PENGARUH SUMBER XILAN TERHADAP AKTIVITAS SPESIFIK XILANASE DARI *Trichoderma viride*

SKRIPSI

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

oleh:
DIAN MAYASARI
0410923012-92

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH SUMBER XILAN TERHADAP AKTIVITAS SPESIFIK XILANASE DARI *Trichoderma viride*

oleh:
DIAN MAYASARI
0410923012-92

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

Pembimbing I	Pembimbing II
Drs. Sutrisno, Msi	**Dra. Anna Roosdiana, M.App,Sc**
NIP. 131 879 407	**Nip. 132 000 070**

Mengetahui,
Ketua jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sasangka Prasetyawan. MS
NIP. 131 653 134

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dian Mayasari
NIM : 0410923012
Jurusan : Kimia
Penulis skripsi berjudul:

"Pengaruh Sumber Xilan terhadap Aktivitas Spesifik Xilanase dari *Trichoderma viride* "

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Januari 2009
Yang menyatakan,

(Dian Mayasari)
NIM. 0410923012-92

PENGARUH SUMBER XILAN TERHADAP AKTIVITAS SPESIFIK XILANASE DARI *Trichoderma viride*

ABSTRAK

Telah dipelajari pengaruh sumber xilan terhadap aktivitas spesifik xilanase dari *Trichoderma viride*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil aktivitas dan aktivitas spesifik xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada berbagai sumber xilan (kulit pisang, kulit apel, kulit jagung, kulit melon dan kulit kedelai) serta mengetahui parameter kinetika reaksi enzimatis ekstrak kasar xilanase (Vm dan K_M) dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan yang memberikan aktivitas spesifik enzim tertinggi. Ekstrak kasar xilanase diisolasi dari *Trichoderma viride* pada saat mencapai fase stasioner (setelah jam ke-60). Aktivitas xilanase ditunjukkan oleh banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan selama reaksi hidrolisis pada kondisi optimum yaitu pada temperatur 60°C, pH 5 dan waktu inkubasi 55 menit. Penentuan kadar protein dan aktivitas xilanase dilakukan dengan metode spektrofotometri visibel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit jagung memberikan aktivitas dan aktivitas spesifik ekstrak kasar xilanase tertinggi dibandingkan dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan sumber xilan lainnya, yaitu berturut-turut sebesar (17,1896 ± 0,1167) Unit dan (14,0195 ± 0,7876) U/mg protein. Parameter kinetika yang dihasilkan adalah Vm sebesar 17,8572 µg/mL.menit dan K_M sebesar 0,04 %. Berdasarkan analisa statistik pada uji BNT 5%, berbagai sumber xilan berpengaruh secara nyata terhadap kadar protein, aktivitas, dan aktivitas spesifik xilanase.

THE EFFECT OF XYLAN SOURCES TO XYLANASE SPECIFIC ACTIVITY FROM *Trichoderma viride*

ABSTRACT

The effect of xylan sources to xylanase specific activity from *Trichoderma viride* has been conducted. The aim of this research was to learn about the activity and specific activity profile of xylanase from *Trichoderma viride* which is grown at different xylan sources (banana peel, apple peel, corn peel, melon peel and outer skin of soybean grain) and the kinetic parameter enzymatic reaction xylanase of xylan sources. Crude xylanase was isolated from *Trichoderma viride* on the stasioner fase (after 60 hours). Xylanase activity showed by the amount of reducing sugar through hydrolysis reaction at the optimum condition of temperature 60°C, pH 5 and incubation period 55 minutes. Protein concentration and xylanase activity were determined by visible spectrophotometry. The highest activity and specific activity were resulted on crude xylanase from *Trichoderma viride* which is grown in corn peel xilan sources with the value of (17.1896 ± 0.1167) Unit and (14.0195 ± 0.7876) U/mg protein respectively. Where as the resulted kinetic parameter of Vmaks and K_M were 17.8572 µg/mL.menit and 0.04 % respectively. Statistic analysis using BNT-Test with α=0.05 showed that xylan sources gift significan result on the crude xylanase protein concentration, activity, specific activity.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat, karunia dan ridloNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**PENGARUH SUMBER XILAN TERHADAP AKTIVITAS SPESIFIK XILANASE DARI *Trichoderma viride***" ini dengan baik.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa terselesaikannya tugas akhir ini tidak lepas dari dukungan, bantuan, serta bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya terutama kepada:

1. Allah SWT atas segalanya.
2. Keluargaku di rumah, atas cinta, doa, semangat dan dukungan baik moral maupun material yang telah diberikan.
3. Drs. Sutrisno, MSi sebagai Dosen Pembimbing I dan Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc. sebagai Dosen Pembimbing II, atas bimbingan, nasihat, arahan, kritik dan saran membangun serta dukungan dalam penyelesaian skripsi ini.
4. Dr.Ir. Chasan Bisri., sebagai Dosen Pembimbing Akademik atas nasehat dan bimbingan selama masa kuliah.
5. Drs. M.Misbah Khunur, MSi., Dr. Diah Mardiana, MS., Qonitah Fardiyah, SSi., MSi., dan Drs. Warsito MS., sebagai Dosen Penguji atas kritik dan saran dalam perbaikan skripsi ini.
6. M. Farid Rahman, SSi. MSi., sebagai Ketua Jurusan Kimia dan segenap Dosen dan Staff Jurusan Kimia yang telah membantu terfasilitasinya penyelesaian skripsi.
7. Semua pihak yang telah memberikan bantuan untuk menyelesaikan skripsi ini.

Skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan dan kesalahan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik membangun untuk kesempurnaan skripsi ini.

Malang, Januari 2009

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL…….. i
HALAMAN PENGESAHAN……..... ii
HALAMAN PERNYATAAN……..... iii
ABSTRAK…….. iv
ABSTRACT……..... v
KATA PENGANTAR……..... vii
DAFTAR ISI…….. viii
DAFTAR TABEL…….. xi
DAFTAR GAMBAR……..... xiii
DAFTAR LAMPIRAN…….. xiv

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang……..... 1
1.2. Perumusan Masalah……..... 3
1.3. Batasan Masalah……..... 3
1.4. Tujuan Penelitian……..... 3
1.5. Manfaat Penelitian……..... 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Xilan……..... 5
2.2. Sumber Karbon..... 5
2.3. Sumber Xilan…… 6
2.3.1. Kulit Jagung……. 6
2.3.2. Kulit Melon…….…….. 6
2.3.3. Kulit Pisang…..... 7
2.3.4. Kulit Kedelai…….. 7
2.3.5. Kulit Apel…….. 8
2.4. Sumber Nitrogen……..……. 9
2.5. Trichoderma viride..... 9
2.6. Fermentasi..... 10
2.7. Enzim..... 10
2.7.1. Isolasi Xilanase……..….. 11
2.7.2. Xilanase..... 13

2.8. Penentuan Kadar Gula Pereduksi dengan Metode Nelson-Somogyi……..... 14
2.9. Penentuan Kadar Protein Xilanase..... 15
2.10. Laju Reaksi Enzimatis……. 16
2.10.1. Persamaan Michaelis-Menten..... 16
2.10.2. Persamaan Lineweaver-Burk…….. 17
2.11. Hipotesis…….. 18

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian..... 19
3.2. Bahan dan Alat Penelitian
3.2.1. Bahan Penelitian..... 19
3.2.2. Bahan kimia…….. 19
3.2.3. Alat penelitian……..... 19
3.3. Metode Penelitian…… 20
3.4. Prosedur kerja
3.4.1. Pembuatan Tepung kulit pisang, kulit kedelai, kulit melon, kulit apel dan kulit jagung..... 21
3.4.2. Pembuatan Media Padat…… 21
3.4.3. Pembuatan Media Cair…….. 21
3.4.4. Pananambiakan *Trichoderma viride*..... 22
3.4.5. Pembuatan inokulum…… 22
3.4.6. Produksi Enzim……. 22
3.4.7. Isolasi Enzim…….. 22
3.4.8. Tahapan Analisa Kadar gula Pereduksi
a. Penentuan panjang gelombang maksimum Nelson-Somogyi……. 23
b. Pembuatan Kurva Standar Gula Pereduksi 23
c. Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase..... 23
3.4.9. Uji kadar Gula Pereduksi Dengan Metode Nelson-Somogyi..... 24
3.4.10. Pengukuran Aktivitas Xilanase..... 24
3.4.11. Pembuatan Kurva Baku BSA (Bovin Serum Albumin..... 25
3.4.12. Penentuan Kadar Protein..... 25
3.4.13. Penentuan Vm dan Km..... 25

3.4.14. Analisis Data..... 26

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase dari Trichoderma viride..... 27
4.2. Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase..... 28
4.3. Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Xilanase..... 32
4.4.Penentuan Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Xilanase..... 33
4.5. Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis..... 35

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan…….. 39
5.2. Saran…… 39

DAFTAR PUSTAKA..... 40

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1. Komposisi sumber xilan kulit jagung…….. 6
Tabel 2.2. Komposisi sumber xilan kulit pisang..... 7
Tabel 2.3. Komposisi sumber xilan kulit ari kedelai..... 8
Tabel L.6. Absorbansi Larutan Standar Glukosa 40 ppm pada λ : 600 – 800 nm..... 61
Tabel L.7. Absorbansi Larutan Standar Glukosa pada λ : 745 nm 62
Tabel L.8. Absorbansi Larutan Standar BSA 1000 ppm pada λ : 500 – 600 nm..... 63
Tabel L.9. Absorbansi Bovin Serum Albumin (BSA) pada λ : 550 nm..... 64
Tabel L.10.1. Absorbansi Gula pereduksi…….. 65
Tabel L.10.2. Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase..... 65
Tabel L.10.3. Absorbansi Protein..... 66
Tabel L.10.4 Kadar Protein..... 66
Tabel L.10.5. Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Xilanase..... 67
Tabel L.11.1. Absorbansi Gula Pereduksi terhadap Konsentrasi Substrat Xilan..... 68
Tabel L.11.2. Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase terhadap Konsentrasi Substrat Xilan..... 68
Tabel L.13.1. Penentuan F_{hitung} pada Variasi Sumber Xilan terhadap Aktivitas Xilanase..... 71
Tabel L.13.2. Data uji BNT 5 % Aktivitas Xilanase terhadap Pengaruh Sumber Xilan…… 73
Tabel L.13.3. Penentuan F_{hitung} pada Variasi Sumber Xilan terhadap Kadar Protein Ekstrak Kasar xilanase... 74
Tabel L.13.4. Data uji BNT 5 % Kadar Protein Ekstrak Kasar Xilanase terhadap Pengaruh Sumber Xilan..... 76
Tabel L.13.5. Penentuan F_{hitung} pada Variasi Sumber Xilan terhadap Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Xilanase..... 77
Tabel L.13.6. Data uji BNT 5 % Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Xilanase terhadap Pengaruh Sumber Xilan 79

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1.	Struktur Bangun Xilan.....	5
Gambar 2.2.	Kurva Pertumbuhan Kapang *Trichoderma viride*……..	13
Gambar 2.3.	Pembentukan Kompleks Ungu Protein-Biuret…….....	16
Gambar 2.4.	Grafik hubungan antara konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzimatik.....	17
Gambar 2.5.	Grafik Lineweaver-Burk (hubungan antara 1/[S] dengan $1/V_o$).....	18
Gambar 4.1.	Mekanisme reaksi enzimatis antara xilanase dengan substrat xilan……	30
Gambar 4.2.	Grafik Aktivitas, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Xilanase……...	34
Gambar 4.3.	Kurva hubungan konsentrasi substrat xilan terhadap aktivitas ekstrak kasar xilanase…..	36
Gambar 4.4.	Kurva hubungan 1/Vo dengan 1/[S]……..	37
Gambar L.6.	Spektrum Absorbsi Larutan Standar Glukosa 40 ppm pada λ = 600 – 800 nm.....	61
Gambar L.7.	Kurva Standar Gula Pereduksi Larutan Standar Glukosa pada λ : 745 nm…….	62
Gambar L.8.	Kurva Penentuan Panjang Gelombang Maksimum BSA.....	63
Gambar L.9.	Kurva Baku Bovin Serum Albumin (BSA)...	64

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1.	Komposisi media pertumbuhan……	47
Lampiran 2.	Preparasi Larutan……..	48
Lampiran 3.	Perhitungan Harga pH buffer asetat 0,2 M…...	51
Lampiran 4.	Tahapan Kerja…….....	52
Lampiran 5.	Skema Kerja.....	53
Lampiran 6.	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Glukosa.....	61
Lampiran 7.	Pembuatan Kurva Standar Glukosa.....	62
Lampiran 8.	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum BSA.....	63
Lampiran 9.	Kurva Baku Bovin Serum Albumin (BSA).....	64
Lampiran 10.	Penentuan Aktivitas, kadar protein dan aktivitas spesifik Ekstrak Kasar Xilanase.....	65
Lampiran 11.	Data Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase terhadap Pengaruh Konsentrasi Substrat Xilan.....	68
Lampiran 12.	Perhitungan.....	69
Lampiran 13.	Analisis Statistika.....	71
Lampiran 14.	Surat Keterangan Identifikasi Sumber Xilan....	80

Assalamu' Alaikum wr.wb.
Ilmu adalah sebaik-baik perbendaharaan dan yang paling indah. Ia ringan dibawa, namun besar manfaatnya. Ditengah-tengah orang banyak ia indah, sedangkan dalam kesendirian ia menghibur.
Ilmu adalah kekuatan. Barangsiapa yang mendapatkannya, dia akan menyerang dengannya dan barangsiapa yang tidak mendapatkannya, dialah yang akan menyerang.
Akal tidak akan pernah membahayakan pemiliknya selamanya, sedangkan ilmu tanpa akal akana membahayakan pemiliknya. Wahai pembawa ilmu., apakah kalian membawanya?
Sesungguhnya ilmu hanyalah bagi yang mengetahuinya, kemudian dia mnegamalkannya dana perbuatannya asesuai dengan ilmunya.
Serendah rendahn ya ilmu adalah yang berhenti dilidah, dan yang palinmg tinggi adalah yang ytampak dianggota-anggota badan.

BAB I
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Xilanase merupakan biokatalis untuk menghidrolisis substrat xilan (hemiselulosa) menjadi gula pereduksi (Schlegel dan Schmidt, 1994). Xilanase dapat dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme seperti: *Trichoderma viride, Bacillus, Cryptococcus, Aspergillus, Penicillium, Aureo-basidium, Fusarium, Rhizomucor, Humicola* (Haltrich, *et al*., 1996). *Trichoderma viride* mempunyai kelebihan dibandingkan dengan jenis kapang lainnya, yaitu dapat tumbuh cepat di berbagai substrat.

Pemanfaatan xilanase dalam dunia industri memiliki peranan yang sangat penting, misalnya pada pembuatan kertas, pembuatan gula xilosa, produksi makanan dan minuman, produksi pakan ternak, peningkatan kualitas roti, penyerap air dan produksi biofuel (Dashek, 1997).

Berdasarkan pembentukannya, xilanase merupakan enzim induktif yaitu enzim yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat yang berfungsi sebagai induser, dalam hal ini adalah xilan (Widjaja dkk, 1994). Xilan merupakan polimer xilosa yang berikatan β-1,4 dengan jumlah monomer 30-100 unit (Schlegel dan Schmidt, 1994).

Menurut Richana (2002), selama ini produksi xilanase dengan menggunakan mikroba sebagai sumber karbon dalam media fermentasi adalah xilan murni. Penggunaan xilan murni dalam poduksi xilanase skala besar terlalu mahal. Padahal menurut Trismilah dkk (2006) media fermentasi memegang peranan penting karena untuk skala besar diperlukan media fermentasi yang murah dan mudah diperoleh serta dapat menghasilkan enzim sesuai dengan yang diharapkan.

Park *et al* (1992), telah melakukan penelitian alternatif sumber karbon (xilan), yaitu jerami padi (Richana (2002). Kandungan xilan dalam jerami padi sebesar 6,6 % (Muller, 1978 *dalam* Pearce, 1983). Aktivitas spesifik xilanase yang dihasilkan sebesar 1,65 U/mg protein. Sedangkan Riyanto *et al* (2000), memanfaatkan dedak padi

sebagai sumber xilan. Dedak padi memiliki kandungan xilan sebesar 9,5-16,9% Aktivitas spesifik xilanase yang dihasilkan sebesar 7,44 U/mg protein

Penelitian Richana dan Lestina (2002), menunjukkan bahwa xilanase dari isolat bakteri *Bacillus pumilus* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit ari kedelai memiliki aktivitas spesifik enzim sebesar 612,1 U/mg. Pada penelitian Isil dan Aksoz (2005), xilanase yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma harzianum 1073 D3* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit melon memiliki aktivitas spesifik enzim sebesar 26,5 U/mg. Sedangkan penelitian Richana *et al* (2004) menggunakan sumber xilan dari tongkol jagung, yang mempunyai kandungan xilan sebesar 12% (Anonimous, 2008). Aktivitas spesifik xilanase yang dihasilkan sebesar 165 U/mg protein. Kandungan xilan pada sumber xilan kulit jagung lebih besar (32%) dibandingkan dengan sumber xilan tongkol jagung, sehingga diharapkan xilanase yang dihasilkan dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit jagung memiliki aktivitas spesifik yang lebih besar dibandingkan dari bakteri *Bacillus pumilus* yang ditumbuhkan pada sumber xilan tongkol jagung.

Berdasarkan kandungan xilan yang cukup tinggi pada kulit jagung dan kulit kedelai dan berlimpahnya kulit pisang dan kulit apel serta adanya penelitian yang memanfaatkan kulit melon dalam memproduksi xilanase maka limbah kulit-kulit tersebut diharapkan dapat digunakan sebagai sumber xilan dalam memproduksi xilanase oleh *Trichoderma viride*.

Tingkat kemurnian relatif dan kemampuan katalitik xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada berbagai sumber xilan terhadap substrat xilan ditunjukkan oleh besarnya aktivitas spesifiknya.

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) merupakan konsentrasi substrat pada saat kecepatan reaksi telah mencapai ½ kecepatan maksimum. K_M digunakan untuk memperkirakan konsentrasi substrat yang diperlukan untuk reaksi enzimatis dan untuk menentukan apakah enzim yang dihasilkan dari sumber yang berbeda itu identik atau tidak. Bila enzim yang diisolasi dari sumber berbeda mempunyai nilai K_M sama, maka enzim tersebut identik. Sedangkan V_m merupakan kecepatan reaksi bila enzim telah jenuh dengan substrat.

Dengan mengetahui nilai K_M dan V_m suatu enzim maka dapat dilakukan optimalisasi penggunaan enzim tersebut sebagai biokatalisator reaksi pemecahan substrat menjadi produk.

Dengan demikian, xilanase yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma viride* dengan sumber xilan kulit pisang, kulit kedelai, kulit apel, kulit melon dan kulit jagung perlu diteliti aktivitas spesifik enzimnya dan xilanase yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi perlu ditentukan kinetika reaksi enzimatisnya.

1.2. Perumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Sumber xilan manakah yang digunakan sebagai media pertumbuhan *Trichoderma viride* dalam memproduksi xilanase dengan aktivitas spesifik tertinggi?
2. Berapakah parameter kinetika reaksi enzimatis ekstrak kasar xilanase hasil isolasi dari *Trichoderma viride* yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi?

1.3. Batasan Masalah

1 Aktivitas enzim ditentukan pada kodisi optimum yaitu pada suhu 60°C, pH 5 dan waktu inkubasi 55 menit (Widyasari,2007)

2 Sumber xilan yang digunakan bagi pertumbuhan *Trichoderma viride* dalam memproduksi xilanase yaitu kulit pisang, kulit kedelai, kulit apel, kulit melon dan kulit jagung

1.4. Tujuan Penelitian

1 Mengetahui sumber xilan yang digunakan sebagai media pertumbuhan *Trichoderma viride* dalam memproduksi xilanase dengan aktivitas spesifik tertinggi.

2 Menentukan parameter kinetika reaksi enzimatis ekstrak kasar xilanase hasil isolasi dari *Trichoderma viride* yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi

1.5. Manfaat Penelitian

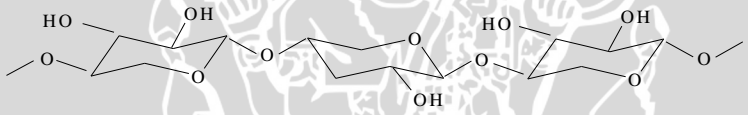
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pemanfaatan kulit kedelai, kulit pisang, kulit apel, kulit jagung sebagai induser untuk produksi xilanase, dan dapat memberikan informasi sumber xilan yang memberikan aktivitas spesifik tertinggi serta memberikan informasi tentang parameter kinetika reaksi enzimatisnya

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Xilan

Bahan dinding sel polisakarida yang terbanyak kedua setelah selulosa ialah xilan. Ada beberapa jenis xilan yang terdapat dalam hampir semua tumbuhan tingkat tinggi dan terdapat khusus bersama-sama lignin. Satuan dasar struktur xilan ialah D-xilosa, tetapi bergantung pada sumber tumbuhan xilan dapat bercabang atau tidak bercabang dan dapat mengandung atau tidak mengandung satuan tambahan seperti L-arabinosa atau asam D-glukonat (Robinson, 1995).

Xilan tergolong karbohidrat disebut juga sebagai hemiselulosa. Rantai xilan terdiri dari β-D-xilosa yang bersambungan secara 1,4-glikosidik (Gambar 2.1). Xilan larut dalam pelarut polar dan cukup stabil hingga temperatur 180 ^{o}C (Schlegel dan Schmidt, 1994).



Gambar 2.1. Struktur bangun xilan

Xilan merupakan salah satu karbohidrat yang paling luas tersebar 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, 1994).

2.2. Sumber karbon

Senyawa karbon termasuk bahan makanan cadangan di dalam sel. Hasil oksidasi dari senyawa karbon digunakan sebagai sumber energi. Sumber karbon di dapat dari karbohidrat yaitu monosakarida, disakarida, trisakarida dan polisakarida (Nurwanto dan abas, 1996).

2.3. Sumber Xilan

2.3.1. Kulit 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)

Kulit 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 menghasilkan 450 gram kulit jagung atau 45 % kulit jagung.

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

Tabel 2.1 Komposisi sumber xilan kulit jagung

Komponen	Kandungan (%)
Serat kasar	38,76
Selulosa	38
Hemiselulosa	32
Lignin	20
Abu	4,47
Kalium	0,1
Nitrogen	0,5-6

Besarnya kandungan hemiselulosa pada kulit jagung berpotensi sebagai sumber xilan dalam produksi xilanase.

2.3.2. Kulit Melon

Melon merupakan 'satu keluarga' dengan labu dan mentimun. Daging buah ini tebal dengan biji-biji memenuhi rongga di bagian tengahnya. Melon berasal dari Timur Tengah.

Pada penelitian Isil dan Aksoz (2005), xilanase yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma harzianum 1073 D3* dari kulit melon memiliki aktivitas spesifik enzim sebesar 26,5 U/mg.

2.3.3. Kulit Pisang

Pisang adalah tanaman buah berupa herba yang berasal dari kawasan di Asia Tenggara (termasuk Indonesia). Tanaman ini kemudian menyebar ke Afrika (Madagaskar), Amerika Selatan dan Tengah (Via,2008). Pisang termasuk tanaman serba guna karena semua bagian tanamannya, mulai dari bonggol (umbi batang pisang), batang, bunga, buah, sampai kulit buahnya dapat dimanfaatkan. (Fitriyani,2006). Secara kuantitas terjadi peningkatan produksi pertahunnya mencapai 7,23 %, kulit pisang tersebut yang dihasilkan mencapai 2,8 ton (Notodiamedjo, 2003).

Menurut Tarmansyah (2007) dan Departemen Perindustrian dan Perdagangan (2003), kandungan xilan dari sumber xilan kulit pisang sebagai berikut :

Tabel 2.2 Komposisi sumber xilan kulit pisang.

Komponen	Kandungan (%)
Karbohidrat	18,50
Lemak	2,11
Protein	0,32
Kalsium	715,00 mg/100g
Fosfor	117,00 mg/100g
Besi	1,6 mg/100g
Vitamin B	0,12 mg/100g
Vitamin C	17,5 mg/100g
Selulosa	60-65
Hemiselulosa	6-8
Lignin	5-10

2.3.4. Kulit Kedelai

Kedelai merupakan hasil pertanian yang telah dimanfaatkan untuk memenuhi kebutuhan industri dan pangan. Secara umum penggunaan dan pemanfaatan kedelai terbatas pada biji saja, sedangkan limbah di antaranya kulit arinya belum banyak di manfaatkan. Limbah kulit ari kedelai secara kimiawi banyak mengandung lignin, hemiselulosa dan selulosa yang sering di sebut sebagai limbah lignoselulolik yang dapat dimanfaatkan dalam produksi xilanase skala industri sebagai

sumber karbon atau substrat, murah dan mudah didapat (Richana dan Lestina (2002).

Tabel 2.3. Komposisi sumber xilan kulit ari kedelai (Anonimous, 2008)[a]:

Komponen	Kandungan (%)
Selulosa	42
Hemiselulosa	16
Lignin	2
Protein kasar	11
Lemak kasar	1,9
Abu	4,6
Adenin Difosfat	45

Memperlihatkan hal tersebut berarti kulit ari kedelai berpotensi untuk dijadikan sumber bahan baku produk-produk yang memerlukan bahan berkadar hemiselulosa tinggi salah satunya adalah produksi xilanase.

2.3.5. Kulit Apel

Apel merupakan produk buah-buahan unggulan kota Malang Jawa Timur. Produksi apel di Jawa Timur menurut data biro pusat statistik cenderung meningkat. Permintaan komoditas ini pada 1998-2000 rata-rata 2,3 ton tiap tahunnya dengan peningkatan rata-rata 13,4% pertahunnya Saat ini, produksi apel Kota Batu sekitar 20 ton/ha/panen dari 2.500 ha lahan. Pada tahun 2007 ada peningkatan produktivitas apel, dari 10-15 ton/ha menjadi 18-20 ton/ha (Junaedi dan Cahyono,2008).

Salah satu perusahaan pengolahan keripik apel yaitu PT. Agrijaya Indotirta, Malang. Setiap harinya PT.Agrijaya Indotirta menghasilkan limbah kulit apel sekitar 2-3 ton (Menristek, 2006). Limbah kulit apel belum termanfaatkan, sehingga perlu adanya terobosan pemanfaatan limbah tersebut sebagai sumber xilan dalam produksi xilanase. Menurut Warner (2007), dalam 104,87 kg apel menghasilkan 10,89 kg kulit apel atau 10,4 % kulit apel.

2.4. Sumber Nitrogen

Senyawa nitrogen digunakan sebagai nutrisi cadangan apabila senyawa karbon dalam media mulai menipis. Pada umumnya sebagai sumber nitrogen digunakan garam amonium, urea, ekstrak khamir, dan pepton (Richana dan Lestina, 2002).

2.5. *Trichoderma viride*

Menurut Haltrich *et al*, (1996), xilanase dapat dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme yaitu bakteri, ragi dan jamur seperti *Trichoderma viride, Bacillus, Cryptococcus, Aspergillus, Penicillium, Aureo-basidium, Fusarium, Rhizomucor, Humicola, Talaromyces* dan lebih banyak lagi.

Trichoderma dalam pengendalian hayati memiliki beberapa keuntungan yaitu (Djafaruddin, 2000):

a. dapat ditemukan pada berbagai tempat
b. dapat tumbuh cepat diberbagai substrat
c. kisaran parasitismenya terhadap patogen tumbuhan sangat luas
d. jarang bersifat patogen pada tumbuhan tingkat tinggi
e. berkemampuan tinggi dalam berkompetisi memperebutkan makanan dan ruang (tempat)
f. dapat bekerja sebagai mikoparasi
g. menghasilkan antibiotik enzim yang dapat menyebabkan rusaknya hifa berbagai kapang patogen tanaman.

Klasifikasi *Trichoderma viride* menurut Alexopoulos dan Mins (1979) sebagai berikut:

Divisio	: Mycota
Subdivisio	: Deuteromycotina
Classis	: Deuteromycetes
Subclassis	: Hyphomycetidae
Ordo	: Moniliales
Famili	: Moniliaceae
Genus	: *Trichoderma*
Species	: *Trichoderma viride*

Trichoderma viride banyak ditemukan pada kulit pohon, aktif dalam proses amonifikasi dan dekomposisi selulosa dan hemiselulosa (Pelezar and Reid, 1965).

Koloni *Trichoderma viride* dalam media agar, tumbuh dengan cepat. Pada awalnya koloni mempunyai permukaan yang halus dan berwarna putih bening, kemudian koloni menjadi berkas-berkas yang rapat, berwarna hijau atau putih (Rifai, 1969).

2.6. Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroba. Fermentasi dapat dilakukan dengan 2 metode yaitu metode kultur permukaan dan metode kultur terendam (submerged). Fermentasi kultur permukaan mengunakan media padat atau semi padat dan media cair sedangkan fermentasi kultur terendam menggunakan media cair dalam bioreaktor atau fermantor (Rachman, 1992).

Media fermentasi yang baik menjadi salah satu faktor yang menentukan keberhasilan dalam proses fermentasi. Secara umum kondisi optimal untuk produksi enzim adalah kecukupan aerasi untuk mikroba yang aerobik, senyawa sebagai induser untuk enzim indusibel, ion logam sebagai kofaktor enzim, tersedianya senyawa faktor pertumbuhan dan konsentrasi optimum sumber karbon yang diperlukan untuk sintesa (Rahayu, 1990).

2.7. Enzim

Enzim adalah molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap (Richana dan Lestina, 2002).

International Union of Biochemistry (IUB) mengklasifikasikan enzim menjadi enam golongan berdasarkan jenis reaksinya, yaitu (Murray, dkk, 2006):

(1) Oksidoreduktase, kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi
(2) Transferase, kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi pemindahan gugus fungsi
(3) Hidrolase, kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis
(4) Liase, kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi pelepasan gugus

(5) Isomerase, kelompok enzim yang mengkatalisis geometri atau perubahan struktur
(6) Ligase, kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi penggabungan dua senyawa disertai peruraian molekul ATP.

Enzim memiliki beberapa sifat khusus. Pertama, kecepatan reaksi yang dikatalisis secara enzimatis sangat tinggi (peningkatan kecepatan umumnya sampai 10^6 kali). Kedua, berlawanan dengan katalis logam, spesifitas enzim sangat tinggi terhadap reaksi yang dikatalisis, dan produk samping sangat jarang terbentuk (Mc Kee dan Mc Kee, 2003).

Enzim bekerja secara khas terhadap substrat tertentu. Agar enzim dapat bekerja pada suatu substrat, maka harus 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)

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

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.

Menurut Lehninger (1997), dalam melakukan aktivitasnya untuk mengkatalisis suatu reaksi, kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: pH, Temperatur, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, dan kofaktor.

2.7.1. Isolasi Xilanase

Enzim dapat diisolasi dari hewan, tanaman maupun mikroorganisme dengan menggunakan beberapa metode antara lain: metode ekstraksi, presipitasi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi dan kromatografi (Rahman, 1992). Proses isolasi enzim mengandung

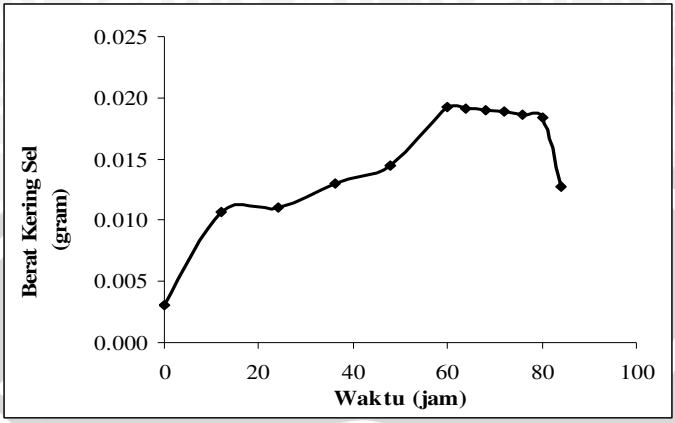
pengertian pelepasan enzim dari sel yang dapat dilakukan secara mekanik, fisis, kimiawi dan enzimatis melalui penghancuran membran atau dinding sel. Setelah penghancuran sel, untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim, dilakukan sentrifugasi guna memisahkan enzim dari senyawa-senyawa yang tidak larut, juga 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 penyangga (buffer) untuk mempertahankan kestabilan enzim. Enzim akan berada pada lapisan air (supernatan) (Cooper, 1977). Hasil isolasi enzim kemungkinan masih bercampur dengan senyawa lain disebut *crude enzyme* (Winarno,1980)

Isolasi xilanase dalam penelitian ini dilakukan pada saat kapang mencapai fase stasioner (setelah jam ke-60) sesuai dengan penelitian Widyasari (2007) tentang isolasi dan karakterisasi ekstrak kasar xilanase dari *Trichoderma viride*. Penelitian ini menunjukkan bahwa pada fase stasioner adalah waktu optimum untuk produksi xilanase dari *Trichoderma viride*.

Produksi enzim sangat efektif dilakukan pada fase eksponensial karena pertumbuhan biomasa sesuai dengan perhitungan logaritma. Pada saat ini kapang sangat aktif mensintesis enzim untuk memenuhi kebutuhan hidupnya. Tahap awal sebelum mengisolasi ekstrak kasar enzim xilanase adalah membuat inokulum sampai jam ke-36 dan dilanjutkan dengan produksi enzim sampai jam ke-60 (Widyasari, 2007).

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).



Gambar 2.2. Kurva Pertumbuhan Kapang *Trichoderma viride*
(Sumber: Widyasari, 2007

2.7.2. Xilanase

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi gula pereduksi, merupakan protein dengan berat molekul antar 15.000-30.000 Dalton, aktif pada temperatur 55 ^{0}C dengan pH 9. Pada temperatur 60 ^{0}C dan pH normal, xilanase lebih stabil. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu β-xilosidase, eksoxilanase dan endoxilanase (Richana dan Lestina, 2002).

β-xilosidase, yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilo-oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Eksoxilanase mampu memutus rantai polimer xilosa pada ujung pereduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Endoxilanase mampu memutus ikatan β-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 (Richana dan Lestina, 2002).

Menurut Nakamura *et al*, (1993) adanya Ca^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+} atau Zn^{2+} (1 mM) tidak mempengaruhi aktivitas xilanase tetapi Hg^{2+} (1 mM) dapat menghambat aktivitas xilanase sedangkan menurut Damaso *et al*, (2002) adanya Ba^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+} (5 mM) dapat

menyebabkan sedikit penghambatan pada aktivitas xilanase dan pada konsentrasi yang sama Mg^{2+} dan Fe^{3+} menghambat aktivitas xilanase kira-kira sebesar 25%. Sebaliknya adanya NaCl dan urea (3-5 mM) dapat meningkatkan aktivitas xilanase.

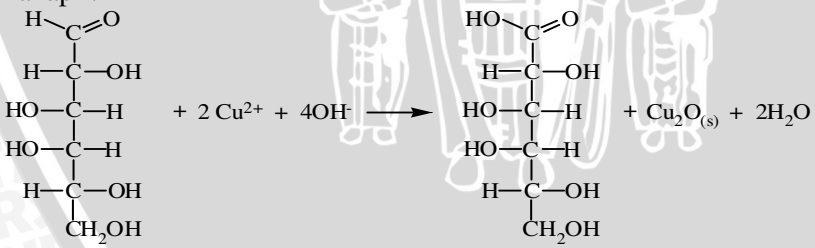
2.8. Penentuan kadar Gula Pereduksi dengan Metode Nelson-Somogyi

Penentuan aktivitas enzim biasanya dilakukan pada pH optimum dan dengan konsentrasi substrat dan kofaktor yang berlebih, sehingga laju reaksi yang terjadi merupakan orde reaksi ke-nol terhadap substrat. Laju reaksi permulaan berbanding lurus dengan konsentrasi enzim, sehingga faktor pembatas laju reaksi yang sebenarnya adalah konsentrasi enzim. Pengamatan reaksi biasanya ditentukan dengan terbentuknya hasil reaksi dengan cara kimia atau spektrofotometri (Wirahadikusumah, 2001).

Gula pereduksi adalah gula yang mampu mereduksi senyawa pengoksidasi. Konsentrasi gula dapat ditentukan dengan cara mengukur jumlah senyawa pengoksidasi yang tereduksi oleh suatu larutan gula tertentu (Lehninger, 1997).

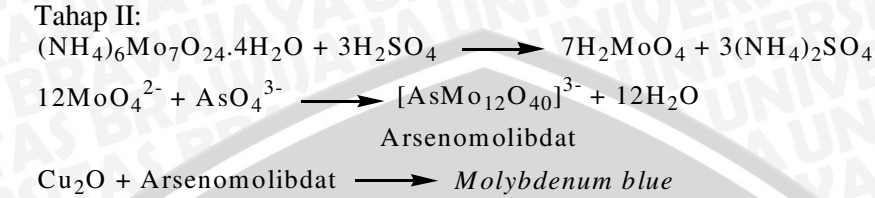
Penentuan kadar gula pereduksi dengan metode Nelson Somogyi melibatkan dua tahap reaksi, yaitu reaksi gula pereduksi dengan reagen Nelson menghasilkan produk Cu_2O berupa endapan merah bata, kemudian, reaksi kedua adalah antara Cu_2O dengan reagen arsenmolibdat (Vogel, 1994).

Tahap I:



D-Glukosa Asam D-Glukonat

Tahap II:



Kadar gula pereduksi ditentukan dengan menggunakan persamaan Lambert-Beer A = ϵ.b.c (mol/L), di mana A adalah absorbansi, ϵ adalah absorptivitas molar ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$), b adalah ketebalan larutan sampel (cm), c adalah konsentrasi (g/L) (Underwood, 1998).

2.9. Penentuan Kadar Protein Xilanase

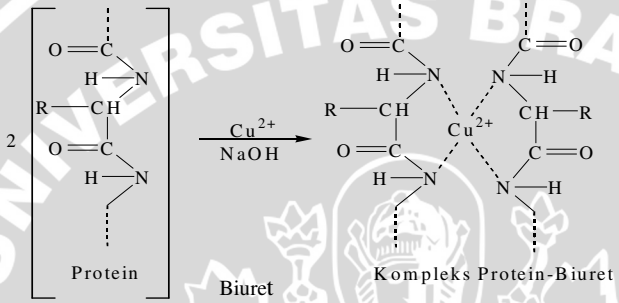
Ukuran kemurnian enzim dinyatakan sebagai aktivitas spesifik yang didefinisikan sebagai jumlah enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik dari enzim akan meningkat selama proses pemurnian dan akan mencapai nilai maksimal dan konstan jika enzim tersebut dalam keadaan murni (Lehninger, 1997). Aktivitas spesifik enzim dapat ditentukan dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar proteinnya.

Kadar protein dapat ditentukan secara kuantitatif dengan metode Biuret. Prinsip dari metode Biuret adalah pembentukan kompleks berwarna ungu oleh protein yang memiliki 2 atau lebih ikatan peptida dan garam tembaga (Cu) dalam pereaksi pada kondisi alkali. Protein standar yang digunakan adalah bovin serum albumin. Analisis dilakukan dengan membuat kurva standar absorbansi terhadap mikrogram protein, dan menentukan persamaan kurva. Konsentrasi sampel ditentukan melalui konsentrasi protein, volume sampel, dan faktor pengenceran (Caprette, 1995).

Bovin Serum Albumin (BSA) digunakan sebagai standar karena memiliki intensitas warna relatif paling tinggi bila direaksikan dengan pereaksi Biuret, sementara protein lain seperti serum globulin, albumin telur, kasein, gelatin dan zein memiliki intensitas warna yang lebih rendah (Owusu-Apenten, 2002). Selain itu, BSA memiliki kelarutan tinggi dalam air (Sorensen, dkk., 1999).

Ion Cu^{2+} bereaksi dengan protein membentuk kompleks berwarna ungu pada pH tinggi (kondisi alkali). Intensitas warnanya sebanding

dengan jumlah protein yang ada. Pereaksi Biuret dibuat dengan menggunakan $CuSO_4.5\ H_2O$ sebagai sumber ion Cu^{2+}, KNa-tartrat (garam Rochelle) sebagai penstabil ion Cu^{2+} dalam larutan dan NaOH untuk meningkatkan pH larutan. Pada pH 10-12, Cu^{2+} berinteraksi dengan 4 atom N dari protein membentuk kompleks. Berikut ini merupakan gambar pembentukan kompleks ungu protein-Biuret (Owusu-Apenten, 2002):



Gambar 2.3. Pembentukan Kompleks Ungu Protein-Biuret

Kadar protein diperoleh dengan cara pengukuran absorbansi kompleks warna ungu yang terbentuk menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm.

2.10. Laju Reaksi Enzimatik

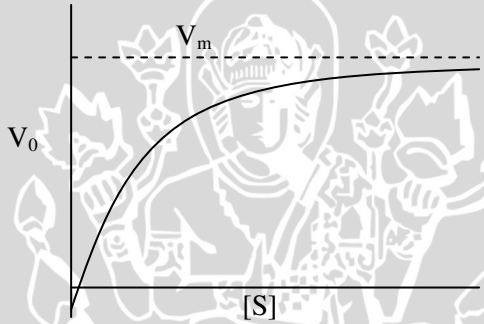
Analisis kinetika reaksi enzimatis meliputi dua parameter, yaitu kecepatan maksimum (V_m) dan tetapan Michaelis-Menten (K_M). V_m adalah batas teoritis dari laju reaksi yang akan tercapai bila kadar substrat demikian tinggi, sehingga tempat aktif selalu ditempati oleh substrat. Jadi, merupakan kecepatan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

2.10.1. Persamaan Michaelis-Menten

Persamaan Michaelis-Menten (a), merupakan suatu pernyataan mengenai hubungan kuantitatif di antara kecepatan reaksi awal (V_o), 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 2.4. 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).

$$v_o = \frac{V_m.[S]}{K_M + [S]} \qquad \text{(a)}$$



Gambar 2.4. Grafik hubungan antara konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzimatik

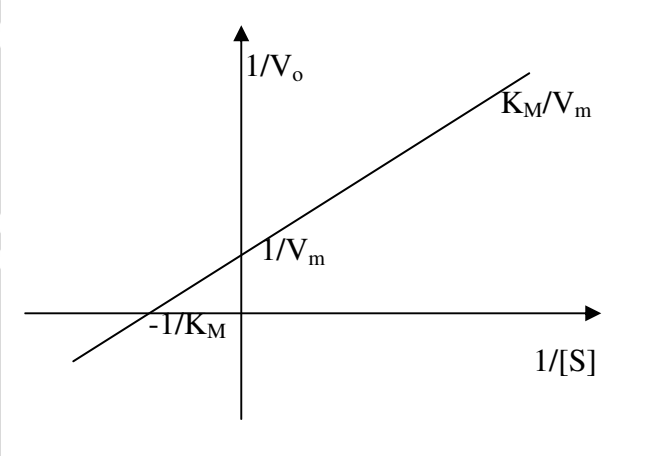
2.10.2. Persamaan Lineweaver-Burk

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 Micaelis-Menten, sehingga memberikan persamaan berikut (Lehninger, 1997):

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M + [S]}{V_m.[S]} = \frac{K_M}{V_m}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \qquad \text{(b)}$$

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 2.3). 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 2.3 (Lehniger, 1997).



Gambar 2.5. Grafik Lineweaver-Burk
(hubungan antara 1/[S] dengan $1/V_o$)

2.11. Hipotesis

1. Aktivitas spesifik xilanase sebanding dengan kandungan xilan pada berbagai sumber xilan
2. Xilanase dari sumber xilan kulit jagung mempunyai aktivitas spesifik xilanase tertinggi dalam proses hidrolisis xilan menjadi gula pereduksi.

BAB III
METODE 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 Februari - Mei 2008.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Kultur murni *Trichoderma viride* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang dan kulit kedelai yang digunakan adalah jenis Bromo, kulit pisang yang digunakan adalah jenis raja, kulit apel yang digunakan adalah jenis Manalagi, kulit melon yang digunakan adalah jenis Sky rocket dan kulit jagung yang digunakan adalah jenis Bogor DMR 4.

3.2.2. Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan memiliki derajat kemurnian pro analisa (pa), teknis dan *for microbiology*. Bahan-bahan pa antara lain: urea, $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4.7H_2O$, unsur renik ($FeSO_4$, $ZnSO_4.7H_2O$, $CoCl_2$, $MnSO_4$, NaOH, H_2SO_4, glukosa, dextrosa, CH_3COOH, CH_3COONa, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, Na_2CO_3, Na_2SO_4, $NaHCO_3$, $Na_2HAsO_4.7H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, $KMnO_4$, $NaNO_3$, KH_2PO_4, KNa-tartrat dan NaOH. Bahan-bahan *for microbiology* antara lain: pepton, tween-80, tepung agar dan bovin serum albumin (BSA) 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 (All American model 20X), vortex (Guo-Huq), 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 xilanase yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma viride* ditentukan aktivitasnya pada pH 5, temperatur 60 ^{o}C dan waktu inkubasi 55 menit dan ditentukan kadar proteinnya, masing-masing 3 kali pengulangan.

Tahapan-tahapan penelitian yang dilakukan sebagai berikut:

1. Pembuatan tepung kulit pisang, kulit kedelai, kulit melon, kulit apel dan kulit jagung.
2. Pembuatan media padat
3. Pembuatan media cair
4. Penanambiakan *Trichoderma viride*
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi enzim
7. Isolasi ekstrak kasar xilanase dari biakan *Trichoderma viride*
8. Tahapan analisa kadar gula pereduksi
   8.1. Penentuan panjang gelombang maksimum
   8.2. Pembuatan kurva baku larutan gula pereduksi
   8.3. Uji kadar gula pereduksi dengan metode Nelson Somogyi
9. Pengukuran aktivitas xilanase
10. Tahapan analisa kadar protein ekstrak kasar xilanase
    10.1. Penentuan panjang gelombang maksimum BSA (Bovin Serum Albumin)
    10.2. Pembuatan kurva baku BSA
    10.3. Uji kadar protein ekstrak kasar xilanase
11. Penentuan kadar protein xilanase
12. Penentuan V_m dan K_M xilanase hasil isolasi dari sumber xilan yang mempunyai aktivitas spesifik enzim tertinggi.

3.4. Prosedur Kerja

3.4.1. Pembuatan Tepung kulit pisang, kulit kedelai, kulit melon, kulit apel dan kulit jagung.

Masing-masing kulit disortasi kemudian dicuci selanjutnya dipotong-potong lebih kurang 2 cm dan dikeringkan. Setelah kering masing-masing kulit ditumbuk dan diayak dengan ayakan 120 mesh. Masing-masing kulit yang lolos dari saringan tersebut digunakan sebagai sumber xilan dan sumber karbon.

3.4.2. Pembuatan Media Padat

Media padat yang digunakan adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA). Adapun pembuatan PDA adalah sebagai berikut: 20 gram kentang yang telah dikupas, dicuci dan diiris kecil-kecil, ditambah dengan air hingga 100 mL dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring, sehingga diperoleh sari kentang. Kemudian ditambahkan 2 gram dekstrosa, pH diatur pada pH 5 dengan menambahkan buffer asetat pH 5 sebanyak 1 mL. Kemudian dipanaskan hingga mendidih dan ditambah 1,5 gram tepung agar, lalu diaduk. Setelah itu, larutan PDA tersebut dipipet sebanyak 4 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121 ^{o}C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.4.3. Pembuatan Media Cair (Rahayu, 1989)

Ditimbang 0,25 g pepton, 0,1 g KH_2PO_4, 0,15 g $CaCl_2$, 0,1 g tween-80, 0,7 g $(NH_4)_2SO_4$ dan 0,15 g $MgSO_4.7H_2O$, 0,5 mL unsur renik dan 2,5 g tepung kulit jagung, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker, setelah itu diatur pada pH 5. Larutan dibuat sebanyak 500 mL. Kemudian ditambahkan buffer asetat pH 5 sebanyak 1 mL. Campuran ini diaduk dan dipanaskan sampai mendidih. Dipipet 10 mL campuran tersebut, dimasukkan dalam erlenmeyer, lalu ditutup dengan kapas dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121 ^{o}C dan tekanan 15 psi.

Prosedur yang sama dilakukan untuk sumber xilan yang berbeda yaitu kulit melon, kulit apel, kulit pisang dan kulit kedelai.

3.4.4. Penanambiakan *Trichoderma viride*

Disiapkan jarum ose, kemudian dilakukan pemindahan secara aseptis kapang *Trichoderma viride* ke dalam media padat dan diinkubasi selama 4 sampai 6 hari pada temperatur 30 ^{o}C.

3.4.5. Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan dengan mengambil spora dari biakan murni *Trichoderma viride* yang telah berumur 4-6 hari dari satu agar miring, kemudian disuspensikan dalam 10 mL akuades setril. Suspensi diambil masing-masing sebanyak 2 mL dan ditanam dalam tiga buah erlenmeyer yang masing-masing berisi 13 mL media cair steril. Selanjutnya, media tersebut diinkubasi dalam shaker hingga mencapai pertengahan fase logaritma (jam ke-36) dan dilanjutkan dengan produksi enzim.

3.4.6. Produksi Enzim

Disiapkan 3 buah erlenmeyer 250 mL, yang masing-masing berisi 150 mL media cair, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121 ^{o}C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Setelah dingin, ditambahkan secara aseptis 15 mL inokulum (prosedur 3.4.5). Selanjutnya media tersebut diinkubasi dalam shaker dengan kecepatan 150 rpm pada temperatur kamar hingga mencapai awal fase stasioner (jam ke-60), setelah itu dilakukan isolasi enzim.

3.4.7. Isolasi Enzim

Pada akhir masa inkubasi dari percobaan (3.4.6), xilanase diisolasi dengan metode sentrifugasi. Pada masing-masing media cair ditambah dengan 15 mL buffer asetat pH 5,0 dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4 ^{o}C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar xilanase.

3.4.8. Tahapan Analisa Kadar Gula Pereduksi

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Dipipet larutan glukosa standar 25 mg/L sebanyak 1 mL dengan pipet volum ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 1 mL air bebas reduktor dan 1 mL reagen Nelson, lalu dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit. Setelah itu didinginkan hingga mencapai temperatur kamar. Kemudian ditambah reagen Somogyi sebanyak 1 mL, dikocok sampai semua endapan Cu_2O larut. Kemudian dipindah ke labu ukur 10 mL, diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas dan diukur serapannya pada interval panjang gelombang 685-780 nm dengan blanko yang berisi air bebas reduktor dan reagen.

b. Pembuatan Kurva Standar Gula Pereduksi

Disiapkan 8 buah tabung reaksi, masing-masing diisi dengan larutan glukosa standar 1 mL dengan konsentrasi 0, 10, 15, 20, 25, 30, dan 35 mg/L. Kemudian masing-masing tabung ditambah 1 mL air bebas reduktor dan 1 mL reagen Nelson. Mulut tabung ditutup dengan aluminium foil, dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat, dikocok dan didiamkan selama 2 menit. Larutan dipindah ke dalam labu ukur 10 mL, diencerkan dengan air bebas reduktor dan dibaca serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 744,5 nm. Blanko yang digunakan diberi perlakuan sama dengan sampel, tetapi penambahan 1,0 mL larutan glukosa standar diganti dengan 1,0 mL air bebas reduktor.

c. Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase (Isil, 2005)

Disiapkan 5 buah tabung reaksi, masing-masing diisi substrat xilan 1 % (b/v) sebanyak 1 mL. Kemudian diinkubasi dalam penangas air pada temperatur 60 ^{o}C selama 15 menit. Kemudian ditambah ekstrak kasar xilanase sebanyak 1 mL, buffer asetat pH 5 sebanyak 1 mL dan diinkubasi pada temperatur 60 ^{o}C selama 50 menit. Setelah itu, masing-masing tabung diinkubasi pada penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dalam air

es hingga mencapai temperatur kamar. Kemudian dianalisis kadar gula pereduksi dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi.

3.4.9. Uji kadar Gula Pereduksi Dengan Metode Nelson-Somogyi

Larutan uji sebanyak 1 mL diencerkan menjadi 10 mL dalam labu ukur 10 mL dengan air bebas reduktor. Kemudian dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 1 mL air bebas reduktor dan 1 mL reagen Nelson. Mulut tabung ditutup dengan aluminium foil, dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat (Somogyi), dikocok dan didiamkan selama 2 menit. Larutan dipindah ke dalam labu ukur 10 mL, diencerkan dengan air bebas reduktor dan dibaca serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Blanko diperlakukan sama dengan sampel, tetapi enzim dimatikan aktivitasnya dengan cara memanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit sebelum dicampur dengan substrat.

3.4.10. Pengukuran Aktivitas Xilanase

Aktivitas 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 (µg/mL.menit)
x = konsentrasi gula pereduksi (µg/mL)
V = volume total sampel tiap tabung (mL)
p = jumlah enzim (mL)
q = waktu reaksi (menit)
fp = faktor pengenceran

3.4.11. Pembuatan kurva baku BSA (Bovin Serum Albumin)

Larutan standar BSA dibuat dengan melarutkan 0,5000 g BSA dengan aquadest dan diencerkan sampai volumenya 50 ml dengan menggunakan labu ukur sehingga diperoleh larutan stok BSA 10000 ppm. Larutan ini dipipet (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9) ml lalu masing-masing diencerkan menjadi 10 ml sehingga diperoleh larutan standar BSA dengan konsentrasi (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 dan 9000) ppm.

Masing-masing larutan standar dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 0,5 ml ditambah 2 ml pereaksi biuret. Larutan dikocok sampai homogen dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya masing-masing larutan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan larutan standar BSA 5000 ppm pada panjang gelombang antara 500-600 nm, yang mana panjang gelombang dengan nilai absorbansi terbesarlah yang digunakan sebagai panjang gelombang maksimum pengukuran. Hasil pengukuran dari serangkaian larutan standar BSA tersebut dibuat regresi linearnya sehingga diperoleh kurva standar BSA.

3.4.12 Penentuan kadar protein

Penentuan kadar protein xilanase dilakukan dengan metode Biuret. Sebanyak 0,5 ml ekstrak kasar xilanase ditambah dengan 2 ml pereaksi biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu 50°C. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum BSA (Bovin Serum Albumin). Kadar protein xilanase ditentukan dengan memplotkan nilai absorbansi enzim terhadap kurva standar.

3.4.13. Penentuan V_m dan K_M

Harga V_m dan K_M ditentukan melalui uji aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase dengan substrat xilan pada pH 5, temperatur 60°C dan waktu inkubasi 55 menit. Variasi konsentrasi substrat xilan sebesar (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0) % (b/v). (Widyasari, 2007)

3.4.14. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan metode analisa Rancangan Acak Lengkap (RAL). Apabila terdapat perbedaan diantara perlakuan akan diuji lebih lanjut dengan uji beda nyata terkecil (BNT) (Yitnosumarto, 1993). Semua data percobaan diuji dengan tingkat kepercayaan 95 % atau BNT 5 %.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dari penelitian ini akan dibahas tentang isolasi ekstrak kasar xilanase dari *Trichoderma viride* dengan menggunakan sumber xilan kulit pisang, kulit kedelai, kulit apel, kulit melon dan kulit jagung dan penentuan parameter kinetika reaksi enzimatis, yaitu V_m dan K_M pada isolat yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi. Isolat ekstrak kasar xilanase diukur aktivitasnya dengan menggunakan satuan unit aktivitas dan diukur kadar proteinnya guna mendapatkan aktivitas spesifik enzim. Satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya µg gula pereduksi yang dapat dihasilkan oleh 1 mL enzim dalam waktu 1 menit dan satu unit aktivitas spesifik enzim adalah banyaknya µg gula pereduksi yang dapat dihasilkan oleh 1 mg protein.

4.1. Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase dari *Trichoderma viride*

Tahap awal sebelum mengisolasi ekstrak kasar xilanase adalah menumbuhkan kapang hingga jam ke-36 untuk memperoleh inokulum. Kemudian inokulum tersebut diinkubasi lebih lanjut hingga jam ke-60 saat enzim telah diproduksi.

Menurut Gong dan Tsao (1979), kemampuan mikroba memproduksi xilanase menjadikannya mampu menghidrolisis xilan yang terdapat pada substratnya menjadi glukosa atau gula-gula lain yang larut dan dapat dijadikan sumber karbon bagi pertumbuhannya. Xilanase dihasilkan oleh kapang *Trichoderma viride* dengan menggunakan variasi sumber xilan yaitu kulit pisang, kulit kedelai, kulit apel, kulit melon dan kulit jagung.

Proses isolasi ekstrak kasar enzim dilakukan dengan metode sentrifugasi, dengan penambahan larutan buffer asetat pH 5. Fungsi penambahan buffer dalam hal ini agar kestabilan xilanase tetap terjaga karena perubahan pH akan berpengaruh terhadap struktur enzim tersebut. Sedangkan pada pH 5, xilanase memiliki stabilitas yang tinggi. Prinsip dari sentrifugasi adalah pemisahan molekul berdasarkan densitasnya (Sorensen, dkk., 1999). Molekul yang densitasnya besar akan mengendap di bagian bawah tabung sentrifuse akibat adanya gaya sentrifugal. Molekul yang mengendap

ini adalah sisa-sisa jaringan struktural *Trichoderma viride*. Sementara protein xilanase yang terlarut di dalam buffer akan bertahan pada fasa cair supernatan. Setelah dilakukan sentrifugasi, supernatan dipisahkan dari endapannya, sehingga diperoleh ekstrak kasar xilanase. Ekstrak kasar xilanase yang dihasilkan sebanyak 275 mL.

Keberhasilan isolasi enzim ditentukan melalui uji aktivitas enzim dengan substrat xilan menggunakan metode spektrofotometri menggunakan reagen Nelson-Somogyi.

4.2 Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase

Isolat ekstrak kasar xilanase diuji aktivitasnya pada kondisi pH 5,0, temperatur 60 ^{o}C dan waktu inkubasi selama 55 menit.

Temperatur reaksi berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Peningkatan temperatur menyebabkan aktivitas ekstrak kasar enzim meningkat. Hal ini disebabkan temperatur yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dengan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk makin banyak. Pada temperatur optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk melimpah. Peningkatan temperatur lebih lanjut akan menurunkan aktivitas ekstrak kasar enzim. Hal ini disebabkan karena enzim mengalami denaturasi. Enzim mengalami perubahan konformasi pada temperatur yang terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim (Lakitan, 2004).

Xilan cukup stabil hingga temperatur 180 ^{o}C, sehingga pada temperatur 60 ^{o}C struktur xilan tidak mengalami perubahan (Schlegel dan Schmidt, 1994). Xilanase cukup stabil hingga temperatur 60 ^{o}C, tetapi xilanase akan mengalami denaturasi pada temperatur yang lebih tinggi (Richana, 2002). Oleh karena itu, reaksi hidrolisis untuk menentukan aktivitas ekstrak kasar xilanase perlu dilakukan pada temperatur optimum reaksi yang mana tidak terjadi denaturasi protein xilanase. Pada temperatur 60 ^{o}C, energi kinetik dari molekul xilanase dan substrat xilan mencapai titik tertinggi sehingga reaksi dapat berlangsung lebih cepat, tanpa terjadi denaturasi protein ekstrak kasar xilanase.

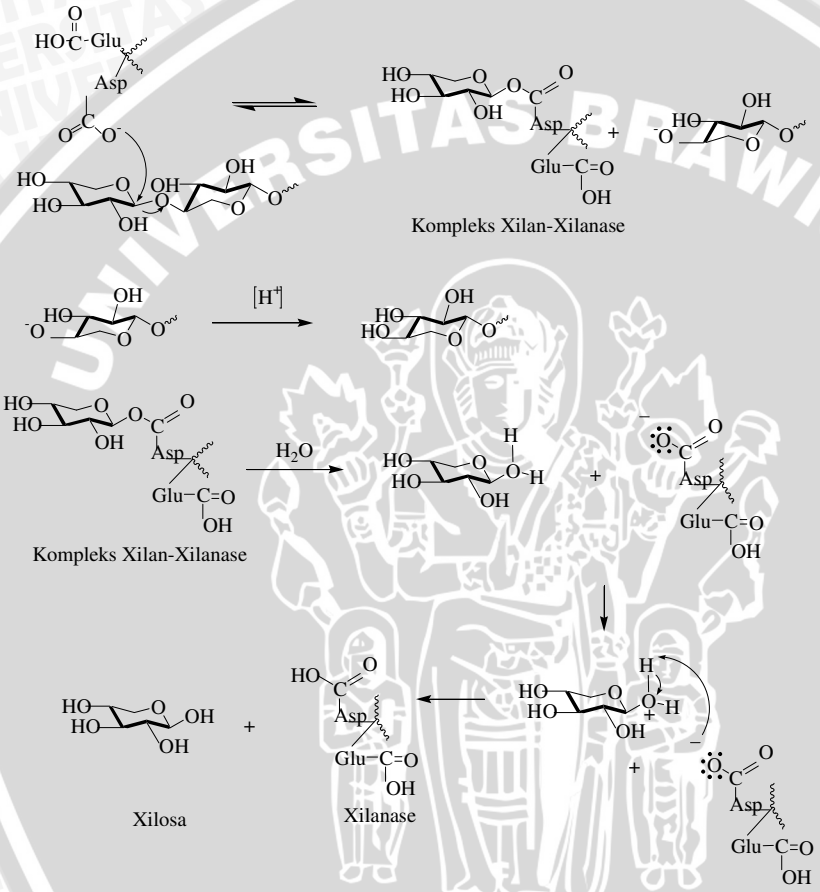
Waktu inkubasi berpengaruh pada waktu kontak antara molekul xilanase dan substrat untuk terjadinya reaksi. Sisi aktif enzim dalam mengikat substrat secara optimum membutuhkan waktu yang cukup. Jika waktu yang dikondisikan pada enzim dan substrat kurang dari cukup, maka sisi aktif enzim belum optimal 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, dan produk yang dihasilkan hanya mengalami peningkatan yang relatif kecil. Pada waktu inkubasi 55 menit, kecepatan reaksi hidrolisis xilan oleh xilanase mencapai titik maksimum sehingga akan didapatkan aktivitas xilanase tertinggi.

pH reaksi berpengaruh terhadap enzim dan substrat. Bentuk terionisasi suatu asam amino berbeda-beda pada masing-masing pH bergantung pada tingkat keasaman gugus sampingnya. Aktivitas katalitik enzim bergantung pada sisi aktifnya. 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 asam aspartat dan asam glutamat (Yong eok lee, *et al*., 1993).

Asam aspartat dan asam glutamat merupakan asam amino yang mempunyai harga pKa rantai samping 3,86 dan 4,25 (Lehninger, 1997). Pada pH 5, fraksi gugus rantai samping asam aspartat dan asam glutamat dalam bentuk ion karboksilat, merupakan nukleofil yang akan menyerang polimer xilan pada atom C_1.

Gula pereduksi terbentuk melalui tahapan reaksi enzimatis (Gambar 4.1), yang melibatkan reaksi antara sisi aktif enzim dengan substrat xilan. Mekanisme reaksi yang terjadi melalui pembentukan intermediet (kompleks enzim-substrat) (Withers, 1995). Fraksi gugus rantai samping dalam bentuk ion karboksilat dari residu asam amino jenis asam aspartat menyerang polimer xilan. Penyerangan ini akan semakin mudah dengan adanya ion H^+ yang mampu menarik

pasangan elektron bebas dari atom O yang digunakan untuk membentuk ikatan glikosidik. Kemudian terjadi proses hidrolisis oleh adanya H_2O, yang menyebabkan terjadi pemutusan ikatan enzim-substrat dan terbentuk monomer gula pereduksi.



Gambar 4.1. Mekanisme reaksi enzimatis antara xilanase dengan substrat xilan

Adanya gula pereduksi ditandai dengan terbentuknya endapan Cu_2O berwarna merah bata. Kadar gula pereduksi ditentukan dengan metode spektrofotometri menggunakan reagen Nelson Somogyi

dengan mengkonversikan serapan pada kurva baku glukosa yang sudah diketahui konsentrasinya ke dalam persamaan regresi linier Y = 0,223 x dengan regresi sebesar 0,994 (Lampiran 7).

Aktivitas xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada masing-masing sumber xilan ditunjukkan oleh Gambar 4.2. Data yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan kadar gula pereduksi hasil hidrolisis ekstrak kasar xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada berbagai sumber xilan. Perbedaan tersebut erat kaitannya dengan jumlah nutrien terutama xilan pada masing-masing sumber xilan. Xilan merupakan induser yang dapat menginduksi pembentukan xilanase pada *Trichoderma viride*. Semakin banyak kadar xilan maka semakin banyak xilanase yang dapat terbentuk dan aktivitas yang dihasilkan akan tinggi.

Aktivitas ekstrak kasar xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit Jagung mempunyai aktivitas xilanase rata-rata tertinggi (17,1896 ± 0,1167) Unit (Tabel L.10.2). Hal ini dikarenakan kadar xilan pada kulit jagung paling tinggi, sehingga xilanase yang terbentuk paling banyak yang selanjutnya menyebabkan aktivitas xilanase yang dihasilkan juga paling tinggi dibandingkan dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan lainnya. Tetapi hal ini tidak demikian untuk xilanase yang dihasilkan dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit kedelai. Pada sumber xilan kulit kedelai terdapat inhibitor yang menghalangi aktivitas xilanase dalam menghidrolisis xilan menjadi molekul yang lebih sederhana, molekul tersebut digunakan untuk pertumbuhan sel kapang.

Aktivitas ekstrak kasar xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit apel lebih tinggi dibandingkan dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit pisang. Penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Elisashvili *et al* (2008) dengan aktivitas yang lebih rendah. Ekstrak kasar xilanase hasil isolasi dari *C. maxima* dan *T. pubescens* yang masing-masing ditumbuhkan pada sumber xilan kulit apel memiliki aktivitas berturut-turut lebih tinggi yaitu (18 ± 2) dan (39 ± 5) U/mg protein dibandingkan dari sumber xilan kulit pisang (15 ± 2) dan (38 ± 3) U/mg protein. Berdasarkan hal tersebut dapat dimungkinkan bahwa kandungan xilan dari sumber xilan kulit apel lebih tinggi dibandingkan dari sumber xilan kulit pisang.

Apabila dibandingkan dengan xilanase yang telah dihasilkan dari penelitian Richana *et al* (2002), terlihat bahwa ekstrak kasar xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit kedelai pada penelitian ini memiliki aktivitas xilanase yang jauh lebih rendah yaitu hanya (1,1327 ± 0,0169) U/mL. Xilanase yang dihasilkan dari penelitian richana memiliki aktivitas xilanase sebesar 366,67 U/mL. Hal ini disebabkan kemampuan *Trichoderma viride* dalam menghasilkan xilanase lebih rendah dibanding *Bacillus pumilus*. Pada penelitian Richana digunakan ekstrak xilan dan adanya penambahan ekstrak khamir pada media produksinya. Ekstrak xilan akan lebih mengoptimalkan pembentukan xilanase oleh bakteri *Bacillus pumilus* dan adanya ekstrak khamir yang mengandung asam amino, peptida, vitamin dan karbohidrat memperbesar konsentrasi senyawa-senyawa yang sangat diperlukan untuk pertumbuhan mikroba.

Hasil uji statistik berdasarkan analisis ragam (Lampiran 13) diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel\ 0,05}$, sehingga dapat dinyatakan bahwa sumber xilan mempengaruhi aktivitas ekstrak kasar xilanase secara nyata. Uji BNT 5 % dilakukan untuk mengetahui sumber xilan mana saja yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Berdasarkan Tabel L.13.2. diketahui bahwa pada sumber xilan Kedelai, kulit Pisang, kulit Melon, kulit Apel, kulit Jagung terdapat perbedaan yang sangat nyata.

4.3 Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Xilanase

Kadar protein ditentukan dengan metode spektrofotometri menggunakan reagen Biuret dengan mengkonversikan serapan pada kurva baku Bovin Serum Albumin (BSA) yang sudah diketahui konsentrasinya ke dalam persamaan regresi linier $Y = 3.10^{-4}$ x dengan regresi sebesar 0,997 (Lampiran 9).

Kadar protein yang dihasikan dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada masing-masing sumber xilan ditunjukkan oleh Gambar 4.2. Ekstrak kasar xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit apel mempunyai kadar protein rata-rata tertinggi (4,69 ± 0,2291) µg/ml.

Menurut Wibowo (1988), xilan dapat dihidrolisis oleh bermacam-macam enzim mikrobia terutama mikrobia selulotik dengan dasar

kerja endoenzim. Sistem enzim tersebut ialah endoxilanase. Mula-mula xilan dihidrolisis menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana (xilooligosakarida) oleh enzim ekstraseluler endoxilanase. Kemudian dilanjutkan dengan hidrolisis molekul-molekul tersebut menjadi xilosa oleh enzim intraseluler β-xilosidase sehingga dapat masuk melewati membran sel *Trichoderma viride*. Kecepatan hidrolisis xilan ini selanjutnya akan mempengaruhi pertumbuhan sel *Trichoderma viride* dan pertumbuhan sel tersebut akan mempengaruhi kadar xilanase yang dihasilkan. Selain itu kadar N pada sumber xilan menurut Kaiser (1984), Richana dan Lestina (2002) juga mempengaruhi, nitrogen tidak hanya penting untuk laju metabolit dalam sel tetapi juga bagi pembentukan protein sel, Semakin tinggi kadar N, maka semakin tinggi protein terlarut yang dihasilkan.

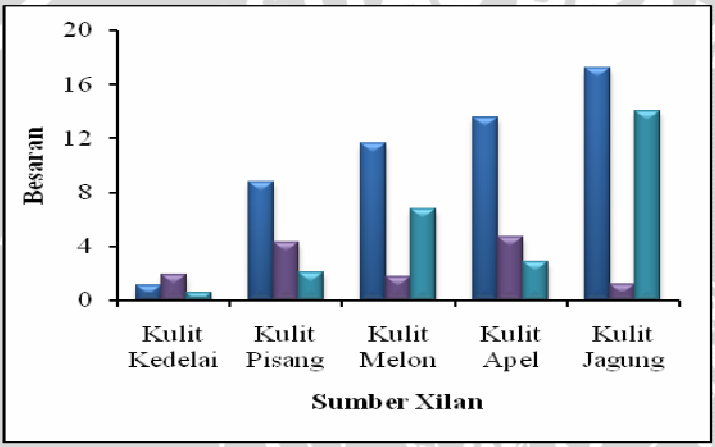
Ekstrak kasar xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit apel memilki kadar protein tertinggi. Ekstrak kasar xilanase tersebut mengandung banyak protein non-xilanase yang dapat menutup atau mengganggu sisi aktif pengikatan xilanase-substrat untuk membentuk produk, sehingga menyebabkan aktivitas katalitiknya lebih rendah dibandingkan dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit jagung.

Hasil uji statistik berdasarkan analisis ragam (Lampiran 13) diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel\ 0,05}$, sehingga dapat dinyatakan bahwa sumber xilan mempengaruhi kadar protein ekstrak kasar xilanase yang dihasilkan oleh *Trichoderma viride* secara nyata. Uji BNT 5 % dilakukan untuk mengetahui sumber xilan mana saja yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Berdasarkan Tabel L.13.4, diketahui bahwa pada semua sumber xilan terdapat perbedaan yang sangat nyata.

4.4 Penentuan Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Xilanase

Aktivitas spesifik xilanase didefinisikan sebagai jumlah unit (U) yang menunjukkan jumlah µg produk yang dihasilkan oleh setiap µg protein enzim per menit. Aktivitas spesifik merupakan tingkat kemampuan enzim dalam menghidrolisis substrat dan merupakan indikator tingkat kemurnian relatif suatu enzim dalam larutan. Semakin tinggi aktivitas spesifik suatu enzim, maka kemampuan

enzim tersebut tinggi dalam menghidrolisis substrat dan memilki tingkat kemurnian enzim yang tinggi di dalam larutan (Lehninger, 1997). Enzim dengan kadar yang rendah dalam larutan tetapi memiliki aktivitas katalitik yang tinggi diasumsikan memiliki tingkat kemurnian relatif enzim yang tinggi, karena protein selain enzim yang diinginkan kadarnya sangat kecil. Aktivitas spesifik enzim dapat ditentukan dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar proteinnya.



Gambar 4.2. Grafik Aktivitas, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada Berbagai Sumber Xilan

Keterangan gambar:

1. : Aktivitas Xilanase dalam 10^{-2} µg. mL^{-1}. $menit^{-1}$
2. : Kadar Protein dalam mg/mL
3. : Aktivitas Spesifik Xilanase dalam 10^{-2} µg. mg^{-1}. $menit^{-1}$

Aktivitas spesifik xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada masing-masing sumber xilan ditunjukkan oleh Gambar 4.2. Ekstrak kasar xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit jagung mempunyai aktivitas spesifik xilanase rata-rata tertinggi (14,0195 ± 0,7876) U/mg protein. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar xilanase tersebut

mempunyai kemampuan katalitik dalam menghidrolisis substrat xilan dan mempunyai tingkat kemurnian tertinggi.

Ekstrak kasar xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit melon mempunyai aktivitas spesifik xilanase lebih tinggi dibandingkan dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada sumber xilan kulit pisang. Penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Seyis dan Aksoz (2005), dengan tingkat kemurnian yang lebih rendah.

Hasil uji statistik berdasarkan analisis ragam (Lampiran 13 diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel\ 0,05}$, sehingga dapat dinyatakan bahwa sumber xilan mempengaruhi aktivitas spesifik ekstrak kasar xilanase yang dihasilkan *Trichoderma viride* secara nyata.. Uji BNT 5 % dilakukan untuk mengetahui variasi sumber xilan mana saja yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Berdasarkan Tabel L.13.6, diketahui bahwa aktivitas spesifik xilanase dari *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada semua sumber xilan terdapat perbedaan yang nyata.

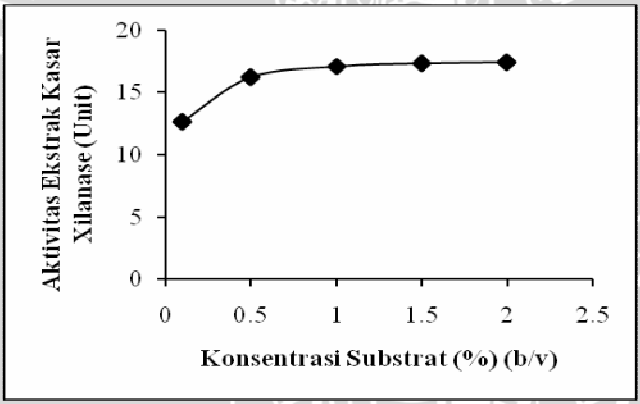
4.5 Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis

Konsentrasi substrat merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase dilakukan dengan memvariasi konsentrasi substrat sebesar (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0) % (b/v) yang direaksikan pada kondisi optimum. Variasi konsentrasi substrat ini didasarkan pada penelitian Isil (2005), variasi konsentrasi substrat (0,1-1,5) % (b/v).

Gambar 4.3 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 4.3), 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 4.3 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, kurva yang menyatakan hubungan ini memiliki bentuk hiperbola, maka Michaelis-Menten mendefinisikan suatu tetapan (K_M) yang bermanfaat dalam menyatakan hubungan yang tepat antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik.



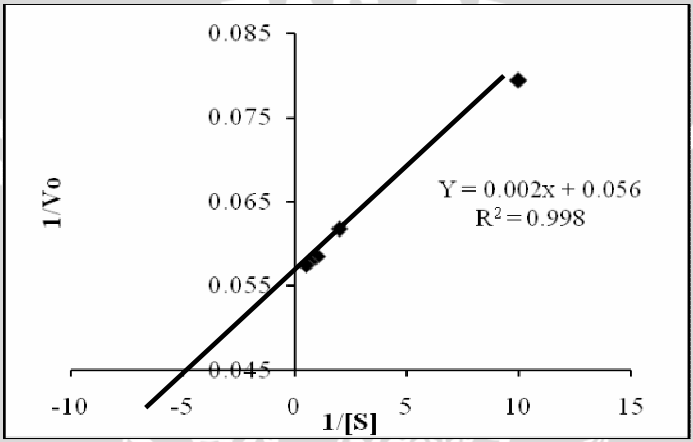
Gambar 4. 3. Kurva hubungan konsentrasi substrat xilan terhadap aktivitas ekstrak kasar xilanase

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 kurva hubungan antara $1/V_o$ dengan 1/[S] (Gambar 4.4), diperoleh intersep sebesar 0,056 dan slope sebesar 0,002, sehingga diperoleh nilai V_m sebesar 17,8572 µg/mL.menit dan K_M

sebesar 0,04 %. Pada penelitian yang dilakukan oleh Suekane *et al*. (1978) dalam Wong (1995), yang menggunakan *Streptomyces olivochromogenes* dengan substrat xilan, diperoleh V_m sebesar 3276 µg/mL.menit dan K_M sebesar 0,03 %, pada kondisi pH 7,5, temperatur 60 ^oC, Mg^{2+} 20 mM, Co^{2+} 3 mM, sehingga dapat diketahui bahwa kofaktor sangat berperan dalam parameter kinetika reaksi enzimatis.



Gambar 4.4. Kurva hubungan 1/Vo dengan 1/[S]

Konsentrasi substrat yang memberikan kecepatan reaksi sebesar ½ nilai V_m merupakan nilai K_M. Pada penelitian ini, konsentrasi substrat pada saat xilanase mencapai ½ V_m yaitu pada konsentrasi 0,04 % atau 0,4 mg/ml. Pada penelitian Richana, xilanase yang dihasilkan dari bakteri *Bacillus pumilus* yang ditumbuhkan pada sumber xilan tongkol jagung memberikan nilai K_M sebesar 0,6 % atau 6 mg/ml. Menurut Segel (1975), enzim yang sama yang diisolasi dari sumber berbeda dikatakan identik jika memiliki nilai K_M yang sama. Berdasarkan hal tersebut, xilanase yang dihasilkan dari *Trichoderma viride* yang di tumbuhkan pada sumber xilan kulit jagung tidak identik dengan xilanase yang dihasilkan dari bakteri *Bacillus pumilus* yang ditumbuhkan pada tongkol jagung.

Nilai K_M digunakan untuk memperkirakan [S] yang diperlukan agar reaksi enzimatis lebih efisien. Dengan mengetahui nilai K_M kita dapat mengoptimalkan pemakaian substrat untuk mengetahui

kemampuan enzim sebagai biokatalisator dalam memecah substrat menjadi produk. Pada [S] = 5 K_M, kecepatan reaksi enzimatis sebesar 0,83 µg/menit. Pada [S] = 10 K_M, kecepatan reaksi enzimatis sebesar 0,90 µg/menit, sedangkan pada [S] = 100 K_M, kecepatan reaksi enzimatis sebesar 0,99 µg/menit. Jadi jika [S] ditingkatkan dari 4 mg/ml menjadi 40 mg/ml hanya mengakibatkan kecepatan reaksi meningkat sebesar 9.10^{-4} %. Pada [S] << K_M, maka kecepatan reaksi sangat sensitif terhadap perubahan [S] tetapi kecepatan reaksi tersebut jauh lebih kecil dari V_m-nya. Sehingga kemampuan katalitik enzim sangat rendah atau tidak menunjukkan aktivitas sama sekali. Sedangkan jika [S] >> K_M, maka kecepatan reaksi tidak sensitif terhadap perubahan [S].

Hasil K_M dari penelitian ini jauh lebih rendah dibandingkan dari hasil penelitian Kulkarni *et al.* (1995) yang menunjukkan bahwa xilanase dari *Bacillus* sp. NCIM-59 menghasilkan K_M 5,8-8,5 mg/ml. Demikian juga hasil penelitian George *et al.* (2001) menunjukkan bahwa xilanase dari *Thermomonospora* sp. menghasilkan K_M yang lebih tinggi, yaitu K_M = 7 mg/ml. Serta hasil penelitian Nakamura *et al*. (1993), yang menunjukkan bahwa xilanase dari *Bacillus* sp. 41M-1 menghasilkan K_M yang lebih tinggi, yaitu 3,3 mg/ml. Data V_m dari penelitian ini jauh lebih tinggi (17,8572 µg/mL.menit) dibanding Kulkarni *et al.* (1995), yaitu V_m 1,5 µg/menit dan Nakamura *et al* (1993), yaitu 165 µg/menit.

Nilai K_M yang tinggi menunjukkan afinitas terhadap substrat yang rendah. Semakin kecil nilai K_M semakin tinggi afinitasnya terhadap substrat, sehingga semakin rendah konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mencapai kecepatan reaksi katalitik maksimumnya (V_m). Rendahnya afinitas ekstrak kasar enzim disebabkan masih adanya protein, yaitu enzim lain yang juga memiliki afinitas terhadap xilan, sehingga tidak semua rantai pentosa diputus menjadi gula reduksi. Mengingat dalam penelitian ini tidak dilakukan pemurnian.
Pada penelitian ini, untuk mendapatkan V_m reaksi katalitik enzim dibutuhkan [S] > 0,8 mg/ml. Kecepatan reaksi pada saat xilanase telah jenuh dengan substrat yaitu pada kecepatan 17,8572 µg/menit.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Sumber xilan yang digunakan sebagai media pertumbuhan *Trichoderma viride* dalam memproduksi xilanase dengan aktivitas spesifik tertinggi adalah sumber xilan kulit jagung yaitu sebesar (14,0195 ± 0,7876) U/mg protein
2. Harga V_m dan K_M yang diperoleh dari persamaan *Lineweaver-Burk* sebesar 17,8572 µg/mL.menit dan 0,04 %.

5.2. Saran

Pemanfaatan limbah sebagai sumber xilan untuk produksi xilanase perlu dianalisis kadar xilannya dan perlu diteliti kondisi optimum dalam produksi xilanase.

Daftar Pustaka

Agromedia, 2007, **Budi Daya Melon**, PT. Agromedia Pustaka, Jakarta. Hal 9.

Anonimus. 2003. **Studi Kasus Implementasi Produksi Bersih pada Industri dan Dagang Kecil Menengah.** Departemen Perindustrian dan Perdagangan. Jakarta. http:lkm.dpxrn.go.id/pelatihan/cp/modul16.doc. diakses tanggal: 26 Januari 2007.

Anonimus. 2008. **Pemanfaatan Limbah sebagai Bahan Pakan Ternak**. http :// jajo66.files.wordpress.com 208034. Diakses tanggal : 3 Juni 2008.

Anonimus. 2008. **Klasifikasi dan Karakteristik Limbah**. http :// jajo66.files.wordpress.com 208032. Diakses tanggal : 3 Juni 2008.

Caprette, D.R., 1995, **Biuret Protein Assay**, http://www.ruf.rice.edu/ ~bioslabs/methods/protein/biuret.html , tanggal akses : 20 Januari 2007.

Chuzaemi S, Hartutik dan S. Susanto. 1983. **Petunjuk Analisis Bahan Makanan Ternak.** Nuffic Unibraw. Bagian Ilmu Makanan Ternak. Fakultas peternakan Universitas Brawijaya . Malang.

Cooper, T.G., 1997, **The Tool of Biochemistry**, John Wiley and Sons, Canada.

Damaso,M.C.T, Carolina M.M. Carvalho Andrade and Nei Pereira Jr, 2002, **Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus IOC-4145***, Brazilian Journal of Microbiology Vol.33 No.4, Brazil, diakses tanggal 7 April 2008.

Dashek, W.V., 1997, **Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology**, http://www.en.wikipedia.org/wiki/xylanase, diakses tanggal 17 Juli 2006.

Djafaruddin, 2000, **Dasar-dasar Pengendalian Penyakit Tanaman**. Bumi Aksara. Jakarta

Elisashvili V., Eva Kachlisvili and Michel Penninckx. 2008. **Effect of Growth Substrate, Method of Fermentation, and Nitrogen Source on Lignocellulose-Degrading Enzymes Production by White-rot Basidiomycetes**. Journal Ind Mikrobiologi Biotechnologi (2008) 35 : 1531-1538 DOI 10.1007/s10295-008-0454-2123. Society for Industrial Microbiology 2008

Fitriyani,A., 2006, **Pisang Pemicu Kantuk**, Http ://www.Pikiran Rakyat.com, Edisi Cetak : Kamis, 10 Mei 2007, diakses tanggal 15 Januari 2008.

Gong, C.S. and G.T. Tsao. 1979. **Cellulase and Biosynthesis Regulation. *In* D. Pearlman (*Ed.*)**. Annual Report on Fermentation Process. Academic Press, New York.

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, diakses tanggal 15 Juli 2006.

Hettenhaus, J., 2002, **Talking About Corn Stover With Jim Hettenhaus**, Biotechnol, Issue No.2, V.4.

Isil, S. and N. Aksoz, 2005, **Xylanase Production from *Trichoderma harzianum 1073 D3* with Alternative Carbon and Nitrogen Sources**, Brazilian Journal of Biology and Technology 43(1) 37-40 (2005) UDC 582.282:577.152.321 ISSN 1330-9862, diakses tanggal 15 Juni 2006.

Judoamidjojo, M.R.,E.G.Sa'id dan L.Hartoto. 1989. **Biokonversi**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Pendidikan Tinggi.

Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Junaedi, E dan Cahyono, 2008, **Apel Batu segera Tinggal Nama**, http://www.surabayapost.info, diakses tanggal 18 Juli 2008

Kementerian Negara Riset dan Teknologi, 2006, Http ://ristek.go.id. diakses tanggal 14 Desember 2008.

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

Lehninger, A.L., 1997, **Dasar-dasar Biokimia**, Jilid 1, Alih bahasa: M. Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta, hal. 144

Mc Kee, T. dan J.R. Mc Kee, 2003, **Biochemistry: The Molecular Basis of Life,** 3rd edition, Mc Graw-Hill Companies, Inc., New York, hal. 152

Muhtadi, D., N.S. Palupi dan M. Astawan, 1992, **Enzim Dalam Industri Pangan**, IPB, Bogor.

Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, dan V.W. Rodwell. 2006. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 27th ed., Mc Graw-Hill Companies Inc. New Delhi.

Nakamura,S., Kenji wakabayashi, Ryuichiro Nakai, Rikizo Aono and Koki Horikoshi, 1993, **Purification and Some Properties of an Alkaline Xylanase from *Alkaliphilic Bacillus sp. Strain 41M-1*,** journal of Environmental Microbiology Vol. 59, No. 7. Department of Bioengineering, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Japan, diakses tanggal 7 April 2008.

Nurwanto dan Abbas s.J. 1996. **Mikrobiologi Pangan Hewan-Nabati**, UI Press, Jakarta.

Notodiamedjo, S. 2003. **Budidaya Tanaman Holtikultura Khususnya Tanaman Buah-buahan**. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Malang.

Owusu-Apenten, R.K., 2002, **Protein Analysis: Quantitative Effects on Processing**, Marcel Dekker Inc., New York, hal. 47-53

Pearce, G.R., 1983, **The Utilization of Fibrous Agricultural Residues**, Australian Government Publishing Service, Canberra.

Pelezar, M.J. and R.D. Reid, 1965, **Microbiology**, Mc. Graw Hill, Inc., USA.

Poedjiadi, A., 1994, **Dasar-dasar Biokimia**, Universitas Indonesia Press, Jakarta.

Rahman, A. 1992. **Teknologi Fermentasi**. Kerja sama Penerbit Arcan dengan Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.

Rahayu, K., 1989, **Enzim Mikrobia**, PAU Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta.

Richana, N., 2002, **Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia**, Jurnal AgroBio 5(1):2936,http://www.indobiogen.or.id/terbitan/agrobio/agrobio 5_1_2002_Richana.pdf diakses tanggal 14 Juni 2007.

Richana, N. dan Lestina, P. 2002, **Produksi Xilanase untuk Biokonversi Limbah Biji Kedelai**, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. diakses tanggal : 9 Agustus 2007.

Rifai, M.A., 1969, **A Revision of The Genus *Trichoderma***, Mycological Papers no.116, Commonwealth Mycological Institut, Kew, Surrey, England.

Riyanto Joko, Miswar dan Yulinda. 2000. **Enzim Xylanase: Isolasi Mikroorganisme Penghasil dan Karakteristik Parsial Enzim**. Politeknik Pertanian Negeri Jember.

Robinson, T. 1995. **Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi**. 1995. Penerjemah Prof.Dr. Kosasih Padmawinata. FMIPA ITB. Penerbit ITB.

Schlegel**,** H.G. dan K. Schmidt, 1994**, Mikrobiologi Umum,** Edisi 6**,** Alih Bahasa: R.M. Tedjo Baskoro, UGM Press, Yogyakarta.

Segel, I.R., 1975, **Biochemical Calculating**, 2 nd ed.,California. John Wiley and Sons.

Sorensen, H., S. Sorensen, C. Bjergegaard dan S. Michaelsen, 1999, **Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis**, MPG Books Ltd., Bodmin Cornwall, hal. 69-89; 178-207

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

Sumarsih, S., 2003, **Mikrobiologi Dasar**, jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian UPN Veteran, Yogyakarta.

Tarmansyah. 2007. **Pemanfaatan Serat Rami untuk pembuatan Selulosa**, STT No. 2289 Vol. 10 No.18. Litbang Pertahanan Indonesia. Diakses tanggal : 9 Agustus 2007.

Tjitrosoepomo, G., 1994, **Morfologi Tumbuhan**, Fakultas Biologi, Universitas Gadjahmada, Yogyakarta.

Trismilah, W. Deden, Sumaryanto. 2006. **Produksi Xilanase Pengaruh Komposisi Media pada Produksi Xilanase dari *Basillus stearothermophilus DSM 22* Menggunakan Substrat Kulit Buah Pisang**. Fakultas Pertanian. ITB. Bogor.

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.

Via, 2008, **Khasiat Pisang untuk Perokok Berat**, Http://www.banjar-jabar.go.id/redesign//?pilih=lihat&id=648, diakses tanggal 21 Mei 2008

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

Waksman, S.A., 1961, **Soil Microbiology**, John Wiley and Sons, London, p. 48.

Warner, J., 2007, **Apple's Anticancer Compounds Concentrated in the Peel,** Http :// MedicineNet.com. diakses tanggal 14 Desember 2008.

Wibowo D. 1989. **Dasar-dasar Teknologi Fermentasi**. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Widyasari, siska., 2007, **Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Xilanase dari *Trichoderma viride***, Skripsi Program Sarjana Kimia. Universitas Brawijaya, Malang

Winarno , F.G dan Fardiaz. 1980. **Pengantar Mikrobiologi Umum**. Penerbit Angkasa. Bandung

Wirahadikusumah, M., 2001, **Biokimia: Protein, Enzim, dan Asam Nukleat**, edisi kelima, Penerbit ITB, Bandung Withers, S. G. and R, Aebersold, 1995, Approaches to Labeling and Identification of Active site residues in Glycosidases**,** Journal of Protein Science, 4:361-372.

Withers, S. G. and R, Aebersold, 1995, **Approaches to Labeling and Identification of Active Site Residues in Glycosidases,** Journal of Protein Science, 4:361-372.Wong, D.W.S., 1995, Food Enzymes: Structure and Mechanism, Chapman and Hall, New York.

Yong-Eok Lee, S.E. Lowe, B. Henrissat and J. Gregory Zeikus, 1993, **Charactrization of the Active Site and Thermostability Regions of Endoxylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum B6A-RI***, Journal of Bacteriology 175(18):5890-5898, diakses tanggal 12 April 2007.

Lampiran 1. Komposisi Media Pertumbuhan

1.1. Media Padat

- Kentang 20 g
- Dekstrosa 2,0 g
- Tepung agar 1,5 g

Dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL

1.2 Media Cair

- Pepton 0,05 g
- Urea 0,03 g
- KH_2PO_4 0,02 g
- $CaCl_2$ 0,03 g
- Tween-80 0,02 g
- $(NH_4)_2SO_4$ 0,14 g
- $MgSO_4.7H_2O$ 0,03 g
- Serbuk kulit jagung 1,0 g
- Unsur renik 0,1 mL

Dilarutkan dengan akuades sampai 100 mL.

Lampiran 2. Preparasi Larutan

2.1. Pembuatan Reagen Nelson-Somogyi

2.1.1**. Pembuatan Reagen Nelson**

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

Nelson A : dilarutkan 6,25 gram KNa-tartrat, 6,25 gram Na_2CO_3 anhidrat, 5,00 gram $NaHCO_3$, dan 50,00 gram Na_2SO_4 anhidrat dalam 350 mL akuades steril, dimasukkan dalam labu ukur 500 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

Nelson B : dilarutkan 7,50 gram $CuSO_4.5H_2O$ dalam 30 mL akuades steril. Lalu, dimasukkan dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas. Kemudian ditambahkan 1 tetes H_2SO_4 dan dikocok hingga homogen.

Reagen Nelson A dan B dicampurkan menjadi satu, yaitu dengan dipipet 50 mL Nelson A dan 2 mL Nelson B (perbandingan volume 25 : 1) lalu distirer. Pencampuran reagen Nelson A dan B dilakukan tepat saat akan digunakan.

2.1.2. Pembuatan Reagen Somogyi

Larutkan 25 gram ammonium molibdat dalam 450 mL akuades steril, selanjutnya ditambahkan 25 mL H_2SO_4 pekat. Kemudian pada tempat yang berbeda, dilarutkan 3,00 gram $NaHAsO_4.7H_2O$ dalam 25 mL akuades steril. Lalu, dicampurkan larutan kedua dalam larutan pertama dan dimasukkan dalam botol berwarna gelap selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Reagensia ini berwarna kuning.

2.2. Pembuatan Larutan Stok Glukosa 1000 ppm

Larutan standart glukosa dibuat dari larutan stok glukosa 100 ppm. Larutan stok glukosa dibuat dengan menimbang glukosa sebesar :

Larutan glukosa 100 ppm = 100 mg / L = 10 mg / 100 mL

Glukosa ditimbang sebanyak 10 mg atau 0.01 gram dan dilarutkan dengan 100 mL akudes steril.

Larutan standar glukosa dibuat dengan mengencerkan larutan stok glukosa 100 ppm. Larutan stok glukosa 100 ppm dipipet berturut-turut 1,0; 1,5 ; 2,0; 2,5; 3,0; dan 3,5 ml, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, dan diencerkan hingga tanda batas dengan akuades steril sehingga diperoleh larutan baku glukosa dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25, 30, dan 35 mg/L.

2.3. 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 :

$$\text{Konsentrasi asam asetat glasial} = \frac{\text{Berat jenis}}{\text{BM}}$$

$$= \frac{1{,}05 \text{ x } 1000 \text{ g/L}}{60 \text{ g/mol}}$$

$$= 17{,}5 \text{ M}$$

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

$$V_1 \text{ x } M_1 = V_2 \text{ x } M_2$$

$$V_1 \text{ x } 17{,}5 = 100 \text{ x } 0{,}2$$

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

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.

2.4. Pembuatan Larutan Na-Asetat 0,2 M

BM Na-asetat = 82,0 g/mol

Massa Na-asetat = BM x M

= 82,0 g/mol x 0,2 mol/L

= 16,4 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.

2.5. Pembuatan Substrat Xilan 1 % (b/v)

Ditimbang 1,0 g xilan dan dilarutkan dengan akuades, kemudian diatur pHnya (misalnya pH 5,0). Setelah itu dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan larutan buffer asetat pH 5,0 sampai tanda batas.

2.6. Pembuatan Air Bebas Reduktor

Dimasukkan 500 mL akuades ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 2 mL $KMnO_4$ 0,1 M hingga larutan berwarna merah muda. Kemudian didestilasi hingga terbentuk larutan yang tak berwarna kembali.

2.7. Pereaksi Biuret

Untuk membuat pereaksi Biuret dengan cara menimbang 0,1500 g $CuSO_4$ dan kalium natrium tartrat 0,6000 g. Kemudian dilarutkan dengan akuades dalam beaker glass sambil diaduk dengan pengaduk gelas hingga larut, ditambah 30 ml NaOH 10% dan dituangkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades 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 2.3 dan 2.4), menggunakan persamaan berikut :

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

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 :

pKa [HOAc] = 4,74

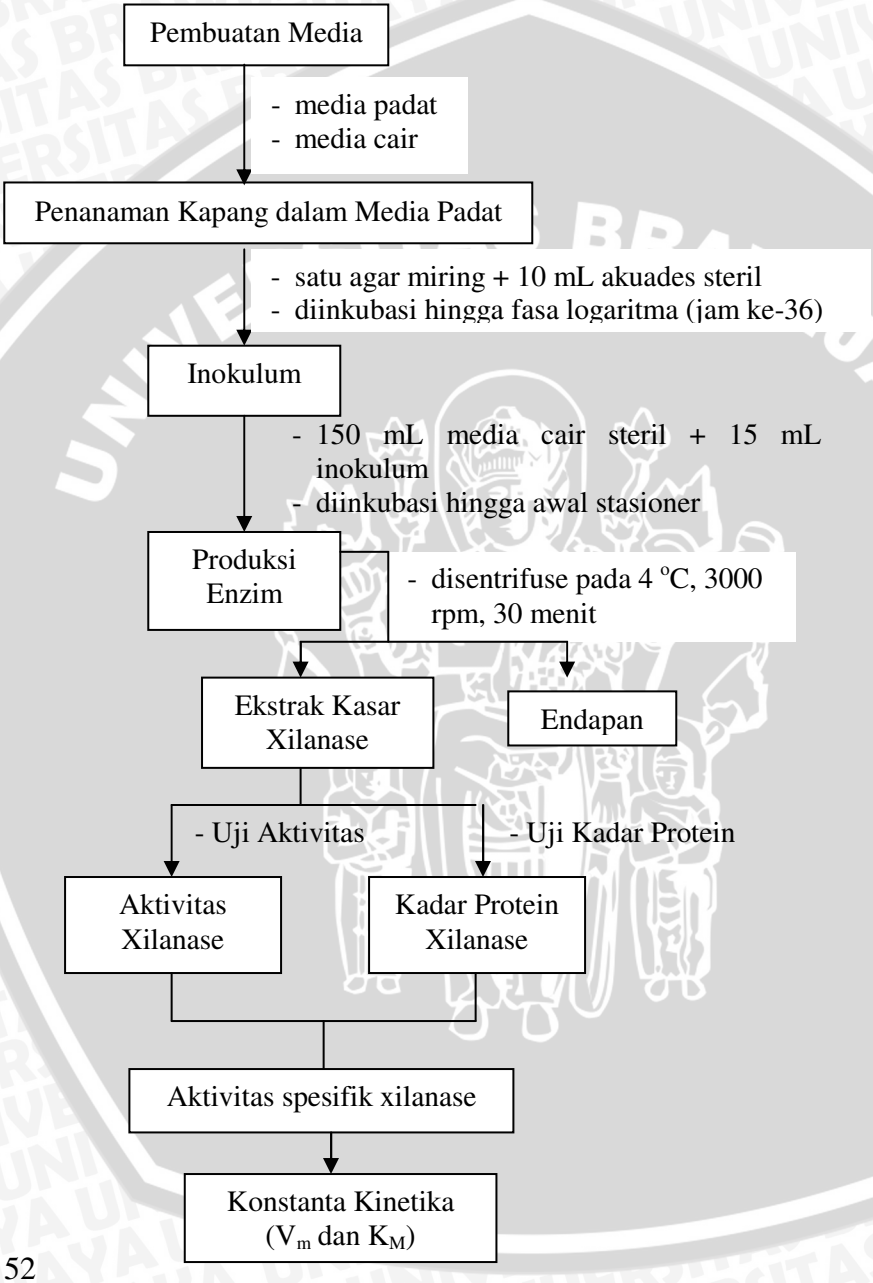
$$5 = 4{,}74 - \log \frac{(50{,}0 \text{ mL x } 0{,}2 \text{ mmol/mL})}{(v \text{ mL x } 0{,}2 \text{ mmol/mL})}$$

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

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

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

Lampiran 4. Tahapan Kerja



Lampiran 5. Skema Kerja

1. Pembuatan Substrat kulit pisang, kulit kedelai, kulit melon, kulit apel dan kulit jagung

Kulit

- dicuci
- dikeringkan di bawah terik matahari selama 2 hari
- digiling
- disaring dengan saringan 150 mesh

Tepung kulit

2. Pembuatan Media

2.1. Media Padat

Kentang

- ditimbang sebesar 20 g setelah dikupas dan dicuci
- dididihkan dalam 100 mL akuades
- disaring

Sari Kentang

- ditambah 2,0 g dekstrosa
- diatur pHnya pada pH 5,0
- ditambah buffer asetat pH 5 sebanyak 1,0 mL
- ditambah 1,5 g tepung agar
- diaduk hingga merata dan dididihkan

Larutan PDA

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

Media Padat

2.2. Media Cair

1,0 g Tepung Kulit

- dimasukkan dalam beaker glass 1000 mL
- ditambahkan bahan-bahan sebagai berikut: 0,25 g pepton; 0,15 g urea; 0,1 g KH_2PO_4; 0,15 g $CaCl_2$; 0,1 g tween-80; 0,7 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,15 g $MgSO_4.7H_2O$, 0,5 mL unsur renik.
- diaduk

Larutan Campuran

- diatur pada pH 5,0
- ditambah buffer asetat pH 5,0 sebanyak 4,0 mL
- dibuat larutan sebanyak 500 mL
- diaduk
- dipanaskan sampai mendidih
- dipipet 10 mL dan dimasukkan dalam erlemeyer
- ditutup dengan kapas
- disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121 ^oC dan
- tekanan 15 psi

Media Cair

3. Penanambiakan Murni *Trichoderma viride*

Kultur Murni *T. viride*

- dipindahkan dengan jarum ose secara aseptis ke dalam media padat
- ditutup dengan kapas
- diinkubasi selama 5 hari pada temperatur 30 ^oC

Hasil Biakan *T. viride*

4. Pembuatan Inokulum

Hasil Biakan *T. viride*

- disuspensikan dalam 10 mL akuades steril
- diambil masing-masing 2 mL dan dimasukan dalam 3 buah erlenmeyer yang masing-masing berisi 13 mL media cair
- diinkubasi pada temperatur kamar sampai pertengahan fase logaritma

Larutan Inokulum

5. Produksi Enzim

Larutan Inokulum

- dipindah secara aseptis masing-masing ke dalam 2 buah erlenmeyer yang berisi 150 mL media cair steril
- diinkubasi dalam shaker pada temperatur kamar sampai mencapai awal fase stasioner

Hasil Produksi Enzim

6. Isolasi Enzim

Hasil Produksi Enzim

- ditambahkan masing-masing 15,0 mL buffer asetat pH 5,0 pada erlenmeyer
- disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4 ^{o}C

Ekstrak Kasar Xilanase

7. Tahap Analisis Gula Pereduksi

7.1. Penentuan panjang gelombang maksimum Nelson-Somogyi

1,0 mL larutan Glukosa Standar 50 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 Somogyi
- dikocok sampai semua endapan Cu_2O 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

7.2. Pembuatan Kurva Baku Larutan Gula Pereduksi

1,0 mL Larutan Baku Glukosa
(0, 10,15, 20, 25, 30, 35) 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 Somogyi

- dikocok sampai semua endapan Cu_2O 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

7.3. Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase

1 % Substrat Xilan (b/v)

- dipipet masing-masing sebanyak 1,0 mL ke dalam 6 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada T = 60 ^oC selama 15 menit
- ditambahkan 1,0 mL ekstrak kasar xilanase
- ditambah buffer asetat pH 5,0 sebanyak 1,0 mL
- diinkubasi pada temperatur 60 ^oC selama 55 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-Somogyi

Data

8. 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_2O 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

9. Pembuatan Pereaksi Biuret

0,0750 g $CuSO_4.5\ H_2O$ | 0,3000 g KNa-tartrat

- dilarutkan dengan sedikit akuades
- ditambahkan 15,0 mL NaOH 10 %
- dikocok sampai homogen
- diencerkan sampai 50 mL

Pereaksi Biuret

10. Pembuatan Kurva Baku BSA (Bovin Serum Albumin)

Larutan stok BSA 10000 ppm

- diencerkan menjadi (9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000 dan 1000) ppm dalam labu ukur 10 ml

Larutan stok BSA dengan berbagai konsentrasi

- dipipet masing-masing 0,500 ml
- dimasukkan dalam 9 tabung reaksi yang berbeda-beda
- ditambah 2,000 ml pereaksi biuret
- dikocok sampai homogen dan didiamkan selama 30 menit
- diukur absorbansinya masing-masing pada λ maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis.

Data

– dibuat kurva hubungan antara konsentrasi (ppm) dan absorbansi (A)
- ditentukan persamaan garis regresi liniernya

Kurva baku BSA

11. Penentuan Kadar Protein Xilanase

0,500 ml larutan ekstrak kasar xilanase

- dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda
- ditambah 2,000 ml pereaksi biuret
- dikocok sampai homogen
- didiamkan selama 30 menit.

Campuran xilanase dan biuret

- diukur absorbansinya pada λ maksimum dengan spektrofotometer UV- Vis
- diplot pada kurva standar

Kadar protein

12. Penentuan Nilai Vm dan K_M

Substrat Xilan (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0) %

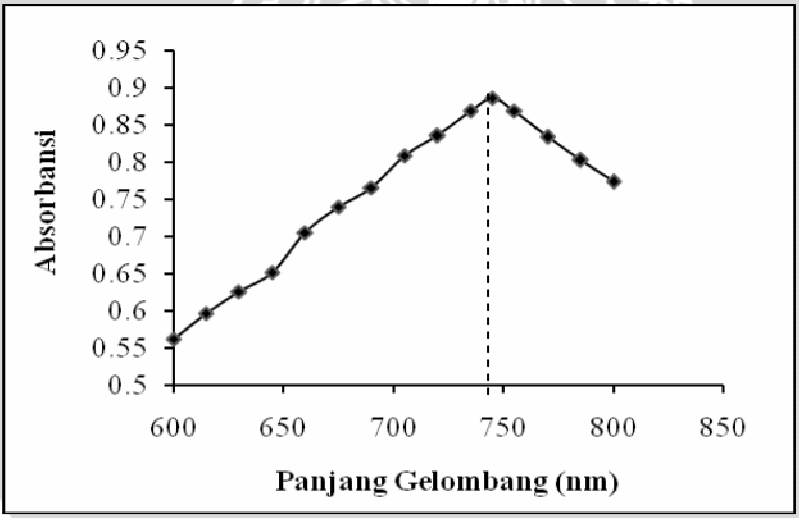
- dipipet masing-masing sebanyak 1,0 mL ke dalam 5 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada T = 60 ^oC selama 15 menit
- ditambahkan 1,0 mL ekstrak kasar xilanase
- ditambah buffer asetat pH 5 sebanyak 1,0 mL
- diinkubasi pada temperatur optimum 60 ^oC dan waktu inkubasi 55 menit
- dimasukkan masing-masing tabung dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar dan dianalisis kadar gula pereduksi dengan metode Nelson- Somogy

Data

Lampiran 6. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Gula Pereduksi

Tabel L.6. Absorbansi Larutan Standar Glukosa 40 ppm pada λ = 600 – 800 nm

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
600	0,5621	720	0,8355
615	0,5966	735	0,8689
630	0,6258	**745**	**0,887**
645	0,6521	755	0,8691
660	0,7053	770	0,8341
675	0,7398	785	0,8027
690	0,7652	800	0,7732
705	0,8087		

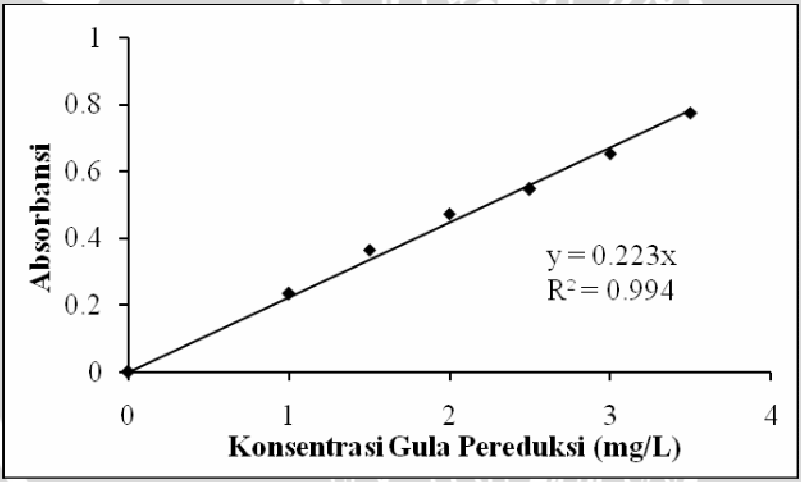


Gambar L.6. Spektrum Absorbsi Larutan Standar Glukosa 40 ppm pada λ = 600 – 800 nm

Lampiran 7. Pembuatan Kurva Standar Gula Pereduksi

Tabel L.7. Absorbansi Larutan Standar Glukosa pada λ : 745 nm

Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi		
	I	II	Rata-rata
0	0	0	0
1	0,232	0,234	0,233
1,5	0,366	0,362	0,364
2	0,475	0,471	0,473
2,5	0,544	0,548	0,546
3	0,652	0,654	0,653
3,5	0,775	0,777	0,776

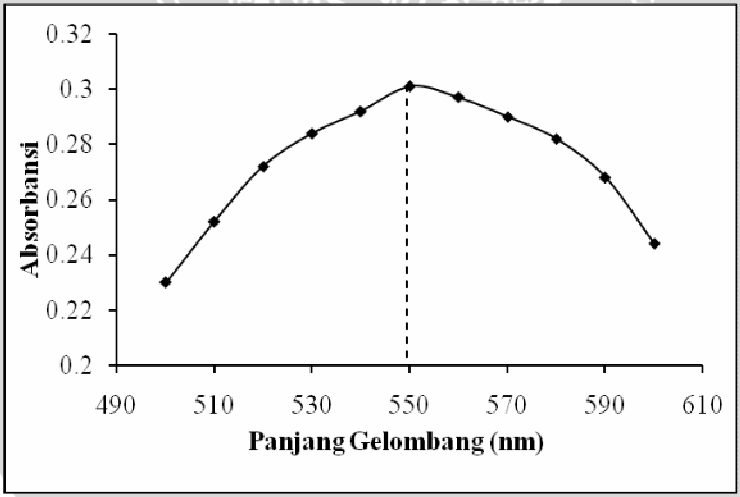


Gambar L.7. Kurva Standar Larutan Standar Glukosa pada λ : 745 nm

Lampiran 8. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum BSA

Tabel L.8. Absorbansi Larutan Standar BSA 1000 ppm pada λ = 500 – 600 nm

λ (nm)	Absorbansi		
	I	II	Rata-rata
500	0,231	0,229	0,230
510	0,252	0,252	0,252
520	0,272	0,272	0,272
530	0,284	0,284	0,284
540	0,292	0,292	0,292
550	0,301	0,301	0,301
560	0,297	0,297	0,297
570	0,292	0,288	0,290
580	0,284	0,280	0,282
590	0,268	0,268	0,268
600	0,244	0,244	0,244

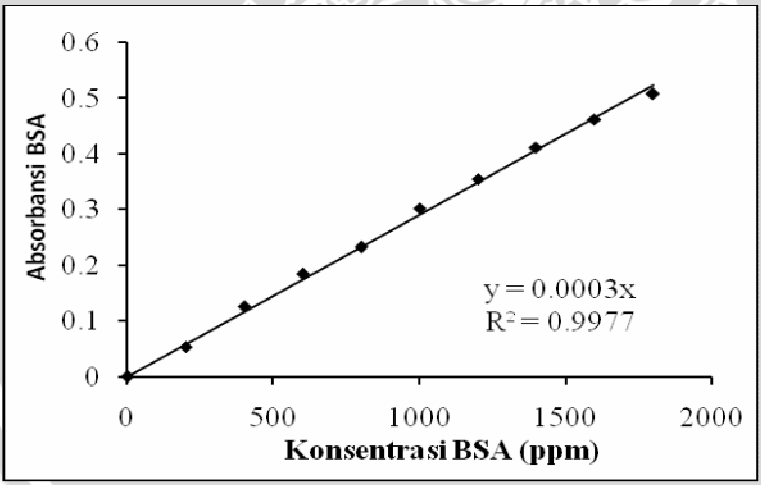


Gambar L.8. Kurva Penentuan Panjang Gelombang Maksimum BSA

Lampiran 9. Kurva Baku Bovin Serum Albumin (BSA)

Tabel L.9. Absorbansi Bovin Serum Albumin (BSA) pada λ = 550 nm

[BSA] (ppm)	A1	A2	A rata-rata
0	0	0	0
200	0,055	0,051	0,053
400	0,126	0,124	0,125
600	0,187	0,181	0,184
800	0,236	0,220	0,233
1000	0,303	0,301	0,302
1200	0,356	0,354	0,355
1400	0,415	0,411	0,412
1600	0,464	0,451	0,463
1800	0,511	0,505	0,508



Gambar. L.9. Kurva Baku Bovin Serum Albumin (BSA)

Lampiran 10. Penentuan Aktivitas, kadar protein dan aktivitas spesifik Ekstrak Kasar Xilanase

L.10.1 Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase

Data Absorbansi Gula Pereduksi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Tabel L.10.1. Absorbansi Gula Pereduksi

Sumber Xilan	Serapan			Serapan Rata-rata
	I	II	III	
Kulit Jagung	0,6989	0,7013	0,7081	0,7028
Kulit Apel	0,5527	0,5523	0,5519	0,5523
Kulit Melon	0,4729	0,4659	0,4771	0,4719
Kulit Pisang	0,3658	0,3569	0,3555	0,3594
Kulit Kedelai	0,4701	0,4629	0,4563	0,4631

Tabel L.10.2. Data Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase

Induser	Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase (Unit)			Aktivitas Rata-rata (Unit)
	I	II	III	
Kulit Jagung	17,0949	17,1537	17,3200	17,1896 ± 0,1167
Kulit Apel	13,5189	13,5092	13,4994	13,5092 ± 0,0978
Kulit Melon	11,5670	11,3958	11,6698	11,5442 ± 0,1384
Kulit Pisang	8,9474	8,7297	8,6955	8,7909 ± 0,1366
Kulit Kedelai	1,1498	1,1323	1,1161	1,1327 ± 0,0169

L.10.2 Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Xilanase dengan Metode Spektrofotometri menggunakan reagen Biuret

Tabel L.10.3. Absorbansi Protein

Sumber Xilan	Serapan			Serapan Rata-rata
	I	II	III	
Kulit Jagung	0,0739	0,0692	0,0781	0,0737
Kulit Apel	0,2807	0,2955	0,268	0,2814
Kulit Melon	0,1063	0,1135	0,0898	0,1032
Kulit Pisang	0,2471	0,2578	0,2715	0,2588
Kulit Kedelai	0,1056	0,1239	0,1146	0,1147

Tabel L.10.4. Data Kadar Protein

Sumber xilan	[Protein] (µg/mL)			[Protein] rata-rata (µg/mL) Rata-rata
	I	II	III	
Kulit Jagung	1,2317	1,1533	1,3017	1,2289 ± 0,0741
Kulit Apel	4,6783	4,925	4,4667	4,69 ± 0,2291
Kulit Melon	1,7717	1,8917	1,4967	1,72 ± 0,2025
Kulit Pisang	4,1183	4,2967	4,525	4,3133 ± 0,2038
Kulit Kedelai	1,76	2,065	1,91	1,9117 ± 0,1525

L.10.3 Penentuan Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Xilanase

Tabel L.10.5. Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Xilanase

Sumber xilan	Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Xilanase (Unit)			Aktivitas Spesifik (Unit) rata-rata
	I	II	III	
Kulit Jagung	13,8792	14,8736	13,3057	14,0195 ± 0,7876
Kulit Melon	6,5288	6,0241	7,7971	6,7833 ± 0,9134
Kulit Apel	2,8897	2,7429	3,0222	2,8849 ± 0,1397
Kulit Pisang	2,1726	2,0317	1,9217	2,0419 ± 0,1258
Kulit Kedelai	0,6533	0,5483	0,5843	0,5953 ± 0,0533

Lampiran 11. Data Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase terhadap Pengaruh Konsentrasi Substrat Xilan.

Data Pengukuran Absorbansi Gula Pereduksi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Tabel L.11.1. Absorbansi Gula Pereduksi Terhadap Konsentrasi Substrat Xilan

Konsentrasi Substrat (%) (b/v)	Serapan			Serapan rata-rata
	I	II	III	
0,1	0,5086	0,5153	0,5232	0,5157
0,5	0,6568	0,6708	0,6617	0,6631
1,0	0,7005	0,6977	0,6978	0,6987
1,5	0,3519	0,3528	0,3531	0,3526
2,0	0,3549	0,3519	0,3569	0,3546

Tabel L.11.2. Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase terhadap Konsentrasi Substrat Xilan

Konsentrasi Substrat (%) (b/v)	Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase (Unit)			Aktivitas rata-rata (Unit)
	I	II	III	
0,1	12,4403	12,6042	12,7974	12,6139
0,5	16,0652	16,4077	16,1851	16,2193
1,0	17,1342	17,0656	17,0681	17,0893
1,5	17,2149	17,2588	17,2736	17,2491
2,0	17,3616	17,2149	17,4595	17,3453

Lampiran 12. Perhitungan

L.12.1 Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase

Satuan dari aktivitas enzim adalah Unit. Satu Unit adalah banyaknya µg gula pereduksi yang dapat dihasilkan oleh 1 mL enzim dalam waktu 1 menit. Pengukuran aktivitas xilanase dihitung mengunakan persamaan berikut :

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

di mana:

AE = aktivitas enzim (µg/mL.menit)
x = konsentrasi gula pereduksi (µg/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 xilanase dari sumber xilan kulit jagung pada pH 5,0 dengan data sebagai berikut:

Absorbansi = 0,6989
p = 1 mL
V = volume substrat (1 mL) + volume buffer asetat (1 mL) + volume ekstrak kasar enzim (1 mL)
= 3 mL
q = 55 menit
fp = 100 kali

Berdasarkan kurva standar gula pereduksi diperoleh persamaan linier y = 0,223 x, sehingga:

0,6989 = 0,223 x
x = 3,1341 µg/mL

$$AE = \frac{3{,}1341\ \mu g/mL \times 3\ mL \times 100}{1\ mL \times 55\ menit}$$

= 17,0949 µg/mL.menit

L.12.2 Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Xilanase

Kadar protein xilanase ditentukan dengan metode biuret secara spektrofotometri visibel. BSA digunakan sebagai protein standar. Data hasil pengukuran absorbansi protein diplotkan ke dalam kurva standar BSA.

Persamaan kurva standar BSA adalah Y = 0,0003 X
Volume larutan yang dianalisis = 0,500 mL
Volume pereaksi Biuret = 2,000 mL
Volume total sampel = 2,500 mL

Contoh :
Pengukuran kadar protein ekstrak kasar xilanase dengan absorbansi 0,0739 adalah:

$$Y = 0{,}0003\ X$$

$0{,}0739 = 0{,}0003\ X$ $\quad$ $X = 246{,}333$ ppm

Konsentrasi ekstrak kasar xilanase = 246,333 ppm
= 246,333 mg/L = $246{,}333.\ 10^{-3}$ mg/L

$$\text{Kadar protein} = 246{,}333.\ 10^{-3}\ \text{mg/L} \cdot \frac{5{,}00\ \text{mL}}{1{,}00\ \text{mL}}$$

Kadar protein ekstrak kasar xilanase = = 1,2317 mg/L

L.12.3 Penentuan Aktivitas Spesifik xilanase

Setelah didapatkan kadar protein dan aktivitas enzim, maka dapat dihitung aktivitas spesifik xilanase dengan rumus :

$$\textit{Aktivitas Spesifik} = \frac{\textit{Aktivitas}}{\textit{protein kadar}}$$

Contoh perhitungan :
Ekstrak kasar xilanase
Aktivitas = 170,9499 Unit
Kadar protein = 1,2317 mg/mL

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{17{,}0949\ \mu\text{gmL}^{-1}.\ \text{menit}^{-1}}{1{,}2317\ \text{mg.mL}^{-1}}$$

$$= 13{,}8792\ \mu\text{g.mg}^{-1}.\text{menit}^{-}$$

Lampiran 13. Analisis Statistika

L.13.1 Uji Statistik terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase

Data aktivitas ekstrak kasar xilanase dianalisis menggunakan pola rancangan acak lengkap

Tabel L.13.1. Penentuan F_{hitung} pada Variasi Sumber Xilan

Sumber xilan	Aktivitas			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
Kulit Jagung	17,0949	17,1537	17,3200	51,5687	17,1896 ± 0,1167
Kulit Apel	13,5189	13,5092	13,4994	40,5275	13,5092 ± 0,0978
Kulit Melon	11,5671	11,3958	11,6698	34,6327	11,5442 ± 0,1384
Kulit Pisang	8,9474	8,7297	8,6955	26,3726	8,7909 ± 0,1367
Kulit Kedelai	1,1499	1,1323	1,1161	3,3982	1,1327 ± 0,0169

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

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n}(Yij)\right]^2}{n.p} = \frac{6208,295}{15} = 413,8863$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)
   a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n}(Yij)^2\right] - FK \quad = 2069,532 - 413,8863$$

$$= 1655,646$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{\left[\sum_{i=1}^{p}\left(\sum_{j=1}^{n} Yij\right)^2\right]}{n_i} - FK = 2069{,}432 - 413{,}8863$$

$$= 1655{,}545$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 1655{,}646 - 1655{,}545$$

$$= 0{,}1005$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. KT Perlakuan $= \frac{JKP}{dB\ perlakuan} = \frac{1655{,}545}{4} = 413{,}8863$

b. KT Galat percobaan $= \frac{JKG}{dB\ percobaan} = \frac{0{,}1005}{10} = 0{,}01$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{413{,}8863}{0{,}01} = 41193{,}9766$$

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

Karena $F_{hitung} > F_{tabel}$, maka H_o ditolak, artinya variasi sumber xilan berpengaruh terhadap aktivitas ekstrak kasar xilanase. Untuk mengetahui sumber xilan mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas ekstrak kasar xilanase, maka dilakukan uji BNT dengan α = 0,05.

$$BNT_{5\ \%} = t_{(\alpha/2;\ dB)} \times (2KTG/n)^{0,5}$$
$$= t(0{,}025;\ 10) \times (2 \times 0{,}01/3)^{0,5}$$
$$= 2{,}228 \times 0{,}0817 = 0{,}1819$$

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

FK	413,8863
JKT	1655,646
JKP	1655,545
JKG	0,1005
KTP	413,8863
KTG	0,01
Fhitung	41193,9766
Ftabel 5 %	3,48
BNT 5 %	0,1819

Tabel L.13.2. Data uji BNT 5 % Aktivitas Xilanase terhadap Pengaruh Sumber Xilan

Sumber Xilan	rataan	Kulit Kedelai	Kulit Pisang	Kulit Melon	Kulit Apel	Kulit Jagung
		1,1327	8,7909	11,5442	13,5092	17,1896
Kulit Kedelai	1,1327	0	7,6581*	10,4115*	12,3764*	16,0583 *
Kulit Pisang	8,7909		0	2,7534*	4,7183*	8,3987*
Kulit Melon	11,5442			0	1,9649*	5,6454*
Kulit Apel	13,5092				0	3,6084*
Kulit Jagung	17,1896					0

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

L.13.2. Uji Statistik terhadap Kadar Protein Ekstrak Kasar Xilanase

Data kadar protein ekstrak kasar xilanase dianalisis menggunakan pola rancangan acak lengkap

Tabel L.13.3. Penentuan F_{hitung} pada Variasi Sumber Xilan

Sumber xilan	Kadar (µg/mL)			Jumlah	Kadar Rataan (µg/mL)
	I	II	III		
Kulit Jagung	1,2317	1,1533	1,3017	3,6867	1,2289 ± 0,0741
Kulit Apel	4,6783	4,925	4,4667	14,07	4,69 ± 0,2291
Kulit Melon	1,7717	1,8917	1,4967	5,1601	1,72 ± 0,2025
Kulit Pisang	4,1183	4,2967	4,525	12,94	4,3133 ± 0,2038
Kulit Kedelai	1,76	2,065	1,91	5,735	1,912 ± 0,1525

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

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n}(Yij)\right]^2}{n.p} = \frac{438,5171}{15} = 29,2345$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)
   a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n}(Yij)^2\right] - FK = 146,5003 - 29,2345$$

$$= 117,2658$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{\left[\sum_{i=1}^{p}\left(\sum_{j=1}^{n} Yij\right)^2\right]}{n_i} - FK = 146,1724 - 29,2345$$

$$= 116,9379$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

JKG = JKT – JKP = 117,2658 – 116,9379 = 0,3279

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. KT Perlakuan = $\frac{JKP}{dB\ perlakuan} = \frac{116,9379}{4} = 29,2345$

b. KT Galat percobaan = $\frac{JKG}{dB\ percobaan} = \frac{0,3279}{10} = 0,0328$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{29,2345}{0,0328} = 891,5706$$

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

Karena $F_{hitung} > F_{tabel}$, maka H_o ditolak, artinya variasi sumber xilan berpengaruh terhadap kadar protein ekstrak kasar xilanase. Untuk mengetahui sumber xilan mana saja yang berpengaruh terhadap kadar protein ekstrak kasar xilanase, maka dilakukan uji BNT dengan α = 0,05.

$$BNT_{5\ \%} = t_{(\alpha/2;\ dB)} \times (2KTG/n)^{0,5}$$
$$= t(0,025; 10) \times (2 \times 0,0328/3)^{0,5}$$
$$= 2,228 \times 0,1479 = 0,3294$$

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

FK	29,2345
JKT	117,2658
JKP	116,93796
JKG	0,3279
KTP	29,2345
KTG	0,0328
Fhitung	891,5706
Ftabel 5 %	3,48
BNT 5 %	0,3294

Tabel L.13.4. Data uji BNT 5 % Kadar Protein Ekstrak Kasar Xilanase terhadap Pengaruh Sumber Xilan

Sumber Xilan	rataan	Kulit Jagung	Kulit Melon	Kulit Kedelai	Kulit Pisang	Kulit Apel
		1,2289	1,72	1,912	4,3133	4,69
Kulit Jagung	1,2289	0	0,4911*	0,6831*	3,0844*	3,4611*
Kulit Melon	1,72		0	0,192	2,5933*	2,97*
Kulit Kedelai	1,912			0	2,4013*	2,778*
Kulit Pisang	4,3133				0	0,3767*
Kulit Apel	4,69					0

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

L.13.3 Uji Statistika terhadap Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Xilanase

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

Tabel L.13.5. Penentuan F_{hitung} pada Variasi Sumber Xilan

Sumber xilan	Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Xilanase (Unit)			Jumlah	Aktivitas Spesifik rata-rata (Unit)
	I	II	III		
Kulit Jagung	13,8792	14,8736	13,3057	42,0584	14,0195 ± 0,7876
Kulit Apel	2,8897	2,7429	3,0222	8,6549	2,8849 ± 0,1397
Kulit Melon	6,5288	6,0241	7,797	20,3499	6,7833 ± 0,9134
Kulit Pisang	2,1726	2,0317	1,9216	6,1259	2,0419 ± 0,1258
Kulit Kedelai	0,6533	0,5483	0,5843	1,7859	0,5953 ± 0,0534

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

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n}(Yij)\right]^2}{n.p} = \frac{2298,651}{15} = 153,2434$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)
   a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n}(Yij)^2\right] - FK = 769,0939 - 153,2434$$

$$= 615,8505$$

c. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{\left[\sum_{i=1}^{p}\left(\sum_{j=1}^{n} Yij\right)^2\right]}{n_i} - FK = 766{,}217 - 153{,}2434$$

$$= 612{,}9736$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 615{,}8505 - 612{,}9736$$

$$= 2{,}8769$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. KT Perlakuan $= \frac{JKP}{dB\ perlakuan} = \frac{612{,}9736}{4} = 153{,}2434$

b. KT Galat percobaan $= \frac{JKG}{dB\ percobaan} = \frac{2{,}8769}{10} = 0{,}2877$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{153{,}2434}{0{,}2877} = 532{,}6555$$

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

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

$$BNT_{5\ \%} = t_{(\alpha/2;\ dB)} \times (2KTG/n)^{0,5}$$

$$= t(0{,}025;\ 10) \times (2 \times 0{,}2877/3)^{0,5}$$

$$= 2{,}228 \times 0{,}4379 = 0{,}9757$$

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

FK	153,2434
JKT	615,8505
JKP	612,9736
JKG	2,8769
KTP	153,2434
KTG	0,2877
Fhitung	532,6555
Ftabel 5 %	3,48
BNT 5 %	0,9757

Tabel L.13.6. Data uji BNT 5 % Aktivitas Spesifik Xilanase terhadap Pengaruh Sumber Xilan

Sumber xilan	rataan	Kulit Kedelai	Kulit Pisang	Kulit Apel	Kulit Melon	Kulit Jagung
		0,5953	2,0419	2,8849	6,7833	14,0195
Kulit Kedelai	0,5953	0	1,4466*	2,2896*	6,188*	13,4242*
Kulit Pisang	2,0419		0	0,843	4,7414*	11,9775*
Kulit Apel	2,8849			0	3,8984*	11,1346*
Kulit Melon	6,7833				0	7,2362*
Kulit Jagung	14,0195					0

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

Lampiran 14. Surat Keterangan Identifikasi Sumber Xilan

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS MIPA JURUSAN BIOLOGI
LABORATORIUM TAKSONOMI & STRUKTUR PERKEMBANGAN TUMBUHAN
Jl. Veteran Telp. (0341) 575840, 575841, 575842 Pes. 313 Fax. (0341) 554402 Malang 65145

05 NOV 2008

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI
Nomor : 009 /J10.1.28.II/takso.Ident/04/2008

Ketua Laboratorium Taksonomi dan Struktur Perkembangan Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, dengan ini menerangkan bahwa specimen tanaman yang dibawa oleh:

N a m a	: **Dian Mayasari**
N I M	: 0410923012
Fak./Jurusan	: MIPA-Kimia
Institusi	: Universitas Brawijaya

Berdasarkan pada deskripsi dan buku "*Flora of Java*" karangan C.A. BACKER (1968) diidentifikasi sebagai :

1.	Familia/Suku	: POACEAE (Jilid 3 : Halaman 625)
	M a r g a	: Zea
	Spesies	: *Zea mays* L.
2.	Familia/Suku	: CUCURBITACEAE (Jilid 1 : Halaman 301)
	M a r g a	: Cucumis
	Spesies	: *Cucumis melo* L.
3.	Familia/Suku	: FABACEAE (Jilid 1 : Halaman 625)
	M a r g a	: Glycine
	Spesies	: *Glycine soja* (L.) Sieb. & Zucc.
4.	Familia/Suku	: MUSACEAE (Jilid 3 : Halaman 36)
	M a r g a	: Musa
	Spesies	: *Musa paradisiaca* L.
5.	Familia/Suku	: ROSACEAE (Jilid 1: Halaman 512)
	M a r g a	: Pyrus
	Spesies	: *Pyrus malus* L.

Demikian, Surat Keterangan Identifikasi ini dibuat untuk dipergunakan seperlunya.

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL UNIVERSITAS BRAWIJAYA F-MIPA JURUSAN BIOLOGI

Malang, 5 November 2008
Ketua Laboratorium

RODLIYATI AZRIANINGSIH, PhD
NIP. 132 126 050