkubasi. Menurut penelitian Narayan dan Salah Uddin (2004), enzim xilanase yang dihasilkan oleh bakteri *Paenibacillus* sp, mampu menghidrolisis substrat xilan menjadi gula pereduksi pada kondisi optimum pH 7,0, temperatur 55 °C dan waktu inkubasi selama 50 menit. Sedangkan menurut penelitian Thomas (1996) menunjukkan bahwa enzim xilanase yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus* sp. Strain 41M-1 mampu menghidrolisis substrat xilan menjadi gula pereduksi pada kondisi pH optimum 9. Penelitian Nakamura, et al., (1993) menyebutkan bahwa pH optimum enzim xilanase berkisar antara pH 7-10. Dengan demikian, enzim xilanase yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus* sp dengan induser klobot jagung perlu dikarakterisasi menggunakan substrat xilan agar diketahui aktivitas maksimumnya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana kondisi optimum aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase hasil isolasi dari *Bacillus* sp dalam menghidrolisis substrat xilan menjadi gula pereduksi ?
2. Berapa nilai parameter kinetika reaksi enzymatis ekstrak kasar enzim xilanase hasil isolasi dari *Bacillus* sp ?

### 1.3 Batasan Masalah

Kondisi optimum aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase yang dipelajari meliputi pH, temperatur dan waktu inkubasi. *Bacillus* sp yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil isolasi dari tanaman Mangrove yaitu bagian akar, ranting, daun, dan buah. Tepung klobot jagung yang digunakan berukuran 150 mesh.

### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini, yaitu :

1. Mengetahui kondisi optimum aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase hasil isolasi dari *Bacillus* sp dalam menghidrolisis substrat xilan menjadi gula pereduksi.
2. Menentukan nilai parameter kinetika reaksi enzimatis ekstrak kasar enzim xilanase hasil isolasi dari *Bacillus* sp.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kondisi optimum aktivitas dan parameter kinetika reaksi enzimatis ekstrak kasar enzim xilanase hasil isolasi dari *Bacillus* sp.

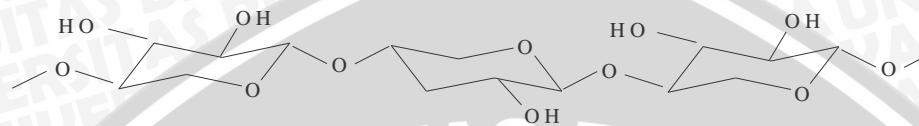


## BAB II

# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Xilan

Xilan tergolong karbohidrat disebut juga sebagai hemiselulosa. Rantai xilan terdiri dari  $\beta$ -D-xilosa yang bersambungan secara 1,4-glikosidik. Rantai xilan bercabang, tetapi karena derajat polimerisasinya rendah (30-100), maka strukturnya tidak terbentuk kristal, sehingga xilan larut dalam pelarut polar. Xilan cukup stabil hingga temperatur 180 °C (Schlegel dan Schmidt, 1984).



Gambar 2.1 Gambar struktur bangun xilan

Hemiselulosa adalah heteropolimer dengan berbagai monomer gula, dan rantai molekul yang lebih pendek dari selulosa. Hemiselulosa merupakan senyawa amorf, karena banyak percabangan rantai molekulnya (Sanjaya, 2000).

Pada tahun 1986, pertama kali muncul laporan bahwa enzim endoxylanase mampu mengurangi bahan-bahan kimia yang diperlukan pada proses *bleaching* pulp kraft. Banyak peneliti telah merekomendasikan penelitian dan pengembangan teknologi ini ke arah komersialisasi. Sedikitnya ada dua penjelasan mengenai peran xylanase dalam meningkatkan proses bleaching pulp. Model pertama yang diajukan adalah bahwa xilanase meningkatkan akses dari bahan kimia bleaching ke serat-serat pulp dengan menghilangkan xylan yang terendapkan. Serat yang terbuka (uncoated fibers) ternyata lebih rentan terhadap bahan kimia bleaching dan ekstraksi lignin. Secara esensial, model ini mengusulkan bahwa xylan secara fisik menjebak lignin dan kromofor dalam matriks pulp. Model kedua yang diajukan adalah bahwa hemiselulase membebaskan kromofor dan lignin dari matriks pulp selulosik melalui pemecahan ikatan kovalen antara hemiselulosa dan lignin. Berdasarkan usulan penjebakan fisik, diketahui bahwa lignin dan kromofor yang tersisa terikat secara kimiawi di dalam pulp. Bukti terakhir mendukung peran xylanase dalam pemecahan ikatan lignin-karbohidrat. Pada

perombakan hemiselulosa, terjadi peningkatan kromofor yang cukup tinggi. Selama proses pulping kraft, asam metilglukuronat dan komponen hemiselulosa lainnya terpecah menjadi satuan-satuan asam kromofor yang tetap terikat pada rantai utama xylan, tetapi beberapa jenis hasil perombakan dan kondensasi belum teridentifikasi dengan baik. Produk hasil perombakan lignin dan hemiselulosa dapat bereaksi silang (cross-react) dengan xylan dan terikat ke dalam matriks hemiselulosa (Wahyudi, 2005).

Hidrolisis hemiselulosa dapat melepaskan ikatan antara kromofor dan lignin, namun penghilangan xylan tidak disarankan, karena akan mengurangi hasil pulp, dan jika dilakukan secara ekstrim, maka penghilangan xylan akan mengurangi kekuatan pulp (pulp strength). Tujuan utama penggunaan enzim dalam proses bleaching adalah tidak menghilangkan xylan secara keseluruhan, hanya melepaskan kromofor dan lignin (Wahyudi, 2005).

Xilan tersebar paling luas di alam. Pada merang dan kulit pohon mengandung xilan sampai 30 %, ampas tebu sampai 30 %, kayu konifera sampai 7-12 % dan kayu pohon berdaunan sampai 20-25 % (Schlegel dan Schmidt, 1984).

## 2.2 Sumber Karbon

Karbon merupakan elemen yang paling besar di dalam sel mikroba dan hampir mendekati 50% dari total berat sel sehingga sumber karbon (yang secara umum juga merupakan sumber energi) merupakan faktor yang sangat prinsip di dalam penentuan media (Priest, 1984).

Sumber karbon yang harganya murah berlimpah diantaranya adalah klobot jagung. Tanaman jagung merupakan salah satu jenis tanaman pangan biji-bijian dari keluarga rumput-rumputan. Tanaman berasal dari Amerika yang tersebar ke Asia dan Afrika (Tjitrosoepomo, 1994).

Sistematis tanaman jagung sebagai berikut (Tjitrosoepomo, 1994):

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Sub Divisio	: Angiospermae
Classis	: Monocotyledone
Ordo	: Graminae

Familia : Graminaceae  
Genus : Zea  
Species : *Zea mays L*

Klobot jagung adalah hasil samping yang diperoleh dari pengelupasan buah jagung. Data sekunder menunjukkan bahwa produksi hijauan segar kulit jagung diperkirakan berkisar antara 394,11 ton/th-412,05 ton/th, sehingga didapatkan dalam 1 kg jagung terdapat 450 gram klobot jagung atau 45 % klobot jagung.

Menurut Chuzaemi *et al* (1983), Tjitrosoepomo (1994) dan Hettenhaus (2002), komposisi kimiawi yang terkandung dalam klobot jagung antara lain :

Tabel 2.1 komposisi kulit jagung

Komponen	Kandungan (%)
Serat kasar	38
Selulosa	6,41
Hemiselulosa	32
Abu	4,47
Protein kasar	6,41
Lignin	6,3

Besarnya kandungan hemiselulosa pada klobot jagung berpotensi sebagai sumber xilan dalam produksi xilanase. Selain sebagai sumber karbon, klobot jagung juga berperan sebagai induser di dalam media pertumbuhan mikroorganisme. Induser merupakan suatu bahan yang mempunyai struktur mirip dengan substrat. Penambahan induser dalam media pertumbuhan bertujuan untuk menginduksi enzim dari mikroorganisme supaya mikroorganisme tersebut dapat mengeluarkan enzim yang diinginkan. Dalam skala produksi yang lebih besar biasanya digunakan xilan murni pada media pertumbuhannya. Namun, karena harga xilan murni yang cukup mahal sehingga perlu dicari bahan baku yang mempunyai struktur mirip dengan xilan dan salah satu bahan yang mengandung xilan yaitu klobot jagung (Mayasari, 2008).

### 2.3 Sumber Nitrogen

Sumber nitrogen digunakan sebagai nutrisi cadangan apabila karbon dalam media mulai menipis. Pada umumnya sebagai sumber

nitrogen digunakan garam ammonium, urea, ekstrak khamir, dan pepton (Richana, 2002).

Sumber nitrogen organik utama yang digunakan dalam produksi xilanase dari *T. harzianum* 1073 D3 adalah pepton yang merupakan satu unsur dasar di media produksi (Bakir, *et al.*, 2001).

#### 2.4 *Bacillus* sp

*Bacillus* sp tumbuh di medium berisi xylan sebagai sumber karbon. *Bacillus* sp memproduksi enzim ekstraseluler cellulolitik dan enzim xilanolitik seperti *CMCase*, *avicelase*, *cellobiohydrolase*,  $\beta$ -*glucosidase*, *xylanases*, dan  $\beta$ -*glucosidase*. Dari hal tersebut ditemukan bahwa salah satu sub-unit *xylanosome* dengan bobot molekular yang tinggi, mempunyai ikatan glikoprotein yang bisa mengikat xilan yang tidak dapat larut (Pason *et al.*, 2002).

Klasifikasi dari *Bacillus* sp, yaitu (Alexopoulos dan Mins, 1979):

Kerajaan :	<u>Bakteria</u>
Filum :	<u>Firmicutes</u>
Kelas :	<u>Bacilli</u>
Ordo :	<u>Bacillales</u>
Famili :	<u>Bacillaceae</u>
Genus :	<u><i>Bacillus</i></u>
Spesies :	<u><i>Bacillus</i> sp</u>

#### 2.5 Enzim

Enzim adalah molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim memegang peranan penting dalam berbagai reaksi di dalam sel. Sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi antara lain konversi energi dan metabolisme pertahanan sel (Richana, 2002).

Enzim mempercepat reaksi dengan menurunkan energi aktivasi suatu reaksi, yaitu jumlah energi (kalori) yang dibutuhkan oleh satu mol senyawa pada temperatur tertentu menuju keadaan aktifnya

(Straiyer, 1984). Menurunnya energi aktivasi ini menyebabkan reaksi menuju tahap transisi dengan kebutuhan energi yang relatif rendah dan melewati tahap transisi untuk menghasilkan produk reaksi.

Enzim bekerja secara khas terhadap substrat tertentu. Enzim dapat bekerja pada suatu substrat, bila ada hubungan antara enzim dengan substrat, yang hanya terjadi pada bagian atau tempat tertentu saja (sisi aktif). Hubungan antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim-substrat. Kompleks ini merupakan kompleks yang bersifat sementara dan akan terurai lagi, apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi. Persamaan reaksi enzim-substrat ditunjukkan seperti pada persamaan berikut (Poedjiadi, 1994) :



Pembentukan senyawa kompleks ES dari E dan S berlangsung dengan konstanta kecepatan  $k_1$ . Kompleks ES mengalami dua kemungkinan penguraian, yaitu kembali terurai menjadi E dan S dengan konstanta kecepatan  $k_2$  atau melanjutkan reaksi kembali dengan menghasilkan produk P dan E dengan konstanta kecepatan  $k_3$ , dengan asumsi tidak ada P yang dapat diubah lagi menjadi S.

Dalam melakukan aktivitasnya untuk mengatalisis suatu reaksi, kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu:

#### 1. Pengaruh pH

pH sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim, karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Hal ini menyebabkan konformasi dan fungsi katalitik enzim menjadi berubah (Martin dkk, 1983). Enzim memiliki pH optimum yang khas yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimal (Voet dan Voet, 1990).

Keasaman sel normal dan lingkungan sel sekelilingnya, harus tetap, sebab adanya perubahan menyebabkan pergeseran aktivitas enzim. Hal ini akan mempengaruhi dan mengacaukan sistem katabolitik dan anabolitik dalam sel dan jaringan (Girinda, 1993).

#### 2. Pengaruh Temperatur

Reaksi kimia sangat dipengaruhi oleh temperatur, maka reaksi yang dikatalis oleh enzim juga peka terhadap temperatur Pada

kisaran temperatur tertentu sesuai jenis enzim, maka kecepatan reaksi akan meningkat jika temperatur dinaikkan. Sebagian besar enzim  $\beta$ -xilosidase yang berhasil dimurnikan masih menunjukkan adanya aktivitas transferase yang menyebabkan enzim ini kurang dapat digunakan industri penghasil xilosa. Eksoxilanase mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Enzim ini dapat mengandung sedikit aktivitas transferase sehingga potensial dalam industri penghasil xilosa. Endoxilanase mampu memutus ikatan  $\beta$  1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi, dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut (Martin dkk, 1983).

### 3. Pengaruh Waktu Inkubasi Enzimatis

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Waktu yang diperlukan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat hingga menghasilkan produk disebut waktu inkubasi enzimatis. Waktu inkubasi enzimatis sebanding dengan produk yang dihasilkan. Waktu inkubasi yang lama menyebabkan semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat sehingga semakin banyak produk yang terbentuk. Bila enzim sudah jenuh dengan substrat maka lamanya waktu inkubasi sudah tidak mempengaruhi lagi (Martin dkk, 1983).

### 4. Pengaruh Konsentrasi Enzim

Kecepatan reaksi bergantung pada konsentrasi enzim yang berperan sebagai pengaktif dalam reaksi. Pada reaksi enzimatis, kecepatan reaksi berbanding lurus dengan konsentrasi enzim. Makin tinggi konsentrasi enzim, maka makin cepat reaksi berlangsung (Martin dkk, 1983).

### 5. Pengaruh Konsentrasi Substrat

Peningkatan konsentrasi substrat menyebabkan kecepatan reaksi meningkat, tetapi pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan meningkatkan kecepatan reaksi sedemikian kecil. Batas ini disebut kecepatan reaksi maksimum ( $V_m$ ), karena enzim menjadi jenuh oleh substrat (Lehninger, 1997).

#### 2.5.1 Isolasi Enzim

Enzim dapat diisolasi dari hewan, tanaman maupun mikroorganisme dengan menggunakan beberapa metode antara lain:

metode ekstraksi, presipitasi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi dan kromatografi (Rahman, 1989). Proses isolasi enzim mengandung pengertian pelepasan enzim dari sel yang dapat dilakukan secara mekanik, fisis, kimiawi dan enzimatis melalui penghancuran membran atau dinding sel. Setelah penghancuran sel, untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim, dilakukan sentrifugasi guna memisahkan enzim dari senyawa-senyawa yang tidak larut, juga untuk menghilangkan sisa sel (*debris cell*) yang telah hancur (Cooper, 1977). Pemisahan partikel dari larutan pada metode sentrifugasi merupakan operasi utama dalam isolasi enzim. Ini termasuk pemisahan sel-sel dari medium biakan, pemisahan atau penghancuran sel dan pengumpulan presipitat (Judoamidjojo dkk, 1992). Isolasi enzim dilakukan pada temperatur rendah dan campuran ditambah larutan penyanga (buffer) untuk mempertahankan kestabilan enzim. Enzim akan berada pada lapisan air (supernatan) (Cooper, 1977).

Menurut Rahayu (1983), keberhasilan isolasi dan pengujian aktivitas enzim sangat bergantung pada macam serta kondisi sumber enzim, letak bahan, dan cara ekstraksi yang digunakan, serta pengertian pelaksanaan tentang dasar dan sifat-sifat enzim. Pengendapan dengan penambahan garam-garam netral ke dalam larutan enzim akan memberikan pengaruh terhadap kelarutan enzim. Kemampuan garam-garam netral mempengaruhi larutan enzim merupakan fungsi dari kekuatan ion, yaitu bilangan yang mencerminkan konsentrasi dan jumlah muatan listrik kation dan anion penyusun garam. Bila kekuatan ion semakin tinggi maka kelarutan protein semakin turun. Pada kekuatan ion yang cukup tinggi terjadi pengendapan protein dari larutan, gejala ini dinamakan salting out. Untuk memisahkan cairan dari endapan protein dapat dilakukan dengan cara sentrifugasi atau penyaringan. Penyaringan merupakan cara yang umum digunakan untuk berbagai skala, tetapi kekurangannya dibanding dengan sentrifugasi adalah waktunya yang diperlukan lebih lama. Sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dengan temperatur 40 C selama 15 menit cukup memadai untuk memisahkan endapan dari cairan. Isolasi yang kemungkinan masih bercampur dengan senyawa lain bisa disebut crude enzyme (Winarno, 1980).

Berdasarkan lokasi enzim di dalam sel, maka dikenal istilah enzim ekstraselular (di luar sel) dan enzim intraselular (di dalam sel).

Isolasi enzim ekstraselular lebih mudah dibanding enzim intraselular, karena tanpa pemecahan sel (Muhtadi dkk, 1992).

### 2.5.2 Enzim Xilanase

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi gula pereduksi.

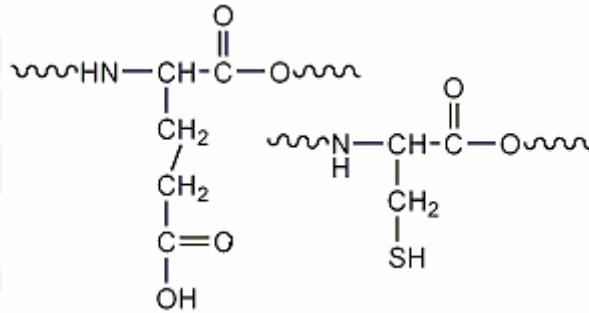


Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu  $\beta$ -xilosidase, eksoxilanase dan endoxilanase (Richana, 2002).

$\beta$ -xilosidase, yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilo oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim akan menurun dengan meningkatnya rantai xilooligosakarida (Reilly, 1991; Dekker, 1983). Xilosa selain merupakan hasil hidrolisis juga merupakan inhibitor bagi enzim  $\beta$ -xilosidase. Sebagian besar enzim  $\beta$ -xilosidase yang berhasil dimurnikan masih menunjukkan adanya aktivitas transferase yang menyebabkan enzim ini kurang dapat digunakan industri penghasil xilosa. Eksoxilanase mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Enzim ini dapat mengandung sedikit aktivitas transferase sehingga potensial dalam industri penghasil xilosa. Endoxilanase mampu memutus ikatan  $\beta$  1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajad percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi, dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut (Richana, 2002).

Xilanase umumnya merupakan protein kecil dengan berat molekul antara 15.000-30.000 Dalton, aktif pada suhu 55°C dengan pH 9 (Yang *et al.*, 1988; Yu *et al.*, 1991). Pada suhu 60°C dan pH normal, xilanase lebih stabil (Tsujibo *et al.*, 1992; Cho-Goo *et al.*, 1996).

Xilanase mempunyai gugus aktif yang dapat menghidrolisis xilan, yaitu gugus karboksil yang merupakan gugus aktif dari asam amino jenis asam glutamat serta gugus sulhidril dari sistein. Struktur dan sisi aktif enzim xilanase yaitu (Lee, *et al.*, 1993) :



Gambar 2.2 Sisi aktif enzim xilanase

## 2.6 Penentuan Kadar Gula Pereduksi dengan Metode Nelson – Somogyi

Gula pereduksi adalah gula yang mampu mereduksi senyawa pengoksidasi. Contoh dari gula pereduksi yaitu xilosa, xiloooligosakarida. Konsentrasi gula dapat ditentukan dengan cara mengukur jumlah senyawa pengoksidasi yang tereduksi oleh suatu larutan gula tertentu (Lehniger, 1997).

Penentuan kadar gula pereduksi dengan metode Nelson Somogyi melibatkan dua tahap reaksi, yaitu reaksi gula pereduksi dengan reagen Nelson menghasilkan produk  $\text{Cu}_2\text{O}$  berupa endapan merah bata, kemudian, reaksi kedua adalah antara  $\text{Cu}_2\text{O}$  dengan reagen arsen molibdat (Vogel, 1994).

Tahap 1:



Tahap 2:



Kadar gula pereduksi ditentukan dengan menggunakan persamaan Lambert-Beer  $A = \epsilon \cdot b \cdot c$  (mol/L), di mana A adalah

absorbansi,  $\epsilon$  adalah absorptivitas molar ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ),  $b$  adalah ketebalan larutan sampel (cm),  $c$  adalah konsentrasi (g/L) (Underwood, 1998).

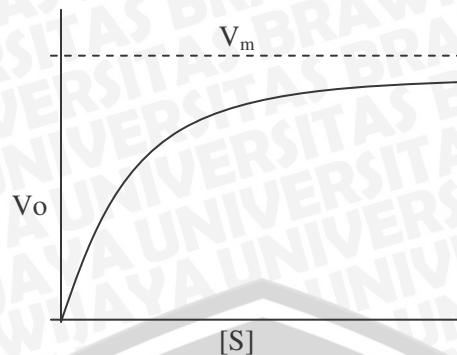
## 2.7 Laju Reaksi Enzimatik

Analisis kinetika reaksi enzimatis meliputi dua parameter, yaitu kecepatan maksimum ( $V_m$ ) dan tetapan Michaelis-Menten ( $K_M$ ).  $V_m$  adalah batas teoritis dari laju reaksi yang akan tercapai bila kadar substrat demikian tinggi, sehingga tempat aktif selalu ditempati oleh substrat. Jadi,  $V_m$  merupakan kecepatan reaksi pada saat enzim jenuh dengan substrat.  $K_M$  dapat didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah  $V_m$  (Lehninger, 1997).

### 2.7.1 Persamaan Michaelis-Menten

Persamaan Michaelis-Menten (a), merupakan suatu pernyataan mengenai hubungan kuantitatif di antara kecepatan reaksi awal ( $V_0$ ), kecepatan maksimum ( $V_m$ ) dan konsentrasi substrat awal ( $S$ ).  $K_M$  bersifat khas bagi enzim tertentu, dengan substrat spesifik pada kondisi pH dan temperatur tertentu. Nilai dugaan  $K_M$  dapat diperoleh dengan menggunakan prosedur grafik sederhana, seperti diperlihatkan Gambar 2.3. Akan tetapi, sulit untuk menentukan  $V_m$  dengan tepat dari jenis grafik tersebut, karena  $V_m$  hanya diduga dan tidak pernah dapat diketahui nilai sebenarnya. Nilai  $K_M$  yang lebih tepat dapat diperoleh dengan memetakan data yang sama dengan cara yang berbeda. Cara ini disebut pemetaan kebalikan-ganda atau persamaan *Lineweaver-Burk* dengan menggunakan transformasi aljabar dari persamaan Michaelis-Menten (Lehninger, 1997).

$$V_0 = \frac{V_m \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (a)$$



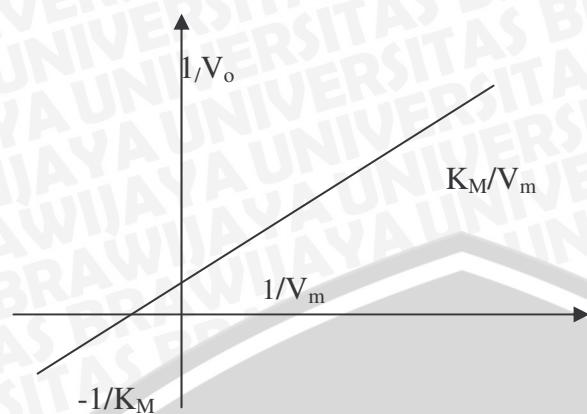
Gambar 2.3 Grafik hubungan antara konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzimatik

### 2.7.2 Persamaan *Lineweaver-Burk*

Persamaan Michaelis-Menten (a), dapat ditransformasi secara aljabar menjadi bentuk lain yang lebih bermanfaat di dalam pemetaan data percobaan. Suatu transformasi yang umum dilakukan diturunkan secara sederhana dengan membuat kebalikan dari kedua sisi persamaan Michaelis-Menten, sehingga memberikan persamaan berikut (Lehniger, 1997):

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M + [S]}{V_m \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (b)$$

Persamaan (b) adalah transformasi persamaan Michaelis-Menten yang disebut pemetaan kebalikan-ganda atau persamaan *Lineweaver-Burk*. Pemetaan  $1/V_o$  terhadap  $1/[S]$  menghasilkan garis lurus (Gambar 2.4). Garis ini akan memiliki sudut  $K_M/V_m$ , perpotongan garis terhadap sumbu y sebesar  $1/V_m$  (pada sumbu  $1/V_o$ ) dan perpotongan  $-1/K_M$  pada sumbu  $1/[S]$ . Pemetaan kebalikan-ganda atau *Lineweaver-Burk* memiliki banyak manfaat, karena menghasilkan penentuan  $V_m$  secara lebih tepat, yang hanya dapat diduga pada pemetaan  $V_o$  terhadap  $[S]$ , seperti diperlihatkan pada Gambar 2.4 (Lehniger, 1997).



Gambar 2.4 Grafik Lineweaver-Burk (hubungan antara  $1/[S]$  dengan  $1/V_o$ )

## 2.8 Hipotesis

Aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase hasil isolasi dari *Bacillus* sp dalam menghidrolisis substrat xilan menjadi gula pereduksi dipengaruhi oleh kondisi pH, temperatur, dan waktu inkubasi.



## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Waktu penelitian dari bulan November 2008 – Februari 2009.

#### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

##### 3.2.1 Bahan Penelitian

Kultur murni *Bacillus sp* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Negeri Malang. *Bacillus sp* yang digunakan diisolasi dari tanaman Mangrove, digunakan juga klobot jagung dari pasar Dinoyo.

##### 3.2.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan memiliki derajat kemurnian pro analisa (pa), teknis dan *for microbiology*. Bahan-bahan pa antara lain: NaOH, NaCl, glukosa, KNa–tartrat, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, KMnO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, CH<sub>3</sub>COONa, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HasO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Bahan-bahan *for microbiology* antara lain: pepton, tepung agar, ekstrak daging, sedangkan bahan lainnya adalah akuades.

##### 3.2.3 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan antara lain: seperangkat alat gelas, mortar, jarum ose, pengaduk magnet, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), neraca analitik (Bosch PE 620), inkubator (Heraeus Type B 5042), pH meter (Inolab WTW), penangas air (Memmert W 200), autoklaf, shaker (Edmund Buhler SM 25 24B), sentrifuse dingin (Juan MR 1889), pemanas listrik (Janke-Kunkel) dan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu Model 160A double beam).

### 3.3 Metode Penelitian

Ekstrak kasar enzim xilanase yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus* sp ditentukan kondisi optimum aktivitasnya dengan menggunakan substrat xilan. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) klasifikasi satu arah dengan tiga variabel: pH, temperatur dan waktu inkubasi yang masing-masing lima perlakuan dan tiga kali pengulangan.

### 3.4 Tahapan Kerja

1. Pembuatan Reagensia ( lampiran )
2. Penyiapan substrat (lampiran )
3. Pembuatan tepung klobot jagung
4. Pembuatan media padat
5. Pembuatan media cair
6. Penanambiaikan murni *Bacillus* sp
7. Pembuatan kurva pertumbuhan *Bacillus* sp
8. Pembuatan inokulum
9. Produksi enzim
10. Isolasi ekstrak kasar enzim xilanase dari biakan *Bacillus* sp
11. Tahapan analisa kadar gula pereduksi :
  - Penentuan panjang gelombang maksimum
  - Pembuatan kurva baku larutan gula pereduksi
  - Uji kadar gula pereduksi dengan metode Nelson-Samogyi
12. Penentuan kondisi optimum enzim xilanase :
  - pH optimum
  - Temperatur optimum
  - Waktu inkubasi optimum
13. Pengukuran aktivitas enzim xilanase
14. Penentuan  $V_m$  dan  $K_M$
15. Analisis data

### 3.5 Prosedur Kerja

#### 3.5.1 Pembuatan Tepung Klobot Jagung

Klobot jagung disortasi kemudian dicuci, selanjutnya dipotong-potong kurang lebih 0,5 cm kemudian dikeringkan di dalam oven pada temperatur 100 °C. Selanjutnya kulit jagung dihaluskan, kemudian diayak dengan ukuran ayakan 120 mesh kemudian 150 mesh. Kulit jagung yang lolos akan digunakan sebagai induser dan sumber karbon.

#### 3.5.2 Pembuatan Media

##### 3.5.2.1 Media Padat

Media padat yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (*NA*) Adapun pembuatan Nutrient Agar adalah sebagai berikut: ditimbang tepung agar sebanyak 4 gram kemudian ditambahkan 1 gram pepton dan 0,6 gram ekstract daging. Selanjutnya ditambahkan 200 mL akuades lalu diaduk sampai larut. Setelah itu, larutan agar tersebut dipipet sebanyak 4 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas. Kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada temperatur 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. *NA* yang telah steril dikeluarkan dari autoklaf dan diletakkan dalam posisi miring di atas meja, bila agar sudah memadat maka disimpan di dalam kulkas.

##### 3.5.2.2 Media Cair

Ditimbang 6 gram NaCl, 6 gram glukosa, 6 gram pepton, 6 gram yeast extract, dan 1 gram tepung klobot jagung, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker, larutan dibuat sebanyak 1000 ml. Setelah itu larutan diatur pada pH 7. Campuran ini diaduk dan dipanaskan sampai mendidih. Kemudian larutan campuran dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, lalu mulut erlenmeyer ditutup dengan kapas dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121 °C dan tekanan 15 psi.

### 3.5.3 Penanaman biakan Murni *Bacillus* sp

Disiapkan jarum ose, kemudian dilakukan pemindahan secara aseptis bakteri *Bacillus* sp ke dalam media padat yang sudah dibuat, kemudian diinkubasi selama 7 sampai 14 hari pada temperatur 34°C.

### 3.5.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Diambil spora biakan murni *Bacillus* sp yang telah berumur 3 hari dari 1 agar miring. Kemudian disuspensi dalam 10 mL akuades steril dan suspensi ini dicampurkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 250 mL media cair yang telah steril. Biakan ini lalu diinkubasi dalam shaker pada temperatur kamar. Pengamatan dilakukan selama 0-40 jam dengan interval pengamatan selama 4 jam sekali. Masing-masing interval diamati pertumbuhannya dengan cara mengukur serapannya dan selanjutnya dibuat kurva pertumbuhan yang menyatakan hubungan antara waktu inkubasi (sumbu x) terhadap Absorbansi (sumbu y).

### 3.5.5 Produksi Enzim

Untuk memproduksi enzim disediakan 500 ml media cair steril, kemudian dimasukkan ke dalam 2 buah erlenmeyer 500 mL. Kemudian ditambahkan secara aseptis 110 mL inokulum. Selanjutnya media tersebut diinkubasi dalam shaker pada kecepatan 150 rpm pada temperatur kamar sampai mencapai fase logaritma. Produksi enzim dilakukan selama 24 jam sesuai dengan kurva pertumbuhan yang sudah terbentuk.

### 3.5.6 Isolasi Enzim Xilanase

Pada akhir masa inkubasi dari percobaan (3.5.5) enzim xilanase di isolasi dengan metode ekstraksi. Untuk ekstraksi dilakukan penambahan 15 mL buffer fosfat pH 7, lalu disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4°C. supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim xilanase.

### 3.5.7 Pembuatan Kurva Baku Glukosa

Disiapkan tabung reaksi, masing-masing diisi dengan larutan baku glukosa 1 mL untuk konsentrasi 0,20,30,40,50,60,70, mg/L. Selanjutnya semua tabung diisi 1 mL air bebas reduktor dan 1 mL reagen Nelson. Mulut tabung ditutup dengan alumunium foil kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit. Tabung didinginkan hingga temperatur sama dengan temperatur kamar lalu ditambah 1 mL reagen Samogy lalu dikocok sampai semua endapan Cu<sub>2</sub>O larut. Kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan hingga tanda batas, kemudian ditentukan serapannya pada panjang gelombang maksimum 500-800 nm. Blangko diisi dengan air bebas reduktor.

### 3.5.8 Penentuan Kondisi Optimum

Penentuan kondisi optimum (temperatur, pH, dan waktu inkubasi) enzim xilanase pada substrat sellulosa dari xilan perlu dilakukan karena setiap enzim mempunyai kondisi optimum yang berbeda tergantung dari jenis dan asal enzim.

#### 3.5.8.1 Penentuan pH Optimum

Untuk penentuan pH optimum dilakukan uji aktivitas dengan menggunakan ekstrak kasar enzim xilanase pada pH bervariasi, yaitu pada pH 5,6,7,8,9 dengan cara sebagai berikut : Disediakan 5 buah tabung reaksi dimana masing-masing diisi dengan 1 mL substrat xilan 1 % (b/v). Kemudian diinkubasi di atas penangas air pada temperatur 60°C selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 mL ekstrak kasar enzim xilanase dan pH diatur dengan menambahkan 1 mL buffer asetat pH 5, 1 mL buffer fosfat pH 6 dan 7,1 mL buffer tris-HCl pH 8 dan 9 pada tabung 1,2,3,4,5. Tiap campuran ini diinkubasi pada temperatur 60°C selama 60 menit. Setelah itu tabung di masukkan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar. Kadar gula reduksi tiap tabung dianalisis dengan metode Nelson-Samogy sebagai berikut : Dipipet sebanyak 1 mL larutan uji, dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambah 1 mL air bebas reduktor dan 1 mL reagen Nelson. Kemudian mulut tabung ditutup dengan alumunium foil dan

dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit. Setelah itu didinginkan hingga temperatur larutan sama dengan temperatur kamar kemudian ditambahkan 1 mL reagen arseno molibdat, dikocok sampai semua endapan Cu<sub>2</sub>O larut. Kemudian dipindah ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan air bebas reduktor sehingga volume akhir 10 mL dan dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum (500-800 nm) dengan blanko yang diberi perlakuan yang sama dengan sampel tapi filtrat enzim dimatikan aktivitasnya dengan cara memanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit sebelum dicampur dengan substrat.

### 3.5.8.2 Penentuan Temperatur Optimum

Untuk menentukan temperatur optimum dilakukan uji aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase pH optimum yang diperoleh dari percobaan sebelumnya. Temperatur divariasi yaitu : (40,50,60,70,80)°C . Cara yang dipakai seperti pada penentuan pH optimum hanya bedanya pada penentuan temperatur optimum temperaturnya divariasi.

### 3.5.8.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Pada penentuan waktu inkubasi optimum, dilakukan uji aktivitas dengan menggunakan ekstrak enzim kasar xilanase pada pH dan temperatur optimum yang diperoleh pada percobaan sebelumnya dan waktu inkubasi divariasi pada 40,45,50,55,60 menit. Cara yang digunakan sama seperti pada penentuan pH optimum dan temperatur optimum.

### 3.5.9 Pengukuran Aktivitas Enzim Xilanase

Aktivitas enzim xilanase dinyatakan dalam Unit. Satu Unit aktivitas enzim adalah banyaknya µg gula pereduksi yang dihasilkan oleh 1 mL enzim dalam setiap menit. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh ke dalam persamaan linier kurva standar gula pereduksi, kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut (Lehninger, 1997) :

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

di mana:

AE	= aktivitas enzim ( $\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{menit}$ )
x	= konsentrasi gula pereduksi ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
V	= volume total sampel tiap tabung (mL)
p	= jumlah enzim (mL)
q	= waktu reaksi (menit)
fp	= faktor pengenceran

### 3.5.10 Penentuan $V_m$ dan $K_M$

Untuk menentukan  $V_m$  dan  $K_M$  dilakukan pada kondisi optimum hasil pecobaan (3.5.8.1, 3.5.8.2, 3.5.8.3) untuk uji aktivitas ekstrak kasar enzim pada konsentrasi substrat dengan variasi konsentrasi 0,1;0,5;1;1,5;2 (b/v).

### 3.5.11 Analisis Data

Data yang diperoleh dari ketiga perlakuan berupa variasi pH, temperatur, dan waktu inkubasi dianalisis dengan metode analisa rancangan acak lengkap (RAL). Apabila terdapat perbedaan diantara perlakuan akan diuji lebih lanjut dengan uji beda nyata terkecil (Yitnosumarto, 1993).



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dari penelitian ini akan dibahas tentang isolasi ekstrak kasar enzim xilanase dari *Bacillus sp* dengan menggunakan induser kulit jagung dan penentuan kondisi optimum aktivitas enzim, yang meliputi pH, temperatur, dan waktu inkubasi serta penentuan parameter kinetika reaksi enzimatis, yaitu  $V_m$  dan  $K_M$  dengan menggunakan substrat xilan. Isolat ekstrak kasar enzim xilanase diukur aktivitasnya dengan menggunakan satuan unit aktivitas. Satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya  $\mu\text{g}$  gula pereduksi yang dapat dihasilkan oleh 1 mL enzim dalam waktu 1 menit.

#### 4.1 Isolasi Ekstrak Kasar Enzim Xilanase dari *Bacillus sp*

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus sp* (Lampiran 6) memberikan gambaran mengenai fase pertumbuhan, yang meliputi fase eksponensial (0-28 jam), fase stasioner (28-40 jam), dan fase kematian (40 jam). Produksi enzim sangat efektif dilakukan pada fase eksponensial karena pertumbuhan biomassa sesuai dengan perhitungan logaritma.

Tahap awal sebelum mengisolasi ekstrak kasar enzim xilanase adalah membuat inokulum sampai jam ke-14 dan dilanjutkan dengan produksi enzim sampai jam ke-24. Enzim xilanase dihasilkan oleh bakteri *Bacillus sp* dengan menggunakan induser kulit jagung. Kulit jagung mengandung karbohidrat cukup tinggi, sehingga dapat digunakan sebagai sumber energi bakteri dalam menginduksi enzim xilanase. Proses isolasi ekstrak kasar enzim dilakukan dengan metode sentrifugasi, yaitu dengan penambahan larutan buffer fosfat 0,2 M pH 7,0 masing-masing sebanyak 15 mL ke dalam 3 buah erlenmeyer yang masing-masing berisi 150 mL media cair. Volume total media cair yang digunakan sebanyak 350 mL. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit, sehingga menghasilkan supernatan, yang merupakan ekstrak kasar enzim xilanase.

Keberhasilan isolasi enzim ditentukan melalui uji aktivitas enzim dengan substrat xilan menggunakan metode penentuan gula pereduksi, yaitu metode Nelson-Samogyi. Isolat ekstrak kasar enzim diuji aktivitasnya pada kondisi pH 8,0, temperatur 60 °C dan waktu inkubasi selama 50 menit. Terbentuknya gula pereduksi ditandai

dengan terbentuknya endapan Cu<sub>2</sub>O berwarna merah bata. Pemilihan substrat xilan untuk uji aktivitas ini didasarkan pada kandungan xilan yang merupakan hemiselulosa murni tanpa adanya lignin, yang sulit untuk dihidrolisis oleh enzim xilanase, sehingga mengoptimalkan hidrolisis xilan oleh ekstrak kasar enzim xilanase. Hasil uji aktivitas enzim adalah sebesar  $(15,1462 \pm 0,6869)$  Unit (Tabel L.9.2).

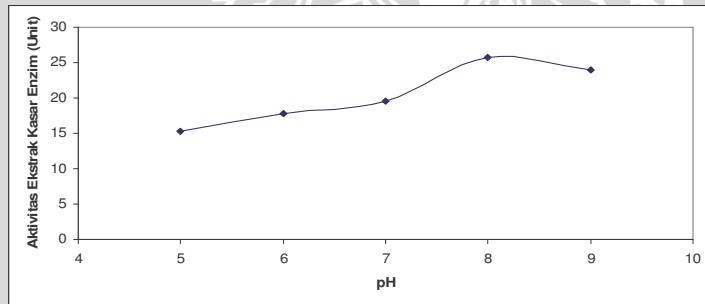
## 4.2 Penentuan Kondisi Optimum

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain pH, temperatur dan waktu inkubasi. Untuk mengetahui aktivitas optimum, maka dilakukan pengukuran aktivitas dengan variasi kondisi yang berbeda.

### 4.2.1 Penentuan pH Optimum

Enzim memiliki pH optimum yang karakteristik, yaitu pH yang dapat menghasilkan aktivitas maksimal dalam mengkatalisis suatu reaksi (Girinda, 1993). Perubahan pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim, karena muatan gugus-gugus yang terdapat di dalam protein enzim, yaitu gugus karboksil dan asam amino, mengalami perubahan tingkat ionisasi.

Pengujian pengaruh pH terhadap aktivitas enzim xilanase dilakukan dengan variasi pH 5,6,7,8,dan 9, variasi pH ini didasarkan pada kisaran pH optimum enzim xilanase yaitu 7-10 (Nakamura, *et al.*, 1993).



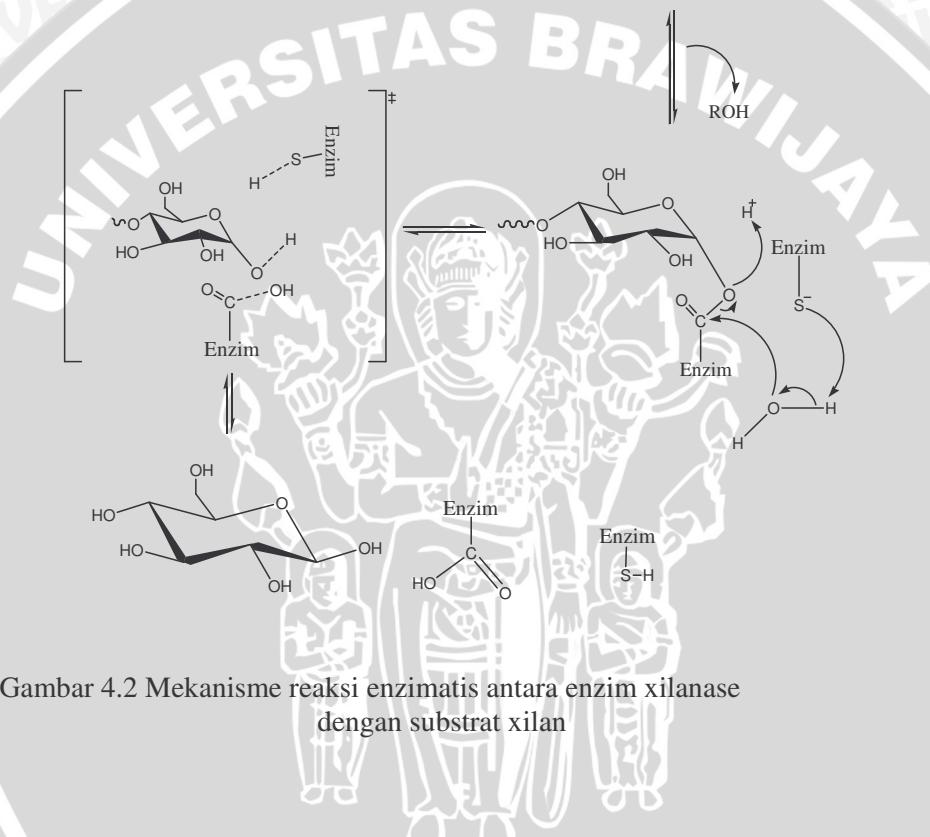
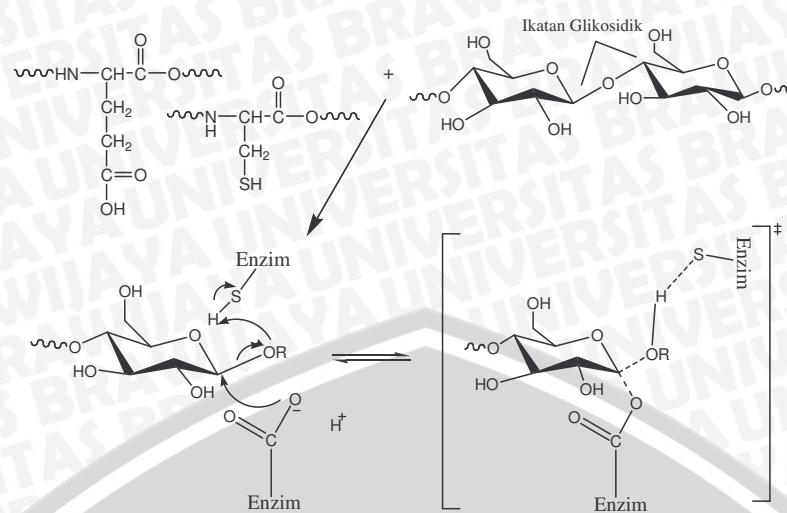
Gambar 4.1 Kurva Pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase

Gambar 4.1 menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar enzim xilanase adalah pada pH optimum, yaitu pH 8 dengan aktivitas rata-rata sebesar  $(25,715 \pm 0,2330)$  Unit (Tabel L.13.1). Hasil pH optimum ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Narayan, et.al, (2004), yang melaporkan bahwa pH optimum enzim xilanase berkisar antara 7,0-9,0. Hasil uji statistik berdasarkan analisis ragam (Lampiran 13) diperoleh  $F_{hitung} > F_{tabel\ 0,05}$ , sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan nyata antar perlakuan pH. Uji BNT 5 % dilakukan untuk mengetahui variasi pH mana saja yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Berdasarkan Tabel L.13.2, diketahui bahwa pada pH 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 terdapat perbedaan yang sangat nyata.

Enzim memiliki sisi aktif dengan gugus-gugus tertentu yang berperan sebagai katalis dalam pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Xilanase mempunyai gugus aktif yang dapat menghidrolisis xilan, yaitu gugus karboksil yang merupakan gugus aktif dari asam amino jenis asam glutamat dan gugus sulfhidril dari sist (Lee, *et al.*, 1993).

Gambar kurva pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase menunjukkan aktivitas xilanase mengalami kenaikan dari pH 5 sampai pH optimum 8. Kenaikan aktivitas ini dipengaruhi oleh perubahan gugus aktif rantai samping yaitu gugus -COOH dari asam amino glutamat yang telah bermuatan negatif yakni dalam bentuk ion karboksilat (-COO<sup>-</sup>). Semakin tinggi pH pada kondisi ini maka ion karboksilat dari xilanase akan semakin banyak. Hal ini menyebabkan protonasi oksigen glikosidik pada awal pembentukan komplek glikosil enzim akan semakin mudah terjadi sehingga aktivitas enzim semakin meningkat dengan dihasilkan produk gula pereduksi yang semakin banyak pula.

Peningkatan aktivitas xilanase dibatasi oleh muatan gugus -SH, setelah pH optimum yakni pH 8 aktivitas xilanase mulai menurun tepatnya pada pH 9. Pada kondisi ini gugus aktif -SH kehilangan muatan positif membentuk ion -S<sup>-</sup> yang disebabkan kelebihan ion OH dalam larutan, sehingga menyebabkan substrat tidak lagi berinteraksi dengan enzim serta terhambatnya protonasi yang melibatkan gugus sulfhidril (-SH). Kondisi ini yang mengakibatkan terbentuknya kompleks E-S menjadi terhambat dan produksi gula pereduksi menurun pada pH 9.



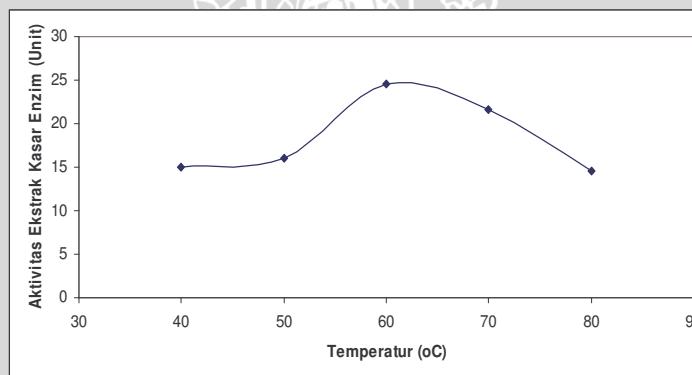
Gambar 4.2 Mekanisme reaksi enzimatis antara enzim xilanase dengan substrat xilan

Menurut Lehninger (1997), perubahan keaktifan enzim yang dipengaruhi oleh pH lingkungan dapat menyebabkan terjadinya denaturasi enzim, pada pH yang sangat tinggi ataupun rendah (pH 8,0 atau 6,5), menyebabkan perubahan muatan gugus-gugus fungsional dari enzim atau substrat.

#### 4.2.2 Penentuan Temperatur Optimum

Temperatur merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim, jika temperatur meningkat maka laju reaksi juga akan meningkat hingga batas tertentu. Enzim memiliki temperatur optimum dalam melakukan fungsinya, sehingga diperoleh aktivitas enzim maksimum. Pengaruh temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase dilakukan dengan variasi temperatur (40, 50, 60, 70 dan 80) °C (pada pH optimum 8).

Xilan cukup stabil hingga temperatur 180 °C, sehingga pada variasi temperatur (20-70) °C struktur xilan tidak mengalami perubahan (Schlegel dan Schmidt, 1984). Enzim xilanase cukup stabil hingga temperatur 60 °C, tetapi enzim xilanase akan mengalami denaturasi pada temperatur yang lebih tinggi (Richana, 2002). Aktivitas enzim xilanase dari *Bacillus* sp yang dipengaruhi oleh temperatur dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 4.3 Kurva pengaruh temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase

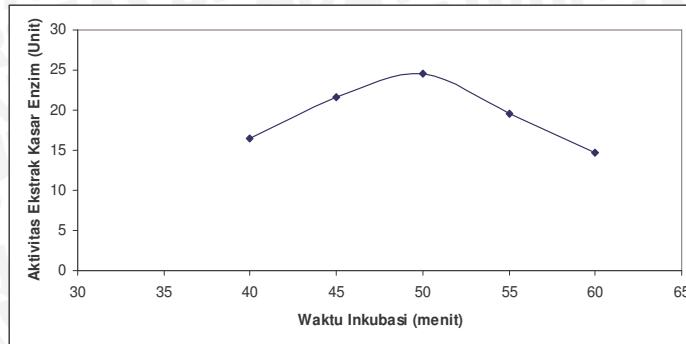
Gambar 4.3 menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar enzim xilanase dicapai pada temperatur 60 °C, dengan aktivitas

rata-rata sebesar  $(24,6147 \pm 0,5847)$  unit (Tabel L.13.3). Hal ini tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Sunna dan Antraniklan (1997) dalam Richana (2002), yaitu temperatur optimum enzim xilanase berkisar antara  $(50-60)$  °C. Hasil uji statistik berdasarkan analisis ragam (Lampiran 13) diperoleh  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel 0,05}}$ , sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan nyata antar perlakuan temperatur. Uji BNT 5 % dilakukan untuk mengetahui variasi temperatur mana saja yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Berdasarkan Tabel L.13.4, diketahui bahwa pada temperatur  $(40, 50, 60, 70$  dan  $80)$  °C terdapat perbedaan yang sangat nyata.

Peningkatan temperatur menyebabkan peningkatan energi kinetik sehingga akan mempercepat gerakan enzim dan substrat untuk bertumbuhan semakin besar. Tumbuhan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk semakin banyak. Pada temperatur optimum, tumbuhan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk semakin banyak. Keadaan ini dukung oleh pendapat Winarno (1980) yang menyatakan bahwa semakin tinggi temperatur maka enzim akan semakin aktif sehingga aktivitasnya akan semakin besar. Peningkatan temperatur lebih lanjut akan menurunkan aktivitas ekstrak kasar enzim. Enzim mengalami perubahan konformasi atau rusaknya struktur skunder dan tersier dari enzim pada temperatur yang terlalu tinggi, akibatnya substrat sulit berinteraksi dengan sisi aktif enzim bahkan terdenaturasi sehingga tidak dapat berinteraksi sama sekali (Lakitan, 2004).

#### 4.2.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Aktivitas enzim xilanase juga dipengaruhi oleh waktu inkubasi atau waktu reaksi enzimatis. Waktu inkubasi yaitu waktu yang dibutuhkan enzim untuk berikan dengan substrat. Penentuan waktu inkubasi optimum ini dilakukan pada kondisi optimum sebelumnya yaitu pada kondisi pH optimum dan temperatur optimum pada pH 8 dan temperatur 60°C. Pengaruh waktu inkubasi dilakukan dengan variasi waktu  $(40, 45, 50, 55, 60)$  menit.



Gambar 4.4 Kurva pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase

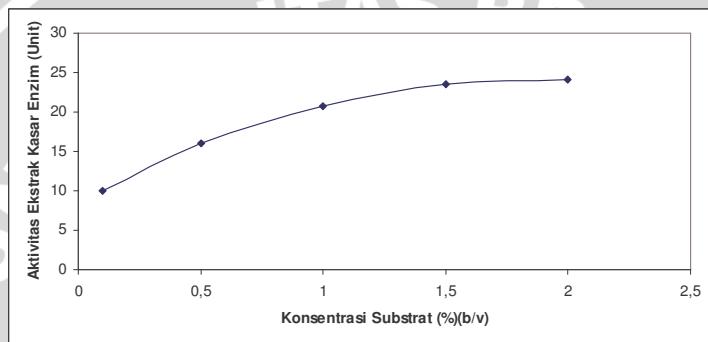
Gambar 4.4 menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar enzim dicapai pada waktu inkubasi 50 menit dengan aktivitas rata-rata sebesar  $(24,6100 \pm 0,5816)$  unit (Tabel L.13.5). Hasil uji statistik berdasarkan analisis ragam (Lampiran 13) diperoleh  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}, 0,05}$ , sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan nyata antar perlakuan waktu inkubasi. Uji BNT 5 % dilakukan untuk mengetahui variasi waktu inkubasi mana saja yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Berdasarkan Tabel L.13.6, diketahui bahwa pada waktu inkubasi (40, 45, 50, 55 dan 60) °C terdapat perbedaan yang sangat nyata.

Penambahan waktu inkubasi akan meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim. Sisi aktif enzim dalam mengikat substrat secara optimum membutuhkan waktu yang cukup. Jika waktu yang dikondisikan pada enzim dan substrat kurang dari cukup, maka sisi aktif enzim belum optimal dalam mengikat substrat, sehingga produk yang terbentuk masih sedikit pada saat reaksi dihentikan. Pada saat waktu inkubasi optimum, substrat terikat secara maksimum oleh sisi aktif enzim, sehingga pada saat ini dihasilkan produk yang melimpah. Aktivitas enzim mengalami penurunan dengan penambahan waktu inkubasi lebih lanjut. Produk gula pereduksi yang dihasilkan dari reaksi enzimatis sebanding dengan lama waktu inkubasi, tetapi jika sisi aktif enzim telah jenuh oleh substrat, maka lama waktu inkubasi kurang berpengaruh, sehingga produk yang dihasilkan hanya mengalami peningkatan yang relatif kecil. Berdasarkan pengertian aktivitas enzim, satu unit aktivitas adalah banyaknya  $\mu\text{g}$  gula

pereduksi yang dihasilkan oleh 1 mL enzim per satuan waktu, sehingga makin lama waktu inkubasi, aktivitas enzim makin menurun.

#### 4.3 Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis

Salah satu karakteristik yang khas dari enzim yaitu  $K_M$  dan  $V_m$ .  $K_M$  merupakan konsentrasi substrat pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimum. Sedangkan  $V_m$  merupakan kecepatan aktivitas enzim secara maksimal. Penentuan  $K_M$  dan  $V_m$  dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada variasi konsentrasi substrat yang berbeda dengan jumlah enzim yang digunakan konstan dan dilakukan pada kondisi optimum enzim. Variasi konsentrasi substrat yaitu (0,1;0,5;1,5; dan 2 mM). Variasi konsentrasi substrat ini didasarkan pada penelitian Isil (2005).



Gambar 4.5 Kurva hubungan konsentrasi substrat xilan terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase

Gambar diatas menunjukkan bahwa konsentrasi substrat sebanding dengan aktivitas ekstrak kasar enzim. Pada konsentrasi substrat rendah, aktivitas ekstrak kasar enzim juga rendah, karena sisi aktif enzim hanya sedikit mengikat substrat, sehingga produk gula pereduksi yang dihasilkan juga sedikit. Demikian juga dengan konsentrasi substrat yang makin tinggi, maka sisi aktif enzim akan makin banyak mengikat substrat, sehingga produk gula pereduksi yang dihasilkan juga makin banyak. Penambahan substrat lebih lanjut hanya sedikit meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim,

karena hampir semua enzim telah membentuk kompleks enzim-substrat, sehingga tidak terdapat lagi sisi aktif enzim yang bebas.

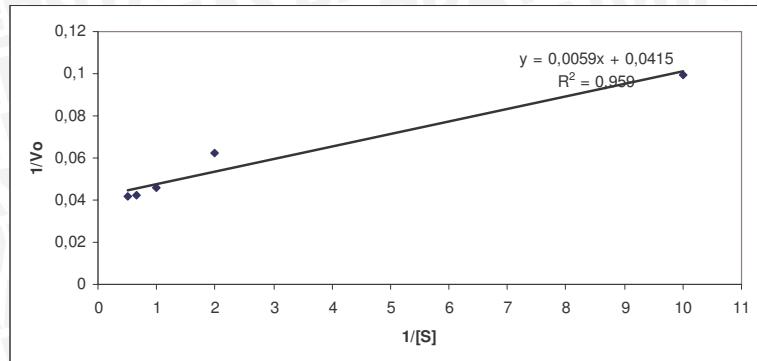
Berdasarkan kurva hubungan antara konsentrasi substrat terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim (Gambar 4.5), menunjukkan adanya hubungan kuantitatif di antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik. Makin tinggi konsentrasi substrat, maka makin besar probabilitas substrat dalam berikatan dengan sisi aktif enzim. Gambar 4.5 sulit menyatakan berapa konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mencapai  $V_m$ , karena penambahan substrat berlebih akan terus meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik, tetapi hanya mengalami peningkatan yang sangat kecil, sehingga tidak dapat diketahui pada konsentrasi berapa tercapai harga  $V_m$ . Namun demikian, karena kurva yang menyatakan hubungan ini memiliki bentuk hiperbola, maka Michaelis-Menton mendefinisikan suatu tetapan ( $K_M$ ) yang bermanfaat dalam menyatakan hubungan yang tepat antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik.

Harga  $V_m$  dan  $K_M$  dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk sebagai berikut (Lehninger, 1997)

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

Berdasarkan persamaan diatas dapat dibuat persamaan regresi liniernya ( $Y = aX + b$ ), dimana nilai  $a$  sebagai  $K_M/V_m$  dan nilai  $b$  merupakan  $1/V_m$ .

Berdasarkan gambar 4.6 diperoleh nilai  $a$  ( $K_M/V_m$ ) sebesar 0,0059 dan nilai  $b$  ( $1/V_m$ ) sebesar 0,0415 sehingga persamaan linier tersebut diperoleh nilai  $K_M$  sebesar 0,14 % (b/v) dan nilai  $V_m$  sebesar 24,10  $\mu\text{mol/mL}$ menit.



Gambar 4.6 Kurva Hubungan  $1/[S]$  terhadap  $1/V$

Nilai  $K_M$  merupakan konsentrasi substrat yang dibutuhkan oleh enzim agar dapat bekerja maksimal. Sehingga dari harga  $K_M$  yang diperoleh dapat menunjukkan bahwa enzim xilanase dapat bekerja maksimal pada konsentrasi substrat 0,14 %(b/v). Nilai  $K_M$  menunjukkan konstanta pengikatan enzim terhadap substrat.  $K_M$  dapat digunakan sebagai indikator untuk mengetahui kekuatan ikatan kompleks enzim-substrat (ES). Makin besar harga  $K_M$ , maka ikatan yang terjadi pada kompleks ES makin lemah dan sebaliknya, harga  $K_M$  makin kecil menunjukkan ikatan enzim-substrat makin kuat.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Kondisi kerja optimum aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase dalam menghidrolisis substrat xilan menjadi gula pereduksi terjadi pada pH 8,0, temperatur 60 °C dan waktu inkubasi selama 50 menit dan dihasilkan aktivitas enzim sebesar  $(15,1462 \pm 0,6869)$  U.
2. Harga  $V_m$  dan  $K_M$  yang diperoleh dari persamaan *Lineweaver-Burk* sebesar 24,10  $\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{menit}$  dan 0,14 % (b/v).

#### 5.2. Saran

Perlu dilakukan pemurnian ekstrak kasar enzim xilanase dan pengaruh ion logam yang dapat mengaktifasi dan menginhibisi aktivitas enzim.



**DAFTAR PUSTAKA**

- Bakir, 2001, Pengantar Mikologi, Penerbit Alumni, Bandung
- Beg, Q.K., M. Kapoor, L. Mahajan, and G.S. Hoondal, 2001, Microbial xylanases and their industrial applications; a review. *J. Appl. Micribiol. Biotechnol.* 56:326-338
- Cho-Goo, S., J.H. Suh, and Y.I. Choi, 1996, Overproduction, purification, and characterization of *Bacillus stearothermophilus* Endo-xylanase A (xynA), *J. Microbiology and Biotechnology* 6:79-85
- Chuzaemi S, Susanto, 1983, Petunjuk analisis Bahan Makanan Ternak, Nuffik Unibraw, Bagian Ilmu Makanan Ternak Fakultas peternakan Universitas Brawijaya Malang
- Cooper , T.G., 1977, The Tool of Biochemistry, John Wiley and Sons, Canada
- Dashek, W.V., 1997, Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology, <http://www.en.wikipedia.org/wiki/xylanase>
- Dekker,R.F.H., 1983, Bioconversion of Hemicellulose: Aspect of Hemicellulose Production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and Enzymic Saccharification of Hemicellulose, *Biotechnol, Bioeng,* 25:1127-1146
- Girindra, A., 1993, Biokimia 1, P.T. Gramedia, Jakarta
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W. and Zupaneie, S., 1996, Production of fungal xylanases, <http://www2.psu.ac.th/PresidentOffice/EduService/Journal/27-2-pdf/10xylanase.pdf>
- Hettenhaus, 2002, Teknologi Fermentasi Biji-Bijian dan Umbi-umbian, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat jendral Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB, Bogor

Isil, S. and N. Aksoz, 2005, Investigation of Factors Affecting Xilanase Activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3, *Brazilian Journal of Biology and Technology* 48(2):1516-8913

Judoamidjojo, R.M., E.E. Said dan Hartoto, 1992, Biokonversi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB, Bogor

Lakitan, B., 2004, Dasar-dasar Fisiologi Tumbuhan, PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.

Lehninger, L.A., 1997, Dasar-dasar Biokimia, Jilid 1, Alih Bahasa: Maggy Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta

Martin, D. W., Mayes, P. A., dan Rodwell's., 1983 Harper's Review of Biochemistry, 19<sup>th</sup> ed, Lange Medical Publications, Marnzen Asia, Singapura

Mayasari, Dian, 2008, Pengaruh Sumber Karbon Terhadap Produksi Enzim Xilanase Dari *Trichoderma Viridie*, Skripsi Program Sarjana Kimia, Universitas Brawijaya, Malang

Muhtadi, D. S. R., Palipi dan M. Astawan, 1992, Enzim Dalam Industri Pangan, P. T. Gramedia

Murray, S., 2006, Basic Biochemistry 3<sup>th</sup> Edition, McMillan Publishing Co. Inc., New York

Nakamura, S., K. Wakabayashi, R. Nakai, R. Aono, and K. Horikoshi. 1993, Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliophilic *Bacillus* sp. Strain 41M1. Appl. and Environ. Microbiol. 59(7):2311-2316

Nakamura, S., R. Nakai, K. Wakabayashi, Y. Ishigoro, R. Aono, and K. Horikoshi. 1994. Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliophilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. Biosci. Biotech. Biochem. 58(1):78-81

Narayan R., Salah Uddin, 2004, Screening, Purification and Characterization of Xylanase from *Paenibacillus* sp, Asian

Network for Scientific Information, Pakistan Journal of Biological Sciences 7 (3) : 372-379

- Park Y.S., D.Y. Yum, D.H. Bai, and J.H. Yu. 1992, Xylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. YC-335, Biosci Biotech Biochem, 56(8):1355-1356
- Pason et all, 2002, Approaches to Labeling and Identification of Active site residues in Glycosidases, Journal of Protein Science, 4:361-372
- Poedjiadi, A., 1994, Dasar-dasar Biokimia, Universitas Indonesia Press, Jakarta
- Priest, M., 1984, Position Paper Microbial Cellulose : A New Research For Wood, Paper, Textiles, Food and Specialty Product, University of Texas, Austin
- Rahayu, 1983, Mikroorganisme Dalam Ragi Untuk Fermentasi Tape, Dalam Jamanan dkk Prosiding Seminar Bioteknologi Biomassa, BPPT
- Rahman, A., 1989, Pengantar Teknologi Fermentasi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas, Bioteknologi IPB, Bogor
- Reilly, A. D., 1991, Food from Waste Paper, Applied Science Publisher Ltd., London
- Richana, N., P. Lestari, A. Thontowi, dan Rosmimik. 2000. Seleksi isolat bakteri lokal penghasil xilanase. J. Mikrobiologi Indonesia 5(2):54-56.
- Richana, N., 2002, Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Ruiz-Arribas et al, 1995). Reilly, A. D., 1991, Food from Waste Paper, Applied Science Publisher Ltd., London
- Sanjaya, 2000, Pengaruh Anhidridasetat Terhadap Struktur Molekuler Kayu dalam Stabilisasi Dimensi Kayu *Pinus merkusii*, FKIP,Universitas Sriwijaya,

[www.fmipa.itb.ac.id/jms/file/JMS%20Vol%2061%20Sanjaya.pdf](http://www.fmipa.itb.ac.id/jms/file/JMS%20Vol%2061%20Sanjaya.pdf)

Schlegel, H.G. dan K. Schmidt, 1984, Mikrobiologi Umum, Edisi 6, Alih Bahasa: R.M. Tedjo Baskoro, UGM Press, Yogyakarta

Sunna, Sofianna Sembiring dan Christina Winarti, 2003, Biokonversi Buah Semu Mente menjadi Konsentrat Protein Mikrobial, Buletin TRO Vol. XIV No. 2

Straiyer, L., 1984, Biochemistry, 2 rd ed, W. H. Freeman and Company, New York

Thomas, C.S. and G.T. Tsao. 1996. Cellulase and biosynthesis regulation. In D. Pearlman (Ed.). Annual Report on Fermentation Process. Academic Press, New York

Tjitrosoepomo, 1994, Morfologi Tanaman, Gadjah Mada Press, UGM, Jogjakarta

Trismilah, Deden, Sumaryanto, 2006, Biokonversi Pemanfaatan Limbah Industri Pertanian. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB. Bogor

Tsujiibo, H., K. Miyamoto, T. Kuda, K. Minami, T. Sakamoto, T. Hasegawa, and Y. Ianamori, 1992, Purification, properties, and partial amino acid sequences of thermostable xylanase from *Streptomyces termoviolaceus* OPC-520. Appl. Environ. Microbiol. 58:371-375

Underwood, A.L. dan R.A. Day, 1998, Analisa Kimia Kuantitatif, Edisi keempat, Alih Bahasa: R. Soendoro, Widaningsih W., Sri Rahadjeng S., Penerbit Erlangga, Jakarta

Voet, D., dan Voet, J., 1990, Biochemistry, John Willey and Sons, London

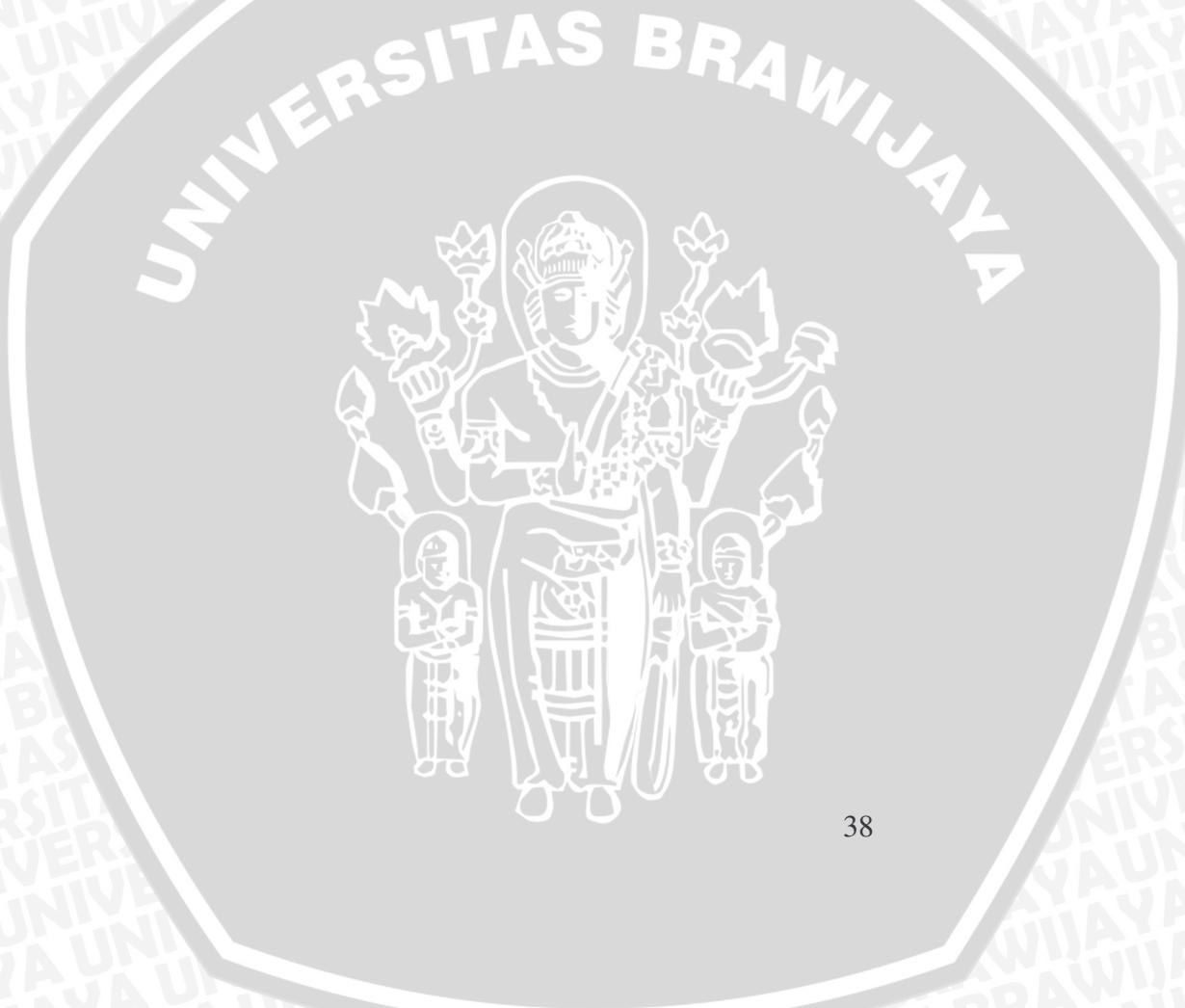
Vogel, A. I., 1994, A Text-Book of Macro and Semimicro Qualitative Inorganic Analysis, 4<sup>th</sup> ed, Longmans, Green and Co Ltd

Wahyudi, P., 2005, Enzim Xylanase, Teknologi Bersih untuk "Bleaching Pulp", Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Bioindustri, [www.sinarharapan.co.id/berita/0203/05/ipt02.html](http://www.sinarharapan.co.id/berita/0203/05/ipt02.html)

Winarno, D. Fardiaz dan S. Fardiaz, 1980, Pengantar Teknologi Pangan, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta

Yang Eok Lee, S.E. Lowe, B. Henrissat and J. Gregory Zeikus, 1988, Charactrization of the Active Site and Thermostability Regions of Endoxylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum B6A-RI*, *Journal of Bacteriology* 175(18):5890-5898

Yu S. G. and R. Aebersold, 1991, Approaches to Labeling and Identification of Active site residues in Glycosidases, *Journal of Protein Science*, 4:361-372.



## Lampiran 1. Komposisi media pertumbuhan

### 1.1 Media Padat

- Tepung agar 4 g
- Pepton 1 g
- Ekstrak Daging 0,6 g

Dilarutkan dengan akuades hingga 200 mL

### 1.2 Media Cair

- Pepton 6 g
- Ekstrak Ragi 6 g
- NaCl 6 g
- Glukosa 6 g

Dilarutkan dengan akuades sampai 1000 mL

## Lampiran 2. Preparasi Larutan

### 2.1 Pembuatan Reagen

#### 2.1.1 Pembuatan Reagen Nelson

Reagen Nelson terdiri dari campuran Nelson A dan Nelson B dengan perbandingan 25:1.

Nelson A : dilarutkan 1,20 g KNa-tartrat, 2,40 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,60 g NaHCO<sub>3</sub>, 14,40 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ke dalam 80 mL akuades dengan pemanasan.

Nelson B : dilarutkan 2,0 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dan 18,0 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ke dalam 100 mL akuades.

#### 2.1.2 Pembuatan Reagen Samogyi

Dilarutkan 25,0 g ammonium molibdat dalam 450 mL akuades, setelah itu ditambahkan 25,0 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat sambil diaduk-aduk. Dilarutkan pada gelas beaker lain, 3,0 g Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dalam 25 mL akuades, kemudian larutan ini dituang ke dalam larutan pertama dan disimpan dalam botol berwarna gelap dan diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 48 jam.

## 2.2 Pembuatan Air Bebas Reduktor

Akuades ditambah dengan  $\text{KMnO}_4$  hingga berwarna merah ( $\pm 4$  tetes), kemudian didestilasi, sehingga diperoleh air bebas reduktor.

## 2.3 Pembuatan Larutan Stok Glukosa 1000 ppm

Ditimbang 0,1000 g glukosa anhidrat dan dilarutkan dengan akuades dalam gelas beaker, kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

## 2.4 Pembuatan Larutan Baku Gula Pereduksi

Dipipet 10,0 mL larutan stok glukosa 1000 mg/L, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian larutan baku glukosa 100 ppm tersebut dipipet berturut-turut 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 ; 7,0 mL, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan gula pereduksi dengan konsentrasi 20, 30, 40, 50, 60, dan 70 ppm.

## 2.5 Pembuatan Larutan Asam asetat 0,2 M

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

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

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

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

$$V_1 \times 17,5 = 100 \times 0,2$$

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

Dipipet larutan asam asetat dengan pipet ukur 5 mL sebanyak 1,15 mL, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

#### 2.6 Pembuatan Larutan Na-asetat 0,2 M

$$\text{BM Na-asetat} = 82,0 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa Na-asetat} = \text{BM} \times M$$

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

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

Na-asetat sebanyak 1,64 g dilarutkan dalam 50 mL akuades, dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

#### 2.7 Pembuatan Buffer tris-HCl

$$\text{Mr. Tris-HCl} = 157,56 \text{ g / mol}$$

Untuk membuat buffer Tris-HCl 0,2 M sebanyak 100 mL, maka Tris-HCl yang diperlukan adalah :

$$\begin{aligned} \text{g Tris-HCl} &= 157,56 \text{ g / mol} \times 0,2 \text{ mol / L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 3,1512 \text{ g} \end{aligned}$$

Selanjutnya, ditimbang 3,1512 g dan dilarutkan dalam akuades steril sebanyak 100 mL. Lalu, diatur pHnya dengan menggunakan pH meter.

#### 2.8 Pembuatan Buffer Fosfat

- Larutan Asam Fosfat ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 0,2 M 100 mL

mol H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

$$= M \times V$$

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

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

= n × Mr

$$= 0,02 \text{ mol} \times 97,97 \text{ g/mol}$$

$$= 1,9594 \text{ g}$$

massa H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

$$= \frac{m}{\rho}$$

$$= \frac{1,9594 \text{ g}}{1,71 \text{ g/mL}}$$

$$= 1,146 \text{ mL}$$

volume H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

• Larutan NaOH 0,2 M 100 mL

mol NaOH

$$= M \times V$$

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

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

= n × Mr

$$= 0,02 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol}$$

$$= 0,8 \text{ g}$$

massa NaOH

Jadi NaOH yang ditimbang sebesar 0,8 g.

## 2.9 Pembuatan Substrat Xilan 1 % (b/v)

Ditimbang 1,0 g xilan dan dilarutkan dengan larutan buffer fosfat pH 7,0. Setelah itu, dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan larutan buffer fosfat pH 7,0 sampai tanda batas.

### Lampiran 3. Perhitungan Harga pH buffer asetat 0,2 M

Larutan buffer asetat dengan pH tertentu dapat dibuat dengan cara mencampur larutan asam asetat dan larutan Na-asetat (Lampiran 2.5 dan 2.6), menggunakan persamaan berikut :

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

Sebagai contoh, untuk membuat larutan buffer asetat pH 5,0, maka 50 mL larutan asam asetat ditambah dengan 90,99 mL larutan Na-asetat dengan perhitungan sebagai berikut :

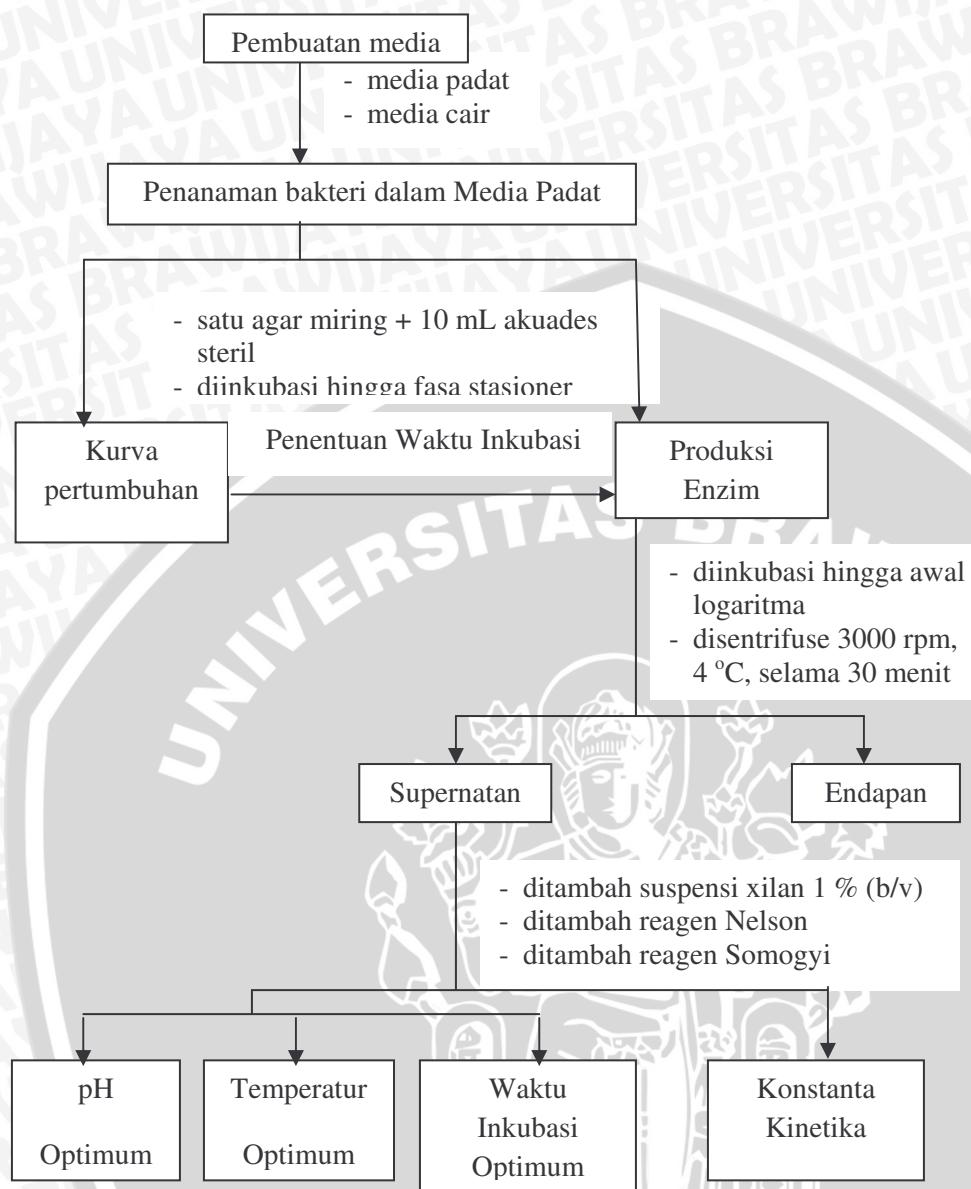
$$\text{pKa [HOAc]} = 4,74$$

$$5 = 4,74 - \log \frac{(50,0 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mmol/mL})}{(v \text{ mL} \times 0,2 \text{ mmol/mL})}$$

$$5 = 4,74 - \log \frac{50}{v}$$

$$v = 90,99 \text{ mL}$$

Kemudian larutan buffer asetat tersebut diukur pH-nya dengan menggunakan pH meter.

**Lampiran 4. Tahapan Kerja**

**Lampiran 5. Skema Kerja****1. Pembuatan Substrat Klobot Jagung**

Klobot jagung

- dicuci, dipotong – potong kurang lebih 0,5 cm
- dikeringkan di dalam oven pada temperatur 100 °C
- Dihaluskan menggunakan blender
- disaring dengan saringan 120 mesh dan 150 mesh

Tepung klobot jagung

**2. Pembuatan Media****2.1 Media Padat**

Tepung agar

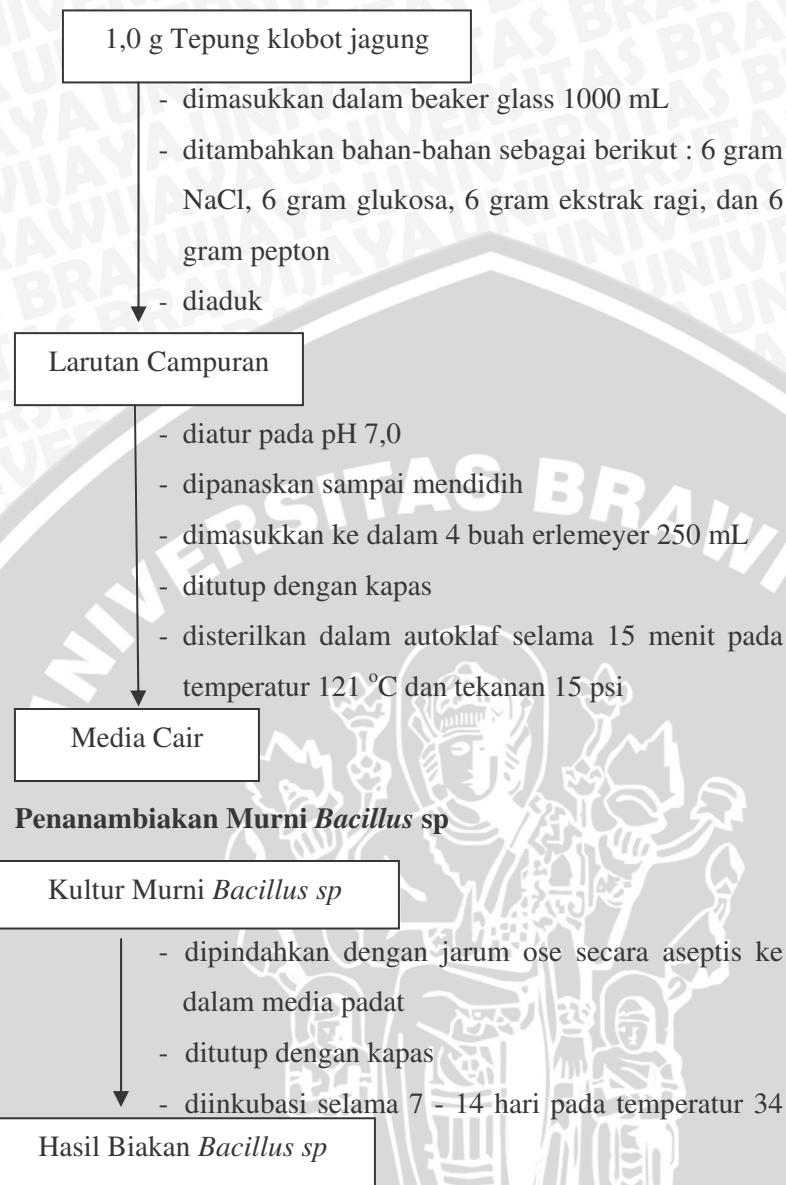
- ditimbang sebanyak 4 gram
- ditambahkan 1 gram pepton
- ditambahkan 0,6 gram ekstrak daging
- dilarutkan kedalam 200 ml aquades
- dididihkan

Larutan agar

- dituang dalam tabung reaksi masing-masing 4 mL
- ditutup dengan kapas
- disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121 °C dan tekanan 15 psi
- diletakkan tabung reaksi dalam posisi miring
- dibiarkan memadat

Media Padat

## 2.2. Media Cair



**4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan**

Hasil Biakan *Bacillus sp*

- disuspensikan dalam 10 mL akuades steril
- dimasukkan dalam erlenmeyer yang berisi 250 mL media cair
- diinkubasi dalam shaker pada temperatur kamar
- diamati pertumbuhannya setiap interval 4 jam, dengan cara mengukur serapan
- dibuat kurva hubungan antara waktu inkubasi terhadap Absorbansi

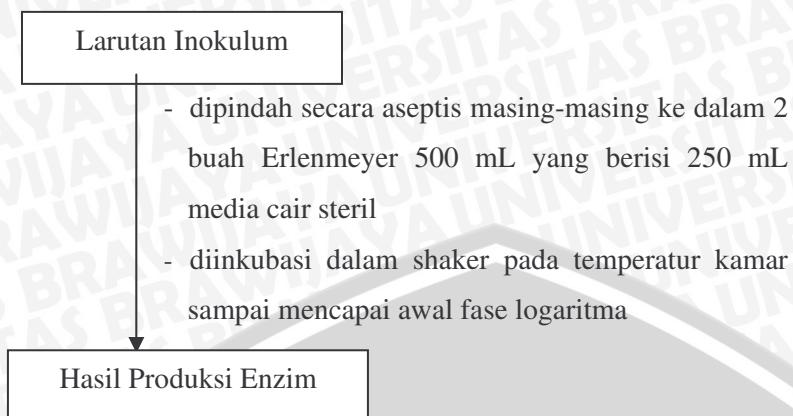
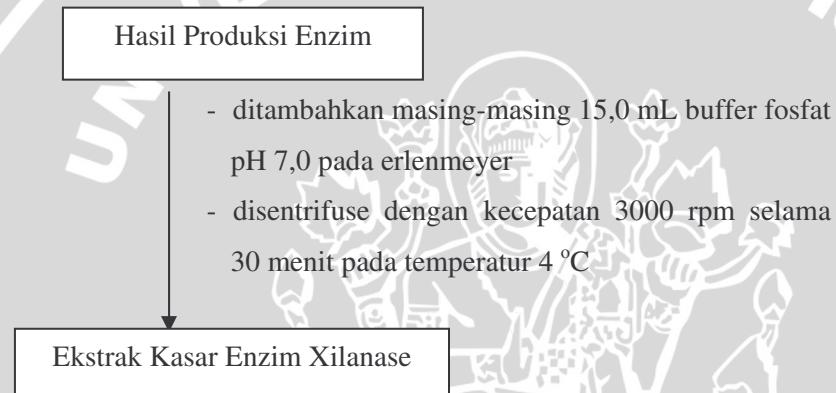
Kurva Pertumbuhan

**5. Pembuatan Inokulum**

Hasil Biakan *Bacillus sp*

- disuspensikan dalam 10 mL akuades steril
- dimasukan dalam 2 buah Erlenmeyer 250 mL yang masing-masing berisi 100 mL media cair
- diinkubasi pada temperatur kamar sampai awal fase logaritma

Larutan Inokulum

**6.Produksi Enzim****7.Isolasi Enzim**

## 8. Tahap Analisis Gula Pereduksi

### 8.1. Penentuan panjang gelombang maksimum Nelson-Samogyi

1,0 mL larutan Glukosa Standar 40 mg/L

- ditambah 1,0 mL air bebas reduktor
- ditambah 1,0 mL reagen Nelson
- dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan hingga temperatur mencapai temperatur kamar
- ditambah 1,0 mL reagen Samogyi
- dikocok sampai semua endapan Cu<sub>2</sub>O larut
- dipindah ke labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas
- diukur serapannya pada interval panjang gelombang 500-800 nm dengan blanko yang berisi air bebas reduktor dan reagen

Panjang Gelombang Maksimum

## 8.2. Pembuatan Kurva Baku Larutan Gula Pereduksi

1,0 mL Larutan Baku Glukosa

- ditambah 1,0 mL air bebas reduktor
- ditambah 1,0 mL reagen Nelson
- dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan hingga temperatur mencapai temperatur kamar
- ditambah 1,0 mL reagen Samogyi
- dikocok sampai semua endapan Cu<sub>2</sub>O larut
- dipindah ke labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas
- diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum dengan blanko yang berisi air bebas reduktor dan reagen

Kurva Baku

## 9. Penentuan Kondisi Optimum Ekstrak Kasar Enzim Xilanase

### 9.1. Penentuan pH Optimum

1 % Substrat Xilan (b/v)

- dipipet masing-masing sebanyak 1,0 mL ke dalam 5 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada  $T = 50^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit
- ditambahkan 1,0 mL ekstrak kasar enzim xilanase
- ditambah buffer asetat pH 5,0; buffer fosfat pH 6,0 dan 7,0; buffer tris HCl pH 8,0 dan 9,0; sebanyak 1,0 mL
- diinkubasi pada temperatur  $60^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit
- dimasukkan masing-masing tabung dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar
- dianalisis kadar gula pereduksi dengan metode Nelson- Samogyi

Larutan Uji

## 9.2. Penentuan Temperatur Optimum

1 % Substrat Xilan (b/v)

- dipipet masing-masing sebanyak 1,0 mL ke dalam 5 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada  $T = 60^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit
- ditambahkan 1,0 mL ekstrak kasar enzim xilanase
- ditambah buffer pH optimum (9.1) sebanyak 1,0 mL
- diinkubasi pada temperatur ( $40, 50, 60, 70, 80$ )  $^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit
- dimasukkan masing-masing tabung dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar
- dianalisis kadar gula pereduksi dengan metode Nelson- Samogyi

Data

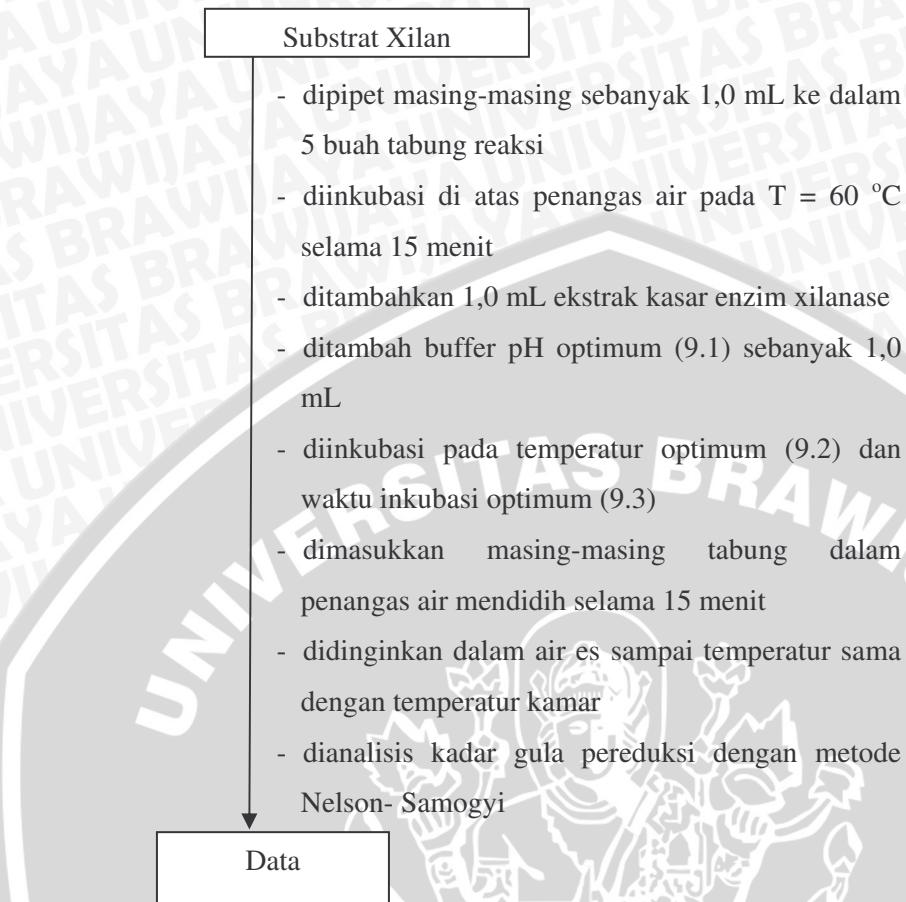
### 9.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

1 % Substrat Xilan (b/v)

- dipipet masing-masing sebanyak 1,0 mL ke dalam 5 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada  $T = 60^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit
- ditambahkan 1,0 mL ekstrak kasar enzim xilanase
- ditambah buffer pH optimum (9.1) sebanyak 1,0 mL
- diinkubasi pada temperatur optimum (9.2) selama (40, 45, 50, 55, 60) menit
- dimasukkan masing-masing tabung dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar
- dianalisis kadar gula pereduksi dengan metode Nelson- Samogyi

Data

## 10. Penentuan nilai $V_m$ dan $K_M$



## 11. Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase

1 % Substrat Xilan (b/v)

- dipipet masing-masing sebanyak 1,0 mL ke dalam 5 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada  $T = 60^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit
- ditambahkan 1,0 mL ekstrak kasar enzim xilanase
- ditambah buffer optimum sebanyak 1,0 mL
- diinkubasi pada temperatur optimum dan waktu inkubasi optimum
- dimasukkan masing-masing tabung dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar
- dianalisis kadar gula pereduksi dengan metode Nelson- Samogyi

Data

## 12. Analisis Kadar Gula Pereduksi Dengan Metode Nelson-Somogyi

Larutan Uji

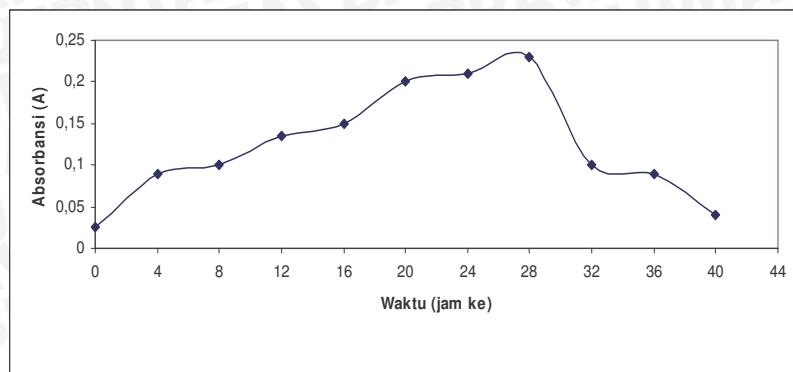
- dipipet sebanyak 1,0 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi
- ditambah 1,0 mL air bebas reduktor
- ditambah 1,0 mL reagen Nelson
- ditutup dengan aluminium foil
- dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit
- didinginkan hingga temperatur sama dengan temperatur kamar
- ditambah 1,0 mL reagen Somogyi
- dikocok sampai semua endapan Cu<sub>2</sub>O larut
- dipindah ke labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas
- diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum dengan blanko diberi perlakuan yang sama dengan sampel tetapi ekstrak kasar enzim dimatikan aktivitasnya

Data

**Lampiran 6. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Bacillus sp***

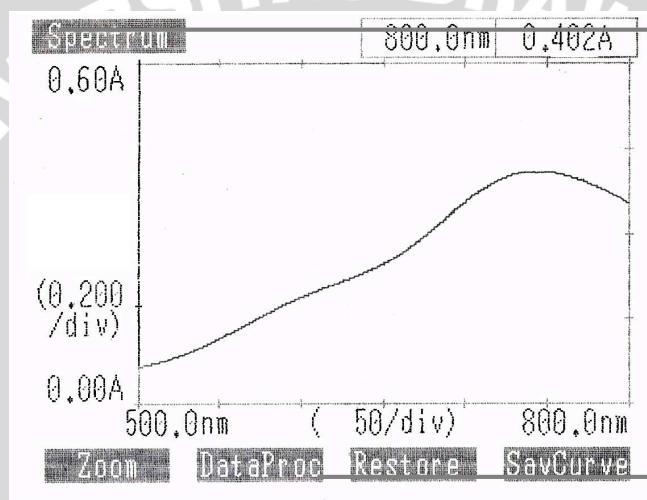
Tabel L.6 Data Absorbansi pada berbagai waktu

Waktu (jam ke)	Absorbansi ( A )		
	I	II	Rata- rata
0	0,023	0,027	0,025
4	0,100	0,080	0,090
8	0,080	0,120	0,100
12	0,150	0,120	0,135
16	0,200	0,100	0,150
20	0,100	0,300	0,200
24	0,230	0,190	0,210
28	0,220	0,240	0,230
32	0,075	0,125	0,100
36	0,070	0,110	0,090
40	0,030	0,050	0,040

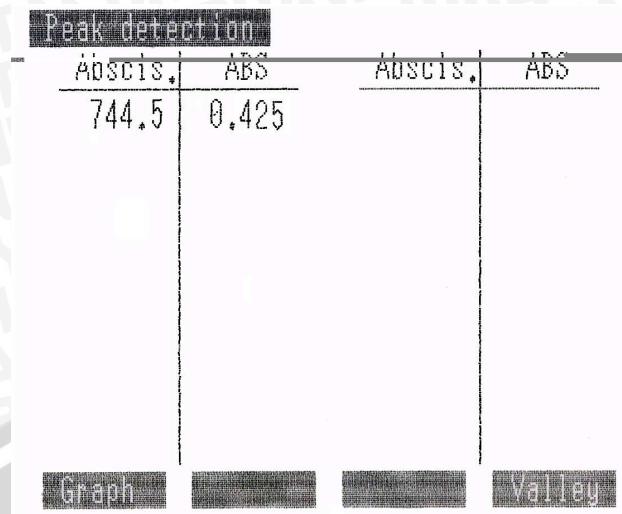


Gambar L.6 Kurva pertumbuhan *Bacillus sp*

**Lampiran 7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Gula Pereduksi**

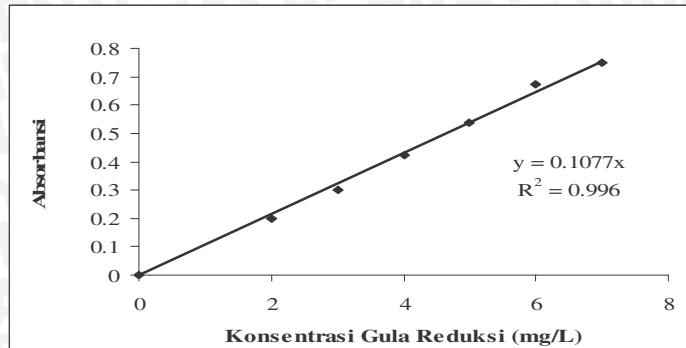


Gambar L.7 Spektrum Absorbsi

**Lampiran 8. Pembuatan Kurva Standar Gula Pereduksi**

Tabel L.8 Data absorbansi kurva standar gula pereduksi

Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi		
	I	II	Rata-rata
0	0	0	0
2	0,196	0,198	0,197
3	0,301	0,303	0,302
4	0,425	0,421	0,423
5	0,534	0,538	0,536
6	0,673	0,677	0,675
7	0,746	0,752	0,749



Gambar L.8 Kurva Standar Gula Pereduksi

**Lampiran 9.**

Data Serapan Gula Pereduksi dalam Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase pada kondisi pH 8,0; temperatur 60 °C dan waktu inkubasi 50 menit dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Tabel L.9.1. Data Serapan Gula Pereduksi

Substrat (%) (b/v)	Serapan			Serapan Rata-rata
	I	II	III	
1,0	0,3273	0,3261	0,3259	0,3264

Tabel L.9.2. Data Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase

Substrat (%) (b/v)	Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase (Unit)			Aktivitas Rata-rata (Unit)
	I	II	III	
1,0	15,1695	15,1390	15,1300	15,1462±0,6869

**Lampiran 10.**

Data Pengukuran Serapan Gula Pereduksi dari Berbagai Perlakuan dengan pengukuran menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Tabel L.10.1. Pengaruh pH terhadap Serapan Gula Pereduksi

pH	Serapan			Serapan rata-rata
	I	II	III	
5,0	0,3265	0,3319	0,3281	0,3287
6,0	0,3819	0,3957	0,3767	0,3848
7,0	0,3958	0,3842	0,4893	0,4213
<b>8,0</b>	<b>0,5467</b>	<b>0,5531</b>	<b>0,5618</b>	<b>0,5539</b>
9,0	0,5131	0,5205	0,5179	0,5172

Tabel L.10.2. Pengaruh Temperatur terhadap Serapan Gula Pereduksi

Temperatur (°C)	Serapan			Serapan rata-rata
	I	II	III	
40	0,3151	0,3246	0,3323	0,3240
50	0,3518	0,3412	0,3467	0,3465
<b>60</b>	<b>0,5217</b>	<b>0,5367</b>	<b>0,5321</b>	<b>0,5302</b>
70	0,4571	0,4688	0,4739	0,4666
80	0,3015	0,3246	0,3158	0,3140

Tabel L.10.3. Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Serapan Gula Pereduksi

Waktu Inkubasi (menit)	Serapan			Serapan rata-rata
	I	II	III	
40	0,3421	0,3557	0,3641	0,3540
45	0,4601	0,4750	0,4748	0,4650
<b>50</b>	<b>0,5243</b>	<b>0,5279</b>	<b>0,5381</b>	<b>0,5301</b>
55	0,4017	0,4281	0,4312	0,4203
60	0,3089	0,3282	0,3145	0,3172

Tabel L.10.4. Pengaruh Konsentrasi Substrat Xilan terhadap Serapan Gula Pereduksi

Konsentrasi Substrat (%) (b/v)	Serapan			Serapan rata-rata
	I	II	III	
0,1	0,2105	0,2241	0,2137	0,2161
0,5	0,3420	0,3512	0,3459	0,3464
1,0	0,4236	0,4281	0,4278	0,4265
1,5	0,5012	0,5039	0,5142	0,5064
2,0	0,5217	0,5173	0,5165	0,5185

## Lampiran 11. Pengukuran Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase

Satuan dari aktivitas enzim adalah Unit. Satu Unit adalah banyaknya  $\mu\text{g}$  gula pereduksi yang dapat dihasilkan oleh 1 mL enzim dalam waktu 1 menit. Pengukuran aktivitas enzim xilanase dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{AE} = \frac{x \cdot V \cdot fp}{p \cdot q}$$

di mana :

$\text{AE}$  = aktivitas enzim ( $\mu\text{g}/\text{mL}.\text{menit}$ )

$x$  = konsentrasi gula pereduksi ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

$V$  = volume total sampel tiap tabung (mL)

$p$  = jumlah enzim (mL)

$q$  = waktu reaksi (menit)

$fp$  = faktor pengenceran

Contoh perhitungan:

Pengukuran aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase pada pH 8,0 dengan data sebagai berikut:

Absorbansi = 0,5539

$p$  = 1 mL

$V$  = volume substrat (1 mL) + volume buffer (1 mL) + volume ekstrak kasar enzim (1 mL)

= 3 mL

$q$  = 60 menit

$$fp = \frac{\text{pengenceran 1} \times \text{pengenceran 2}}{\text{volume yang diambil}}$$

$$= \frac{10\text{mL} \times 100\text{mL}}{10\text{mL}} = 100$$

Berdasarkan kurva standar gula pereduksi diperoleh persamaan linier  $y = 0,1077x$ , sehingga:

$$0,5467 = 0,1077x$$

$$x = 5,0761 \mu\text{g/mL}$$

$$\begin{aligned} AE (\text{aktivitas enzim}) &= \frac{5,0761 \mu\text{g/mL} \times 3 \text{ mL} \times 100}{1 \text{ mL} \times 60 \text{ menit}} \\ &= 25,3805 \mu\text{g/mL.menit} \end{aligned}$$

#### Lampiran 12. Data Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase

Tabel L.12.1. Perlakuan pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim

pH	Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase (Unit)			Aktivitas rata-rata (Unit)
	I	II	III	
5,0	15,1580	15,4085	15,2320	15,2662
6,0	17,7300	18,3705	17,4885	17,8630
7,0	18,3750	17,8365	22,7160	19,6425
<b>8,0</b>	<b>25,3805</b>	<b>25,6775</b>	<b>26,0815</b>	<b>25,7150</b>
9,0	23,8205	24,1645	24,0435	24,0095

Tabel L.12.2. Perlakuan Temperatur terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim

Temperatur (°C)	Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase (Unit)			Aktivitas rata-rata (Unit)
	I	II	III	
40	14,6285	15,0695	15,4270	15,0417
50	16,3325	15,8400	16,0955	16,0893
<b>60</b>	<b>24,2200</b>	<b>24,9165</b>	<b>24,7030</b>	<b>24,6132</b>
70	21,2210	21,7640	22,0010	21,6620
80	13,9970	15,0695	14,6610	14,5758

Tabel L.12.3. Perlakuan Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim

Waktu Inkubasi (menit)	Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase (Unit)			Aktivitas rata-rata (Unit)
	I	II	III	
40	15,8820	16,5135	16,9035	16,4330
45	21,3600	22,0520	22,0425	21,8182
<b>50</b>	<b>24,3410</b>	<b>24,5080</b>	<b>24,9815</b>	<b>24,6102</b>
55	18,6490	19,8745	20,0185	19,5140
60	14,3410	15,2365	14,6005	14,7260

Tabel L.12.4. Perlakuan Konsentrasi Substrat Xilan terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim

Konsentrasi Substrat (%) (b/v)	Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase (Unit)			Aktivitas rata-rata (Unit)
	I	II	III	
0,1	9,7725	10,4040	9,9210	10,0325
0,5	15,8775	16,3045	16,0585	16,0802
1,0	19,6655	19,8745	19,8605	19,8002
1,5	23,2685	23,3935	23,8720	23,5113
2,0	24,2200	24,0160	23,9785	24,0715

### Lampiran 13. Analisis Statistika

Data aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase dianalisis menggunakan pola rancangan acak lengkap

#### a. pH

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

pH	Aktivitas			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
5,0	15,1580	15,4085	15,2320	45,7985	$15,2662 \pm 0,1287$
6,0	17,7300	18,3705	17,4885	53,5890	$17,8630 \pm 0,4558$
7,0	18,3750	17,8365	22,7160	58,9275	$19,6425 \pm 0,5781$
8,0	25,3805	25,6775	26,0815	77,1395	$25,7132 \pm 0,3518$
9,0	23,8205	24,1645	24,0435	72,0285	$24,0095 \pm 0,1745$

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

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right]}{n.p} = \frac{94545,7953}{15} = 6303,05$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK = 6541,7521 - 6303,05 = 238,7021$$

- b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK = 6526,7803 - 6303,05 = 223,7303$$

- c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 238,7021 - 223,7303 = 14,9718$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

- a. KT Perlakuan =  $\frac{JKP}{dB \text{ perlakuan}} = \frac{223,7303}{4} = 55,9325$

- b. KT Galat percobaan =  $\frac{JKG}{dB \text{ percobaan}} = \frac{14,9718}{10} = 1,4972$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{55,9325}{1,4972} = 37,3581$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,84$$

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

$$\begin{aligned} BNT_{5\%} &= t_{(\alpha/2; dB)} \times (2KTG/n)^{0.5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 1,4972/3)^{0.5} \\ &= 2,228 \times 0,999 = 2,226 \end{aligned}$$

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

FK	6303,05
JKT	238,7021
JKP	223,7303
JKG	14,9718
KTP	55,9325
KTG	1,4972
Fhitung	37,3581
Ftabel 5 %	3,84
BNT 5 %	2,226

Tabel L.13.2. Data uji BNT 5 % terhadap pengaruh pH

pH	rataan	5,0	6,0	7,0	9,0	8,0
		15,2662	17,8630	19,6425	24,0095	25,7132
5,0	15,2662	0	2,5968*	4,3763*	8,7433*	10,447*
6,0	17,8630		0	1,7795	6,1465*	7,8502*
7,0	19,6425			0	4,3670*	6,0707*
9,0	24,0095				0	1,7037
8,0	25,7132					0

Keterangan : \* berbeda nyata dengan uji BNT 5 % ( $\alpha = 0,05$ ).

### b. Temperatur

Tabel L.13.3. Penentuan  $F_{hitung}$  pada variasi temperatur

Temperatur (°C)	Aktivitas			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
40	14,6285	15,0695	15,4270	45,1250	15,0417±0,3999
50	16,3325	15,8400	16,0955	48,2680	16,0893±0,2463
60	24,2200	24,9165	24,7030	73,8395	24,6132±0,3568
70	21,2210	21,7640	22,0010	64,9860	21,6620±0,3999
80	13,9970	15,0695	14,6610	43,7275	14,5758±0,5413

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

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right]^2}{n.p} = \frac{76146,1949}{15} = 5076,4130$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK = 5319,4723 - 5076,4130 = 243,0593$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK = 5317,8705 - 5076,4130 = 241,4575$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 243,0593 - 241,4575 = 1,6018$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. KT Perlakuan =  $\frac{JKP}{dB \text{ perlakuan}} = \frac{241,4575}{4} = 60,3643$

b. KT Galat percobaan =  $\frac{JKG}{dB \text{ percobaan}} = \frac{1,6018}{10} = 0,1602$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{60,3643}{0,1602} = 376,8059$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,84$$

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

$$\begin{aligned} BNT\ 5\% &= t_{(\alpha/2; dB)} \times (2KTG/n)^{0.5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 0,1602/3)^{0.5} \\ &= 2,228 \times 0,327 = 0,7285 \end{aligned}$$

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

FK	5076,4130
JKT	243,0593
JKP	241,4575
JKG	1,6018
KTP	60,3643
KTG	0,1602
Fhitung	376,8059
Ftabel 5 %	3,84
BNT 5 %	0,7285

Tabel L.13.4. Data uji BNT 5 % terhadap pengaruh temperatur

Temperatur (°C)	Rata-rata	80	40	50	70	60
		14,5758	15,0417	16,0893	21,6620	24,6132
80	14,5758	0	0,4659	1,5135*	7,0862*	10,0374*
40	15,0417			0	1,0476*	6,6203*
50	16,0893				0	5,5727*
70	21,6620					0
60	24,6132					0

Keterangan : \* berbeda nyata dengan uji BNT 5 % ( $\alpha = 0,05$ )

### c. Waktu Inkubasi

Tabel L.13.5. Penentuan  $F_{hitung}$  pada variasi waktu inkubasi

Waktu Inkubasi (menit)	Aktivitas			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
40	15,8820	16,5135	16,9035	49,2990	$16,4330 \pm 0,8962$
45	21,3600	22,0520	22,0425	65,4545	$21,8182 \pm 0,1539$
50	24,3410	24,5080	24,9815	73,8305	$24,6102 \pm 0,5816$
55	18,6490	19,8745	20,0185	58,5420	$19,5140 \pm 0,0421$
60	14,3410	15,2365	14,6005	44,1780	$14,7260 \pm 0,5102$

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

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right]^2}{n.p} = \frac{84858,0204}{15} = 5657,2014$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK = 5850,7868 - 5657,2014 = 193,5854$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK = 5848,162 - 5657,2014 = 190,9606$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 193,5854 - 190,9606 = 2,6248$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. KT Perlakuan =  $\frac{JKP}{d_{\text{Perlakuan}}} = \frac{190,9606}{4} = 47,7401$

b. KT Galat percobaan =  $\frac{JKG}{d_{\text{percobaan}}} = \frac{2,6248}{10} = 0,262$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{47,7401}{0,2625} = 181,867$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 4, 10) = 3,84$$

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

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 0,262/3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 0,4179 = 0,9311 \end{aligned}$$

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

FK	5657,2014
JKT	193,5854
JKP	190,9606
JKG	2,6248
KTP	47,7401
KTG	0,262
Fhitung	181,867
Ftabel 5 %	3,84
BNT 5 %	0,9311

Tabel L.13.6. Data uji BNT 5 % terhadap pengaruh waktu inkubasi

Waktu Inkubasi (menit)	Rataan	60	40	55	45	50
		14,7260	16,4330	19,5140	21,8182	24,6102
60	14,7260	0	1,7070*	4,7880*	7,0922*	9,8842*
40	16,4330			0	3,0810*	5,3852*
55	19,5140				0	2,3042*
45	21,8182					0
50	24,6102					0

Keterangan : \* berbeda nyata dengan uji BNT 5 % ( $\alpha = 0,05$ )

#### Lampiran 14. Penentuan Nilai $V_{maks}$ dan $K_M$

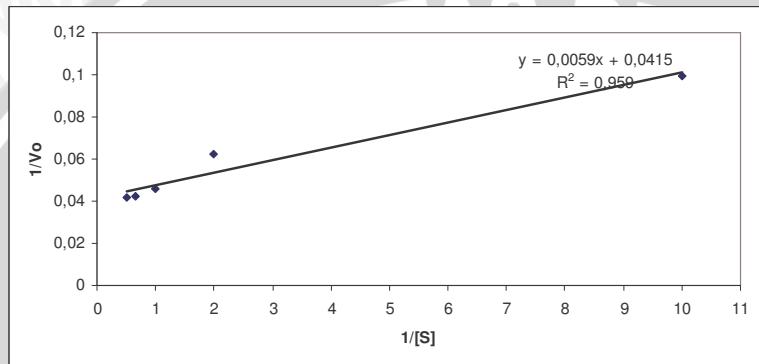
Nilai  $V_{maks}$  dan  $K_M$  ditentukan dengan membuat kurva hubungan antara  $1/[S]$  terhadap  $1/V$  ( Gambar 4.6) dari konsentrasi substrat xilan terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase.

Tabel L.12.4. Perlakuan Konsentrasi Substrat Xilan terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim

Konsentrasi Substrat (%) (b/v)	Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase (Unit)			Aktivitas rata-rata (Unit)
	I	II	III	
0,1	10,4858	9,0386	10,5732	10,0325
0,5	14,8932	16,9220	16,4300	16,0817
1,0	20,1200	20,0509	19,2301	19,8003
1,5	22,8957	24,1599	23,4736	23,5097
2,0	24,1549	23,9351	24,1244	24,0715

1/[S]	1/Aktivitas rata-rata (Unit) (1/V <sub>o</sub> )
10	0,0997
2	0,0622
1	0,046
0,6667	0,0425
0,5	0,0415

Dari data tersebut dibuat grafik hubungan antara 1/[S] dengan 1/V<sub>o</sub> sehingga diperoleh grafik seperti gambar dibawah ini (Gambar 4.6) :



Persamaan linier dari grafik diatas yaitu  $y = ax + b$ ,  $y = 0,0059x + 0,0415$  dengan nilai  $a$  sebagai  $K_M/V_m$  dan nilai  $b$  merupakan  $1/V_m$ . Sehingga untuk menentukan nilai  $V_m$  dapat diketahui dengan cara :

$$b = 1/V_m$$

$$0,0415 = 1/V_m \rightarrow V_m = 24,10$$

Sedangkan nilai  $K_M$  dapat dihitung dengan cara :

$$a = K_M/V_m \rightarrow 0,0059 = K_M/24,10$$

$$K_M = 0,14$$