

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR
XILANASE DARI *Aspergillus niger***

SKRIPSI

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

oleh :

**SUJARWO
0210920038-92**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI
ISOLASI DAN KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR
XILANASE DARI *Aspergillus niger*

oleh :
Sujarwo
0210920038-92

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

Pembimbing I

Pembimbing II

Drs. Sutrisno, M.Si
NIP. 131 879 407

Arie Srihardyastuti., Ssi., M.Kes
NIP 132 300 238

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sasangka P, MS
NIP. 131 654 134

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Sujarwo
NIM : 0210920038-92
Jurusan : Kimia
Penulisan skripsi berjudul :

“Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Xilanase dari
Aspergillus niger”

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 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 saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Pebruari 2008
Yang menyatakan,

(Sujarwo)
NIM. 0210920038-92

ISOLASI DAN KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR XILANASE DARI *Aspergillus niger*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi ekstrak kasar xilanase, hasil isolasi dari *Aspergillus niger* dengan induser jerami padi, menggunakan substrat xilan. Karakterisasi enzim xilanase meliputi kondisi optimum laju enzim dan parameter kinetika reaksi enzimatik. Produksi ekstrak kasar enzim dilakukan dengan cara menginokulasikan *Aspergillus niger* dalam media cair, kemudian diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 150 rpm pada temperatur kamar dan diisolasi pada jam ke-60. Isolasi ekstrak kasar enzim menggunakan metode sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada pH 5, temperatur 4 °C. Ekstrak kasar enzim yang dihasilkan sebesar 400 mL. Aktivitas xilanase diukur pada variasi pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0), temperatur (40, 45, 50, 55, 60) °C dan waktu inkubasi (40, 45, 50, 55, 60) menit. Gula pereduksi yang terbentuk ditentukan dengan metode Nelson Somogyi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase dalam menghidrolisis xilan menjadi gula pereduksi terjadi pada pH 8,0, temperatur 55 °C dan waktu inkubasi selama 55 menit dengan aktivitas sebesar $(22,6054 \pm 1,1655)$ unit, sedangkan V_m dan K_M yang dihasilkan masing-masing sebesar 27,25 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$ dan K_M 0,4251%.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CRUDE XYLANASE FROM *Aspergillus niger*

ABSTRACT

The aim of this research is to characterize crude xylanase, which can be produced by *Aspergillus niger* with rice straw as inducer, using xylan substrat. Production of crude xylanase was done by inoculating *Aspergillus niger* in the liquid medium, which was incubated on shaker for 60 hours. The crude xylanase was then isolated using centrifuge 3000 rpm at pH 5,0 and temperature 4 °C for 30 minutes, resulting in 400 mL crude xylanase. Characterization of xylanase included optimum condition of enzyme activity and kinetic parameter of enzymatic reaction. Xylanase activity was measured at various pH (5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0), temperature (40, 45, 50, 55, 60) °C and the incubation period (40, 45, 50, 55, 60) minutes. The produced reducing sugar was determined by Nelson-Somogyi method. The result showed that the optimum condition of xylanase activity in hydrolyzing xylan to reducing sugar occurred at pH 8.0, temperature 55°C and incubation time at 55 minutes within the activity of $(22,6054 \pm 1,1655)$ unit, while V_m and K_M were 27.8552 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{minutes}$ and 0,4251% respectively.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala kuasa dan karuniaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “ISOLASI DAN KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR XILANASE DARI *Aspergillus niger*” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi syarat dalam memperoleh gelar sarjana sains pada jenjang pendidikan Strata I Kimia MIPA Universitas Brawijaya.

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

1. Drs. Sutrisno, MSi, selaku dosen pembimbing I, yang telah mengajari, mengarahkan, memberi kritik dan saran serta dukungan dalam penyelesaian skripsi ini.
2. Arie Srihardyastuti., Ssi., M.Kes, selaku dosen pembimbing II, yang telah memberikan bimbingan, motivasi, pengarahan, kritik dan saran serta dukungan dalam penyelesaian skripsi ini.
3. M. Farid Rahman, S.Si, M.Si, selaku dosen penasihat akademik yang telah memberikan saran, arahan, masukan dan kritik selama masa studi.
4. Seluruh dosen dan staf jurusan kimia atas segala ilmu dan bantuannya.
5. Keluargaku di rumah, terima kasih atas doa dan semangat yang diberikan.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan baik dari segi materi maupun penyusunannya. Oleh karena itu, saran dan kritik dalam rangka penyempurnaan skripsi ini sangat diharapkan. Akhirnya, penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan semua pihak yang membutuhkan.

Malang, Desember 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	2
1.3. Batasan Masalah.....	2
1.4. Tujuan Penelitian.....	2
1.5. Manfaat Penelitian.....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Enzim.....	3
2.2. Enzim Xilanase.....	3
2.3. <i>Aspergillus niger</i>	4
2.4. Xilan.....	4
2.5. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Enzim.....	5
2.5.1. Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Enzim.....	5
2.5.2. Konsentrasi Substrat.....	5
2.5.3. Pengaruh pH.....	7
2.5.4. Pengaruh Temperatur.....	8
2.5.5. Waktu Inkubasi.....	8
2.6. Penentuan Kadar Gula Pereduksi dengan Metode Nelson-Somogy.....	9
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1. Tempat dan waktu penelitian.....	10
3.2. Bahan dan alat penelitian.....	10
3.2.1. Bahan penelitian.....	10
3.2.2. Bahan kimia.....	10
3.2.3. Alat penelitian.....	10
3.3. Metode penelitian.....	10

3.4. Tahapan kerja.....	11
3.5. Prosedur kerja.....	11
3.5.1. Pembuatan tepung jerami padi.....	11
3.5.2. Pembuatan media	11
3.5.2.1. Pembuatan media Padat.....	11
3.5.2.2. Pembuatan Media cair.....	12
3.5.3. Penanaman biakan Murni <i>Aspergillus niger</i>	12
3.5.4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan.....	12
3.5.5. Produksi enzim.....	12
3.5.6. Isolasi enzim Xilanase.....	13
3.5.7. Pembuatan Kurva Baku Glukosa.....	13
3.5.8. Penentuan kondisi optimum	13
3.5.8.1. Penentuan pH Optimum.....	13
3.5.8.2. Penentuan Temperatur Optimum.....	14
3.5.8.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum.....	14
3.5.8.4. Penentuan K_M dan V_{maks}	14
3.5.8.5. Analisa Data.....	14
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Kurva Pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i>	15
4.2. Isolasi Enzim Xilanase dari <i>Aspergillus niger</i>	16
4.3. Penentuan Kondisi optimum Aktivitas Enzim Xilanase dari <i>Aspergillus niger</i>	17
4.3.1. Penentuan pH optimum.....	17
4.3.2. Penentuan Temperatur optimum.....	20
4.3.3. Penentuan Waktu inkubasi optimum.....	21
4.3.4 Penentuan K_M dan V_{maks}	23
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan.....	25
5.2. Saran.....	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	30

DAFTAR TABEL

Tabel L.6.	Data berat kering sel pada berbagai waktu.....	49
Tabel L.8.	Data absorbansi kurva standar larutan gula pereduksi.....	51
Tabel L.9.1.	Data serapan gula pereduksi.....	52
Tabel L.9.2.	Data Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim xilanase.....	52
Tabel L.10.1.	Data serapan gula pereduksi erhadap pengaruh pH.....	53
Tabel L.10.2.	Serapan gula pereduksi terhadap pengaruh Temperatur.....	53
Tabel L.10.3.	Serapan gula pereduksi terhadap pengaruh Waktu inkubasi.....	53
Tabel L.10.4.	Serapan gula pereduksi terhadap pengaruh Konsentrasi substrat xilan.....	54
Tabel L.12.1.	Perlakuan ph terhadap Aktivitas ekstrak Kasar Xilanase.....	56
Tabel L.12.2.	Data perlakuan Temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim.....	56
Tabel L.12.3.	Data perlakuan waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim.....	56
Tabel L.12.4.	Data perlakuan konsentrasi substrat xilan terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim.....	57
Tabel L.13.1.	Penentuan F_{hitung} pada variasi pH.....	58
Tabel L.13.2.	Data uji BNT 5 % terhadap pengaruh pH.....	60
Tabel L.13.3.	Penentuan F_{hitung} pada variasi temperatur.....	60
Tabel L.13.4.	Data uji BNT 5% terhadap pengaruh temperatur.....	62
Tabel L.13.5.	Penentuan F_{hitung} pada variasi waktu inkubasi.....	62
Tabel L.13.6.	Data uji BNT 5 % terhadap pengaruh waktu inkubasi.....	64

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur xilananase.....	4
Gambar 2.2.	Struktur xilan.....	5
Gambar 2.3.	Grafik hubungan antara konsentrasi enzim terhadap laju reaksi enzimatik.....	5
Gambar 2.4.	Grafik hubungan antara konsentrasi substrat terhadap laju reaksi enzimatik.....	6
Gambar 2.5.	Grafik Lineweaver-Burk.....	7
Gambar 2.6.	Grafik pengaruh pH terhadap laju reaksi.....	8
Gambar 2.7.	Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas enzim.....	8
Gambar 4.1.	Kurva Pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i>	16
Gambar 4.2.	Kurva pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilananase.....	17
Gambar 4.3.	Mekanisme reaksi enzimatik antara enzim xilananase dengan substrat xilan.....	19
Gambar 4.4.	Kurva pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas ekstrak kasar enzim xilananase.....	20
Gambar 4.5.	Kurva pengaruh waktu inkubasi terhadap Aktivitas ekstrak kasar enzim xilananase.....	22
Gambar 4.6.	Kurva pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilananase.....	23
Gambar 4.7.	Kurva hubungan $1/[S]$ terhadap $1/V$	24

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Komposisi media pertumbuhan.....	30
Lampiran 2.	Preparasi larutan.....	31
Lampiran 3.	Perhitungan harga pH buffer asetat 0,2 M.....	33
Lampiran 4.	Tahapan kerja.....	34
Lampiran 5.	Skema kerja.....	35
Lampiran 6.	Pembuatan kurva pertumbuhan kapang <i>Aspergillus niger</i>	49
Lampiran 7.	Penentuan panjang gelombang maksimum larutan gula pereduksi.....	50
Lampiran 8.	Pembuatan kurva standar gula pereduksi	51
Lampiran 9.	Data serapan gula pereduksi dalam uji aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase.....	52
Lampiran 10.	Data pengukuran serapan gula pereduksi dari berbagai perlakuan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.....	53
Lampiran 11.	Pengukuran aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase.....	55
Lampiran 12.	Data aktivitas ekstrak kasar emzim xilanase...	56
Lampiran 13.	Analisis statistika.....	58

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Xilanase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ikatan xilosidik pada xilan menjadi xilo oligosakarida dan xilosa yang selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai gula pereduksi. Enzim xilanase dapat dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme seperti: *Trichoderma viride*, *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Humicola* (Haltrich *et al.*, 1996). Pemanfaatan enzim 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).

Xilan merupakan polimer xilosa yang berikatan β -1,4 dengan jumlah monomer 30-100 unit (Schlegel dan Schmidt, 1994). Xilan mempunyai konformasi yang sama dengan selulosa dan mampu berasosiasi secara kuat dengan polisakarida lainnya. Sebagai pengganti xilan digunakan jerami padi. Komposisi jerami padi sebagian besar merupakan polisakarida, sehingga dapat digunakan sebagai sumber karbon pada media pertumbuhan kapang. Jerami padi mengandung selulosa 34,6%, hemiselulosa 30,4%, lignin 6,3% (Muller, 1978 dalam Pearce, 1983).

Aspergillus niger merupakan salah satu kapang yang banyak digunakan dalam kultivasi media padat. *Aspergillus niger* dapat tumbuh optimum pada kisaran temperatur 25-30°C, tetapi dapat tumbuh optimum pada temperatur yang lebih tinggi dan pada temperatur 32°C pertumbuhan *Aspergillus niger* lebih baik dibandingkan pada temperatur 28°C, sehingga dapat merombak serat kasar lebih baik (Fraizier dan Westhoff, 1983)

Aspergillus niger dapat tumbuh pada media yang banyak mengandung nutrien polisakarida, yang berfungsi sebagai sumber karbon. Polisakarida dapat diperoleh dari jerami padi. Kapang *Aspergillus niger* menurut Hettenhaus (2002) dapat menghasilkan enzim xilanase ekstraselular yang dapat ditumbuhkan pada 50% dedak padi.

Kondisi lingkungan yang meliputi pH, temperatur dan waktu inkubasi dapat mempengaruhi aktivitas xilanase. Selain itu aktivitas xilanase juga dipengaruhi jenis mikroorganisme dan konsentrasi

substrat yang digunakan. *A. Oryzae* NRRL 3485 mampu menghidrolisis xilan menjadi gula pereduksi pada kondisi pH 6,5 dengan temperatur 65°C dan *A. poenicis* ATCC 13157 mampu menghidrolisis xilan menjadi gula pereduksi pada pH 5 dan temperatur 55°C (Bailey, M. J., 1993). Dengan demikian, enzim xilanase yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus niger* dengan induser jerami padi, perlu dikarakterisasi menggunakan substrat xilan agar diketahui aktivitas maksimumnya. Penggunaan xilanase untuk hidrolisis ikatan xilosidik merupakan cara yang lebih baik dan menguntungkan karena kondisi lingkungan yang memengaruhi aktivitas enzim dapat diatur untuk menghasilkan hidrolisat yang banyak mengandung gula pereduksi. Kondisi tersebut adalah pH, temperatur, konsentrasi substrat, dan waktu inkubasi.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana kondisi optimum xilanase hasil isolasi dari *Aspergillus niger* (pH, temperatur, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi) serta konstanta kinetika yaitu laju reaksi maksimum (V_{maks}) dan konstanta Michaelis – Menten (K_M).

1.3 Batasan Masalah

Dalam penelitian ini digunakan ekstrak kasar enzim xilanase dari kapang *Aspergillus niger*. Kondisi optimum aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase yang dipelajari meliputi pH, temperatur, waktu inkubasi dan konsentrasi substrat dengan induser dan sumber karbon berupa jerami padi jenis IR 64 yang berasal dari daerah Karang Ploso Malang.

1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik enzim xilanase (kondisi optimum enzim xilanase meliputi: pH, temperatur, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi) dan konstanta kinetika (V_{maks} dan K_M).

1.5 Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini dapat memberikan informasi tentang kondisi optimum aktivitas enzim xilanase dari *Aspergillus niger*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

Enzim adalah protein yang berfungsi sebagai katalisator untuk reaksi-reaksi kimia pada sistem biologi. Tiap-tiap enzim mengkatalis sejumlah kecil reaksi, tetapi kebanyakan hanya satu reaksi (Martin, et al., 1986).

Enzim mempercepat reaksi dengan menurunkan energi aktivasi suatu reaksi, yaitu jumlah energi (kalori) yang dibutuhkan oleh satu mol senyawa pada temperatur tertentu menuju keadaan aktifnya (Strayer, 1984). Menurunnya energi aktivasi ini menyebabkan reaksi menuju tahap transisi dengan kebutuhan energi yang relatif rendah dan melewati tahap transisi untuk menghasilkan produk reaksi.

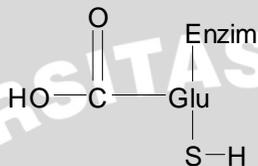
Secara umum aktifitas enzim dipengaruhi oleh kondisi lingkungan yaitu : temperatur, konsentrasi, konsentrasi substrat, pH, adanya inhibitor dan aktifator berupa kofaktor atau enzim jika berupa molekul organik (Lehninger, 1993). Dan aktifitas enzim diukur dalam satuan unit (Suharsono, 1989).

2.2 Enzim xilanase

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa yaitu xilan atau polimer dari xilosa dan xilooligosakarida. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu β -xilosidase, eksoxilanasase, dan endoxilanase, β -xilosidase, yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim akan menurun dengan meningkatnya rantai xilooligosakarida (Reilly, 1991; Dekker, 1983). Beberapa jenis bakteri dan jamur yang menghasilkan xilanase secara ekstraseluler yaitu *Clostridium acetobutylicum*, *Trichoderma viride*, *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Aureo-basidium*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Humicola* (Haltrich et al., 1996). *A. Oryzae* NRRL 3485 mampu menghidrolis xilan menjadi gula pereduksi pada kondisi pH 6,5 dengan temperatur 65°C dan *A.poenicis* ATCC 13157 mampu menghidrolisis xilan menjadi gula pereduksi pada pH 5 dan temperatur 55°C (Bailey, M. J., 1993).

Richana (2002) telah melakukan isolasi bakteri penghasil xilanase alkalofilik yang berasal dari tanah berkapur pH 7,9 yang dilakukan berdasarkan ukuran koloni pada media pertumbuhannya.

Enzim memiliki sisi aktif dengan gugus-gugus tertentu yang berperan sebagai katalis dalam pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Xilanase mempunyai gugus aktif yang dapat menghidrolisis xilan, yaitu gugus karboksil yang merupakan gugus aktif dari asam amino jenis asam glutamat (Yong eok lee, *et al.*, 1993) serta mengandung gugus sulfhidril (-SH) (Marsiati, 1995).



Gambar 2.1 Struktur Xilanase

2.3. *Aspergillus niger*

Menurut Fardiaz (1989) *Aspergillus niger* merupakan kapang dengan klasifikasi sebagai berikut :

- | | |
|-------------|----------------------------|
| Kerajaan | : Plantanum |
| Divisio | : Thallophyta |
| Sub divisio | : Eumycotina |
| Klass | : Imperfecti |
| Ordo | : Monoliaces |
| Famili | : Monoliaceae |
| Jenis | : <i>Aspergillus</i> |
| Spesies | : <i>Aspergillus niger</i> |

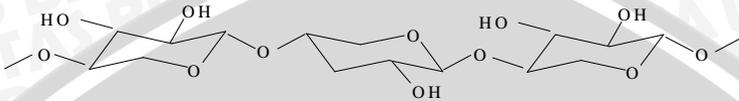
Aspergillus niger memiliki kepala pembawa konodia yang besar, bulat, dan berwarna hitam, coklat hitam atau ungu coklat. Kapang spesies ini tersebar luas di alam, dapat ditemukan dalam buah-buahan, sayuran, dan substrat yang menyediakan substrat bagi pertumbuhannya. *Aspergillus niger* dapat tumbuh dalam substrat yang mengandung kadar gula dan garam cukup tinggi serta bersifat aerob.

Aspergillus niger secara komersial banyak digunakan untuk produksi enzim. Kapang ini cukup potensial menghasilkan enzim-enzim seperti α -amilase, β -amilase, amilo glukosidase, selulase (Bangbengaars (1977) dalam Wirakartakusumah, 1987).

2.4. Xilan

Xilan tergolong karbohidrat disebut juga sebagai hemiselulosa. Rantai xilan terdiri dari β -D-xilosa yang bersambungan secara 1,4-glikosidik (Gambar 2.1). Rantai xilan bercabang, tetapi karena

derajat polimerisasinya rendah (30-100), maka strukturnya tidak terbentuk kristal, sehingga xilan larut dalam pelarut polar (Schlegel dan Schmidt, 1994).



Gambar 2.2 Struktur bangun xilan

Xilan merupakan salah satu karbohidrat yang paling banyak 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).

2.5 Faktor – faktor yang Mempengaruhi Enzim

2.5.1. Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Enzim

Pada reaksi enzimatik laju reaksinya sebanding dengan konsentrasi enzim. Hubungan ini secara matematis dapat dinyatakan sebagai berikut:

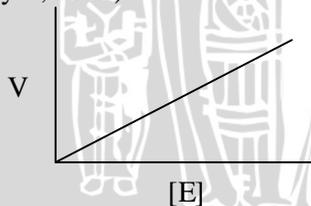
$$\text{Laju reaksi} = k [E] [S]$$

dimana: k adalah konstanta laju reaksi

$[E]$ adalah konsentrasi enzim

$[S]$ adalah konsentrasi substrat

Untuk batas-batas konsentrasi tertentu, maka hubungan antara konsentrasi dan laju reaksi dapat digambarkan sebagai berikut (Martin dan Meyes, 1983):

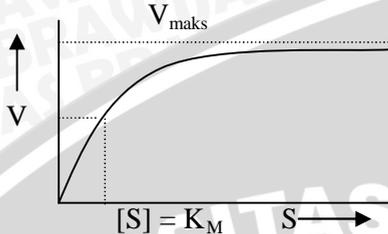


Gambar 2.3 Kurva pengaruh Konsentrasi Enzim Terhadap Laju Reaksi Enzimatik.

2.5.2. Konsentrasi Substrat

Berdasarkan persamaan kinetika enzim, jika konsentrasi enzim dijaga konstan maka laju reaksinya akan bergantung pada konsentrasi substrat. Semakin besar konsentrasi substrat, laju reaksi juga semakin meningkat. Akhirnya akan tercapai suatu titik batas,

dan setelah titik tersebut terlampaui laju reaksi meningkat sangat kecil dengan meningkatnya konsentrasi substrat (Martin, 1983).



Gambar 2.4 Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Laju awal Reaksi Enzimatik

Menurut Lehninger (1990) pada konsentrasi substrat [S] yang tinggi sedangkan konsentrasi enzim [E] konstan, enzim bebas yang terurai dari kompleks ES akan langsung berikatan dengan molekul substrat (S) lainnya sampai tercapai keadaan setimbang, dengan enzim selalu jenuh oleh substrat, dan tercapai kecepatan maksimum (gambar 2.3). Kurva kejenuhan diatas, dirumuskan dengan persamaan Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{maks}[S]}{K_M + [S]}$$

Dimana :

- V_0 = kecepatan awal
- V_{maks} = kecepatan maksimum
- K_M = konstanta Michaelis-Menten enzim bagi substrat tertentu

Persamaan Michaelis-Menten merupakan dasar bagi semua aspek kinetika kerja enzim. Jika V_{maks} dan K_M diketahui maka dengan mudah dapat dihitung kecepatan reaksi enzim pada setiap konsentrasi substrat [S] (Muchtadi dkk., 1992).

Menurut hubungan numerik yang penting ditimbulkan oleh persamaan Michaelis-Menten pada kecepatan khusus, jika kecepatan reaksi awal tepat sama dengan setengah kecepatan maksimum, yaitu $V_0 = \frac{1}{2} V_{maks}$, lalu:

$$\frac{V_{maks}}{2} = \frac{V_{maks}[S]}{K_M + [S]}$$

Jika persamaan dibagi dengan V_{maks} akan diperoleh :

$$K_M + [S] = 2[S]$$

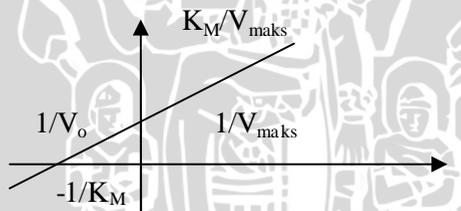
$$K_M = [S]$$

pada saat $V_0 = \frac{1}{2}V_{maks}$ (Lehninger, 1995).

Untuk menentukan nilai V_{maks} agar lebih mudah Lineweaver-Burk menyederhanakan persamaan Michaelis-Menten dengan metode kebalikan menjadi:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_m \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

Bagi enzim yang mengikuti hubungan Michaelis-Menten secara linier, pemetaan $1/V_0$ pada ordinat (sumbu y) terhadap $1/[S]$ sebagai absis (sumbu x) menghasilkan garis lurus dengan persamaan linier $y = a + bx$. Garis ini akan memiliki sudut $b = K_M/V_{maks}$, perpotongan terhadap sumbu y merupakan konstanta $a = 1/V_{maks}$, dan perpotongan $-1/K_M$ pada sumbu $1/[S]$ (Muchtadi dkk., 1992). Dengan demikian mudah diketahui nilai K_M dan V_{maks} -nya dengan mudah dan tepat. Hal ini dapat dilihat pada gambar 2.4 (Lehninger, 1995):



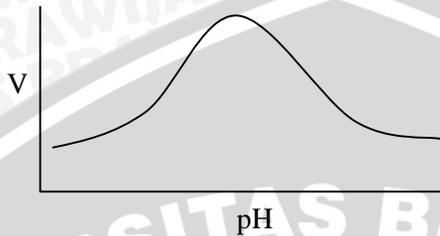
Gambar 2.5 Grafik Lineweaver-Burk (Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_0$)

2.5.3. Pengaruh pH

pH sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim, karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Enzim memiliki pH optimum yang khas yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimal (Voet dan Voet, 1990).

Didalam sel dan lingkungan sel sekelilingnya, pH dalam keadaan normal harus tetap sebab adanya perubahan menyebabkan pergeseran aktivitas enzim. Hal ini akan mempengaruhi dan

mengganggu sistem katabolitik dan anabolitik dalam sel dan jaringan (Girinda, 1993).

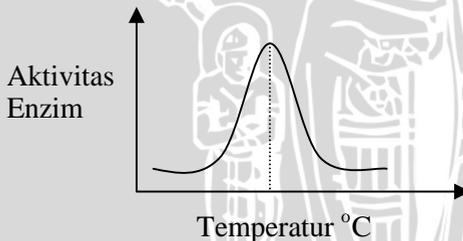


Gambar 2.6 Pengaruh pH terhadap kecepatan reaksi

2.5.4. Pengaruh Temperatur

Reaksi kimia sangat dipengaruhi oleh temperatur, maka reaksi yang dikatalis oleh enzim juga peka terhadap temperatur. Pada kisaran temperatur tertentu sesuai jenis enzim, maka kecepatan reaksi akan meningkat jika temperatur dinaikkan (Rodwell, 1988).

Apabila temperatur dinaikkan maka enzim akan mengalami denaturasi karena enzim merupakan protein, akibatnya daya kerja enzim akan menurun (Girinda, 1993). Denaturasi merupakan peristiwa penyimpangan dari sifat alamiah protein. Enzim memiliki temperatur optimum yaitu temperatur yang menyebabkan kecepatan reaksi menjadi maksimum jika konsentrasi enzim dan substrat konstan (Wirakartakusumah, 1987).



Gambar 2.7 Pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim

2.5.5 Waktu Inkubasi

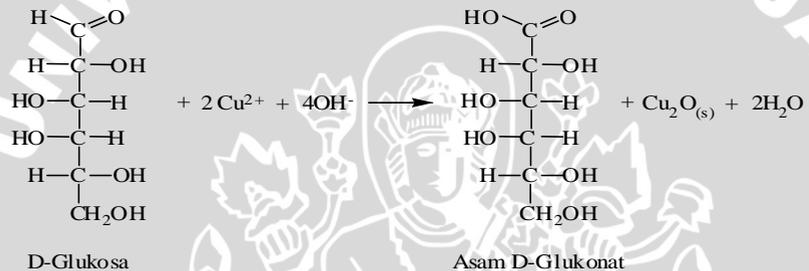
Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Waktu inkubasi ini diperlukan enzim untuk berikatan dengan substrat. Makin lama waktu inkubasi maka makin banyak enzim yang berikatan dengan substrat sehingga semakin banyak produk yang terbentuk. Tetapi bila enzim sudah jenuh dengan substrat maka

lamanya waktu inkubasi sudah tidak mempengaruhi lagi (Martin, 1983).

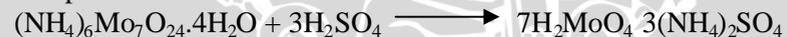
2.6 Penentuan kadar Gula Pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi

Penentuan kadar gula pereduksi dengan metode ini melibatkan dua tahap reaksi yaitu reaksi gula pereduksi dengan reagen Nelson menghasilkan produk Cu_2O berupa endapan merah bata. Kemudian reaksi yang kedua adalah antara Cu_2O dengan reagen arsenomolibdat, dimana reaksinya sebagai berikut :

Tahap I :



Tahap II :



Untuk penentuan kadar gula pereduksi digunakan persamaan Lambert-Beer, $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ (mol/liter) yang menyatakan hubungan antara besarnya serapan (A) terhadap konsentrasi gula pereduksi, dimana jika dibuat grafik hubungan A dan C merupakan garis lurus dengan kemiringan $\epsilon \cdot b$ dengan menggunakan kurva baku larutan gula pereduksi untuk sampel yang belum diketahui kadar gula pereduksinya (Underwood, 1993).

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Waktu penelitian dari bulan Mei-Agustus 2006

3.2. Bahan dan Alat penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Kultur murni *Aspergillus niger* diperoleh dari Laboratorium Biokimia Jurusan kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, jerami padi yang digunakan adalah jenis IR 64, dan kentang.

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 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , MnSO_4 , NaOH , H_2SO_4 , glukosa, dextrosa, CH_3COOH , CH_3COONa , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , Na_2SO_4 , NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KMnO_4 , NaNO_3 , KH_2PO_4 . Bahan-bahan *for microbiology* antara lain: pepton, tween-80, tepung agar, 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 (Mettmert 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 enzim xilanase yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus niger* ditentukan kondisi optimum dengan menggunakan substrat xilan. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) klasifikasi satu arah dengan tiga variabel: pH, temperatur dan waktu inkubasi yang masing-masing lima perlakuan dan tiga kali pengulangan.

3.4 Tahapan Kerja

Tahapan kerja yang dilaksanakan meliputi :

1. Pembuatan Reagensia (lampiran)
2. Penyiapan substrat (lampiran)
3. Pembuatan media padat dan media cair
4. Penanambikan murni *Aspergillus niger*
5. Pembuatan kurva pertumbuhan *Aspergillus niger*
6. Produksi enzim
7. Isolasi enzim xilanase dari biakan *Aspergillus niger*
8. Pembuatan kurva baku glukosa
9. Penentuan kondisi optimum enzim xilanase
 - 9.1. pH optimum
 - 9.2. Temperatur optimum
 - 9.3. Waktu inkubasi optimum
 - 9.4. Penentuan V_{maks} dan K_m
10. Analisa data

3.5. Prosedur Kerja

3.5.1. Pembuatan Tepung Jerami Padi

Jerami padi disortasi kemudian dicuci, selanjutnya dipotong-potong kurang lebih 0,5 cm dan dihaluskan dengan mortar, kemudian diayak dengan ukuran ayakan 150 mesh. Jerami yang lolos akan digunakan sebagai induser dan sumber karbon,

3.5.2. Pembuatan Media

3.5.2.1. Media Padat

Media padat yang digunakan adalah *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 2,0 gram dextrosa, pH diatur pada pH 5,0 dan ditambahkan buffer asetat pH 5,0 sebanyak 1,0 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 diautoklaf pada temperatur 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. PDA yang telah steril disimpan dalam kulkas dengan posisi dimiringkan.

3.5.2.2 Media Cair

Ditimbang 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan 0,15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 2,5 g tepung jerami padi, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker, setelah itu diatur pada pH 5. Larutan dibuat sebanyak 500 mL. Kemudian ditambahkan buffer asetat pH 5 sebanyak 1,0 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 °C dan tekanan 15 psi.

3.5.3. Penanaman biakan Murni *Aspergillus niger*

Disiapkan jarum ose, kemudian dilakukan pemindahan secara aseptis kapang *Aspergillus niger* kedalam media padat yang sudah dibikin, kemudian diinkubasi selama 4 samapai 6 hari pada temperatur 30°C.

3.5.4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan (Hadioetomo, 1985)

Diambil spora biakan murni *Aspergillus niger* yang telah berumur 4-6 hari dari 4 agar miring. Kemudian masing-masing disuspensikan dalam 10 mL akuades steril dan suspensi ini dicampurkan. Disiapkan 20 buah erlenmeyer yang masing-masing berisi 10 mL media cair yang telah disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121 °C selama 15 menit. Kemudian masing-masing media cair ditambah dengan 2 mL suspensi. Biakan ini lalu diinkubasi dalam shaker pada temperatur kamar. Pengamatan dilakukan selama 0-120 jam, pada setiap interval 12 jam dilakukan selama 5 kali dan sisanya pada interval 4 jam dilakukan selama 6 kali. Masing-masing interval diamati pertumbuhannya dengan cara menimbang berat kering sel, yang besarnya sebanding dengan jumlah sel. Selanjutnya dibuat kurva pertumbuhan yang menyatakan hubungan antara waktu inkubasi (sumbu x) terhadap berat kering sel (sumbu y).

3.5.5. Produksi Enzim

Untuk memproduksi enzim disediakan 150 ml media cair, kemudian dimasukkan ke dalam 3 buah erlenmeyer 250 ml, lalu disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Setelah dingin kemudian ditambahkan secara aseptis 15 ml inokulum. Selanjutnya media tersebut diinkubasi dalam *shaker* pada temperatur kamar sampai mencapai awal fase stasioner.

Produksi enzim dilakukan selama 98 jam sesuai dengan kurva pertumbuhan yang sudah terbentuk.

3.5.6. Isolasi Enzim Xilanase

Pada akhir masa inkubasi dari percobaan (3.4.6) enzim xilanase di isolasi dengan metode ekstraksi. Untuk ekstraksi dilakukan penambahakan 15 ml buffer asetat pH 5, lalu disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4°C. supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim xilanase.

3.5.7. Pembuatan Kurva Baku Glukosa

Disiapkan 10 tabung reaksi, masing-masing di isi dengan larutan baku glukosa 1 ml untuk konsentrasi 0,20,30,40,50,60,70,80 mg/L, lalu disiapkan blanko akuades 1 ml. Selanjutnya semua tabung di isi 1 ml akuades dan 2 ml reagen Nelson. Mulut tabung ditutup dengan alumunium foil kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit. Tabung didinginkan dalam air es lalu ditambah 2 ml reagen Somogy lalu dikocok dan didiamkan beberapa menit. Kemudian ditambahkan 4 ml akuades dan dikocok, kemudian ditentukan serapannya pada panjang gelombang maksimum 740 nm

3.5.8. Penentuan Kondisi Optimum

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

3.5.8.1. Penentuan pH Optimum

Untuk penentuan pH optimum dilakukan uji aktivitas dengan menggunakan ekstrak kasar enzim xilanase pada pH bervariasi, yaitu pada pH 5,6,7,8,9 dengan cara sebagai berikut :

Disediakan 5 buah tabung reaksi dimana masing-masing diisi dengan 1 ml substrat jerami padi 3 % (w/v). kemudian diinkubasi di atas penangas air pada temperatur 50°C selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 ml ekstrak kasar enzim xilanase dan pH diatur dengan menambahkan 1 ml buffer asetat pH 5,6,7,8,9 pada tabung 1,2,3,4,5. Tiap campuran ini diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Setelah itu tabung di masukkan dalam penagas air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan dalam air es sampai temperatur sama dengan temperatur kamar. Kadar gula reduksi tiap tabung dianalisis dengan metode Nelson-Somogy sebagai berikut :

Dipipet sebanyak 1 ml larutan uji, dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambah 1 ml air bebas reduktor dan 2 ml reagen Nelson. Kemudian mulut tabung ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit. Setelah itu ditambahkan 2 ml reagen arseno molibdat, diaduk dan didiamkan beberapa menit. Kemudian ditambahkan 4 ml air bebas reduktor sehingga volume akhir 10 ml dan dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum (740 nm) dengan blanko yang diberi perlakuan yang sama dengan sampel tapi filtrat enzim dimatikan aktivitasnya dengan cara memanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit sebelum dicampur dengan substrat.

3.5.8.2. Penentuan Temperatur Optimum

Untuk menentukan temperatur optimum dilakukan uji aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase pH optimum yang diperoleh dari percobaan sebelumnya. Temperatur divariasi yaitu : (40,45,50,55,60)°C . Cara yang dipakai seperti pada penentuan pH optimum hanya bedanya pada penentuan temperatur optimum temperaturnya divariasi.

3.5.8.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

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

3.5.9. Penentuan V_{maks} dan K_M

Untuk menentukan V_{maks} dan K_M dilakukan pada kondisi optimum hasil percobaan 3.4.9.1;3.4.9.2 dan 3.4.9.3 untuk uji aktivitas ekstrak kasar enzim pada konsentrasi substrat dengan variasi konsentrasi 0,1;0,5;1;1,5;2 (w/v).

3.5.10. Analisa Data

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

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

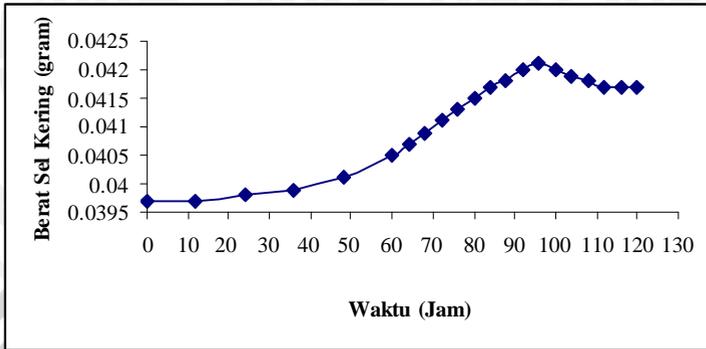
Pada penelitian tentang karakterisasi enzim xilanase dari *Aspergillus niger*, hal-hal yang diamati mencakup pembuatan kurva pertumbuhan dari *Aspergillus niger*, pembuatan kurva baku larutan glukosa, penentuan panjang gelombang maksimum, penentuan kondisi optimum aktivitas enzim xilanase (pH, temperatur, waktu inkubasi, pengaruh konsentrasi substrat) serta penentuan harga K_M dan V_{maks} .

4.1. Kurva Pertumbuhan *Aspergillus niger*

Penentuan kurva pertumbuhan dilakukan untuk menentukan waktu inkubasi yang tepat pada saat produksi sel dan isolasi enzim xilanase sehingga enzim yang dihasilkan maksimal dan mempunyai aktivitas tinggi. Isolat *Aspergillus niger* yang sudah diremajakan dipindahkan dalam media cair dalam kondisi aseptis agar bebas dari kontaminan, kemudian diinkubasi dengan *shaker* pada temperatur ruang 25-27°C dengan kecepatan putar 3000 rpm. Penggunaan *shaker* ini untuk menjaga kondisi di dalam media cair agar tetap homogen serta perputaran (sirkulasi) oksigen merata sehingga nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *Aspergillus niger* dapat terpenuhi.

Pertumbuhan *Aspergillus niger* diamati dengan mengukur perubahan massa sel tiap selang waktu tertentu berdasarkan perubahan berat kering sel dalam media pertumbuhan. Perubahan berat kering sel ini dapat diketahui dengan menimbang berat kering sel dengan timbangan digital Metler hingga diperoleh berat yang konstan. Pertumbuhan jamur (*Aspergillus niger*) akan mencapai fase stasioner bila fase pertumbuhan sel *Aspergillus niger* sebanding jumlah kematian sel.

Kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* dibuat dengan memplotkan antara waktu inkubasi dengan berat kering sel, seperti pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Kurva Pertumbuhan *Aspergillus niger*

Gambar 4.1 menunjukkan fase-fase pertumbuhan dari *Aspergillus niger* yang terdiri dari fase adaptasi pertumbuhan yakni pada waktu inkubasi antara 0-25 jam, pada tahap ini pertumbuhan *Aspergillus niger* sangat lambat karena masih beradaptasi dengan media pertumbuhan. Fase kedua yaitu fase logaritmik yang terjadi pada waktu inkubasi 25-98 jam, pada fase ini *Aspergillus niger* sangat aktif mensintesis enzim untuk memenuhi kebutuhan hidupnya. Produksi enzim sangat efektif dilakukan pada fase ini karena pertumbuhan biomasa sesuai dengan perhitungan logaritma. Fase selanjutnya adalah fase stasioner yang dicapai pada waktu inkubasi setelah 98 jam. Pada fase ini jumlah pertumbuhan sel *Aspergillus niger* sebanding jumlah kematian sel sehingga tidak terjadi peningkatan jumlah sel.

4.2 Isolasi Enzim Xilanase dari *Aspergillus niger*

Tahap awal sebelum mengisolasi ekstrak kasar enzim xilanase adalah membuat inokulum sampai jam ke-49 dan dilanjutkan dengan produksi enzim sampai jam ke-98. Enzim xilanase dihasilkan oleh kapang *Aspergillus niger* dengan menggunakan induser dan sumber karbon jerami padi. Jerami padi mengandung karbohidrat cukup tinggi, sehingga dapat digunakan sebagai sumber energi kapang dalam menginduksi enzim xilanase. Proses isolasi ekstrak kasar enzim dilakukan dengan metode sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C, sehingga menghasilkan supernatan, yang merupakan ekstrak kasar enzim xilanase. Ekstrak kasar enzim xilanase yang dihasilkan sebanyak 400 mL. Data pertumbuhan *Aspergillus niger* ditunjukkan pada tabel L.6

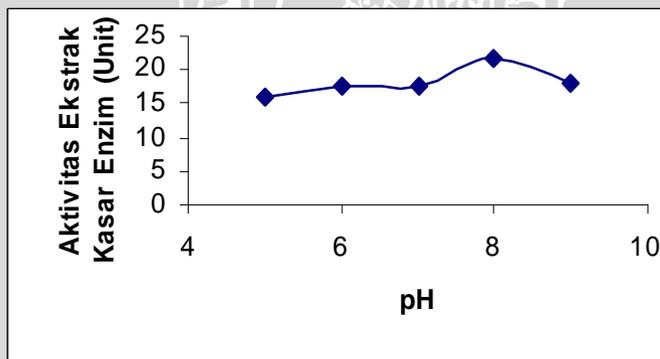
Keberhasilan isolasi enzim ditentukan melalui uji aktivitas enzim dengan substrat xilan menggunakan metode penentuan gula pereduksi, yaitu metode Nelson-Somogyi. Terbentuknya gula pereduksi ditandai dengan terbentuknya endapan Cu_2O berwarna merah bata. Pemilihan substrat xilan untuk uji aktivitas ini didasarkan pada kandungan xilan yang merupakan hemiselulosa murni tanpa adanya lignin, yang sulit untuk dihidrolisis oleh enzim xilanase, sehingga mengoptimalkan hidrolisis xilan oleh ekstrak kasar enzim xilanase.

4.3 Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Enzim Xilanase dari *Aspergillus niger*

4.3.1 Penentuan pH

Setiap enzim memiliki pH optimum yaitu tingkat keasaman dimana aktivitas enzim mencapai optimum dan merupakan kondisi yang sesuai untuk melakukan reaksi dengan substrat (Girinda, 1990). Pengujian pengaruh pH terhadap aktivitas enzim xilanase dilakukan dengan variasi pH 5;6;7;8 dan 9, kisaran pH ini didasarkan pada kisaran pH optimum enzim xilanase yakni 5-10 (Nakamura, et .al, 1993).

Aktivitas enzim yang dipengaruhi oleh pH terlihat pada tabel (L.12.1) dan gambar 4.2. Dari gambar dapat diketahui bahwa aktivitas tertinggi enzim xilanase dicapai pada pH 8.



Gambar 4.2. Kurva Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase

Gambar 4.2. menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar enzim xilanase terjadi pada pH 8 dengan aktivitas rata-rata sebesar $21,7721 \pm 0,1848$ unit. Hasil uji statistik berdasarkan analisis ragam diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel 0,05}$, sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan nyata antar perlakuan pH (lampiran 13.1). Uji BNT 5 % dilakukan untuk mengetahui variasi pH mana saja yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Berdasarkan tabel (L13.2), diketahui bahwa pada pH 8 terdapat perbedaan yang sangat nyata. Uji BNT 5 % dilakukan untuk mengetahui pengaruh pH terhadap aktivitas enzim xilanase. Dilihat dari tabel (L.13.2) menunjukkan bahwa pada 5; 6; 7; 8 dan 9 mempunyai pengaruh terhadap aktivitas enzim xilanase.

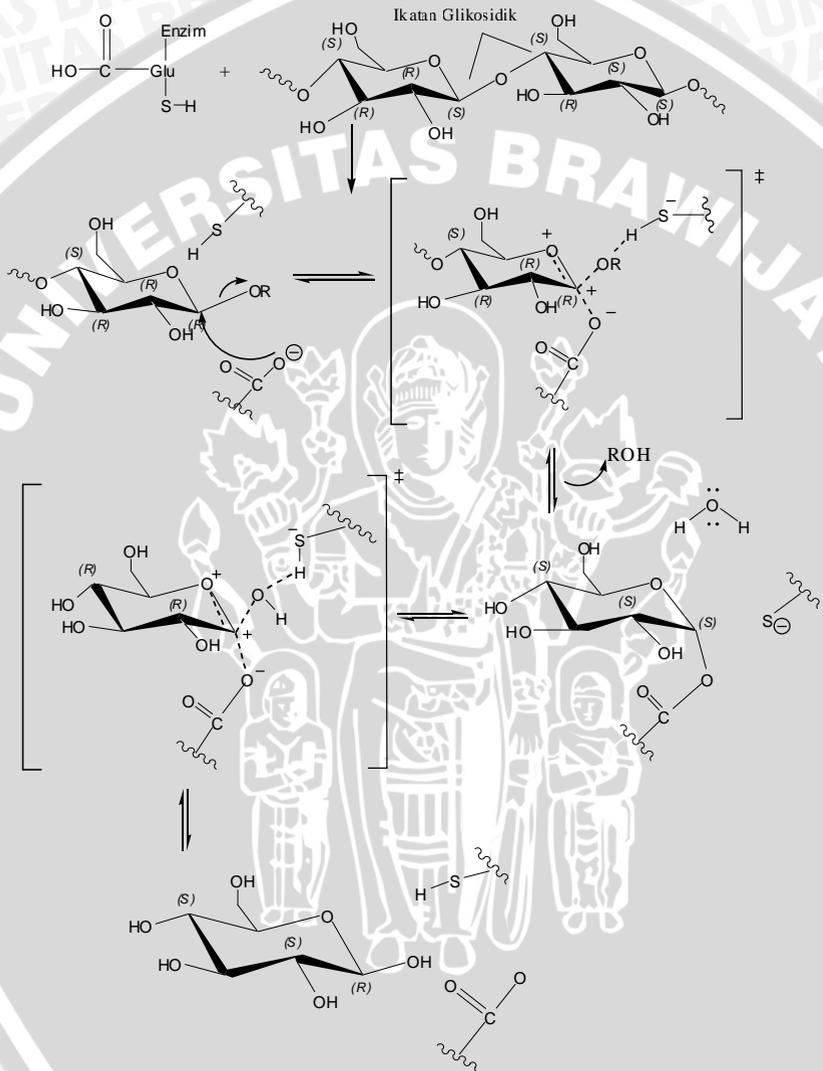
Enzim memiliki sisi aktif dengan gugus-gugus tertentu yang berperan sebagai katalis dalam pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Xilanase mempunyai gugus aktif yang dapat menghidrolisis xilan, yaitu gugus karboksil yang merupakan gugus aktif dari asam amino jenis asam glutamat (Yong eok lee, *et al.*, 1993) serta mengandung gugus sulfhidril (-SH) (Marsiati, 1995).

Perubahan pH berpengaruh terhadap ionisasi gugus fungsi, yang dapat menyebabkan terjadinya perubahan konformasi enzim xilanase dan sifat katalitiknya.

Gambar 4.2 menunjukkan aktivitas xilanase mengalami kenaikan dari pH 5 sampai pH optimum 8. Kenaikan aktivitas ini dipengaruhi oleh perubahan gugus aktif rantai samping yaitu gugus -COOH dari asam amino glutamat yang telah bermuatan negatif yakni dalam bentuk ion karboksilat (-COO⁻). Semakin tinggi pH pada kondisi ini maka ion karboksilat dari xilanase akan semakin banyak. Hal ini menyebabkan protonasi oksigen glikosidik pada awal pembentukan kompleks glikosil enzim akan semakin mudah terjadi sehingga aktivitas enzim semakin meningkat dengan dihasilkan produk gula pereduksi yang semakin banyak pula.

Peningkatan aktivitas xilanase dibatasi oleh muatan gugus -SH, setelah pH optimum yakni pH 8 aktivitas xilanase mulai menurun tepatnya pada pH 9. Pada kondisi ini gugus aktif -SH kehilangan muatan positif membentuk ion -S⁻ yang disebabkan kelebihan ion OH⁻ dalam larutan, sehingga menyebabkan substrat tidak lagi berinteraksi dengan enzim serta terhambatnya protonasi yang melibatkan gugus sulfhidril (-SH). Kondisi ini yang

mengakibatkan terbentuknya kompleks E-S menjadi terhambat dan produksi gula pereduksi menurun pada pH 9.



Gambar 4.3. Mekanisme reaksi enzimatik antara enzim xilanase dengan substrat xilan

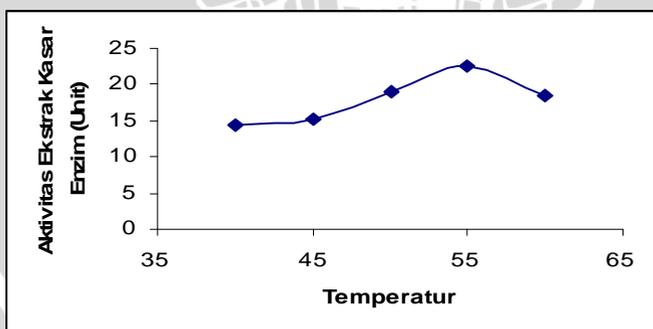
pH optimum ekstrak kasar enzim xilanase terjadi pada pH 8 dengan aktivitas sebesar $21,7721 \pm 0,1848$ unit, hasil ini tidak jauh berbeda dengan kisaran pH enzim xilanase yaitu 4,5-9,0 (Nakamura, 1993). pH optimum menunjukkan aktivitas yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan pH sekitar pH optimum.

Menurut Lehninger (1990), perubahan keaktifan enzim yang dipengaruhi oleh pH lingkungan dapat menyebabkan terjadinya denaturasi enzim, pada pH yang sangat tinggi ataupun rendah (pH 8,0 atau 6,5), menyebabkan perubahan muatan gugus-gugus fungsional dari enzim atau substrat.

4.3.2 Penentuan Temperatur Optimum

Temperatur merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim, jika temperatur meningkat maka laju reaksi juga akan meningkat hingga batas tertentu. Pengujian pengaruh temperatur terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase dalam penelitian ini dilakukan pada variasi temperatur 40,45,50,55, dan 60°C (pada pH optimum 8).

Dalam penelitian ini temperatur yang digunakan mulai dari temperatur 40°C. Kemudian dinaikan lagi menjadi 45°C dan seterusnya hingga temperatur 60°C. Pada variasi temperatur (40-60) °C struktur xilan tidak mengalami perubahan (Schlegel dan Schmidt, 1994). Enzim xilanase cukup stabil hingga temperatur 60°C, tetapi enzim xilanase akan mengalami denaturasi pada temperatur yang lebih tinggi (Richana, 2002). Aktivitas enzim xilanase dari *Aspergillus niger* yang dipengaruhi oleh temperatur dapat dilihat pada gambar 4.4.



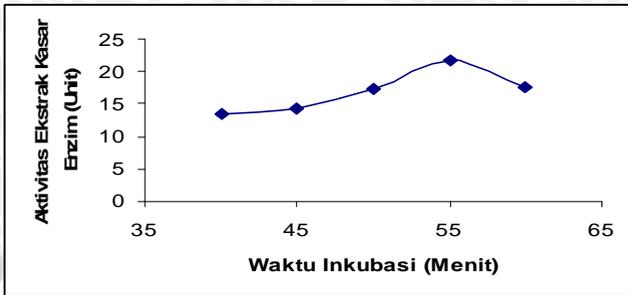
Gambar 4.4. Kurva Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Ekstrak kasar Enzim Xilanase

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa semakin tinggi temperatur maka aktivitas rata-rata enzim xilanase juga akan meningkat yakni sebesar $22,6054 \pm 1,1655$ unit yang terjadi pada temperatur optimum 55°C , kemudian setelah temperatur 55°C aktivitasnya akan turun. Hasil uji statistik berdasarkan analisis ragam (Lampiran 13.3) diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel}$ 0,05, sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan nyata antar perlakuan temperatur. Uji BNT 5% dilakukan untuk mengetahui variasi temperatur mana saja yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Berdasarkan tabel (L.13.4), diketahui bahwa pada temperatur (40, 45, 50, 55 dan 60°C) terdapat perbedaan yang sangat nyata.

Peningkatan temperatur menyebabkan peningkatan energi kinetik sehingga akan mempercepat gerakan enzim dan substrat untuk bertumbukan semakin besar. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk semakin banyak. Pada temperatur optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk semakin banyak. Keadaan ini didukung oleh pendapat Winarno (1986) yang menyatakan bahwa semakin tinggi temperatur maka enzim akan semakin aktif sehingga aktivitasnya akan semakin besar. Peningkatan temperatur lebih lanjut akan menurunkan aktivitas ekstrak kasar enzim. Enzim mengalami perubahan konformasi atau rusaknya struktur skunder dan tersier dari enzim pada temperatur yang terlalu tinggi, akibatnya substrat sulit berinteraksi dengan sisi aktif enzim bahkan terdenaturasi sehingga tidak dapat berinteraksi sama sekali (Lakitan, 2004).

4.3.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Aktivitas enzim xilanase juga dipengaruhi oleh waktu inkubasi atau waktu reaksi enzimatik. Waktu inkubasi yaitu waktu yang dibutuhkan enzim untuk berikatan dengan substrat. Penentuan waktu inkubasi optimum ini dilakukan pada kondisi optimum sebelumnya yaitu pada kondisi pH optimum dan temperatur optimum (pada pH 8 dan temperatur 55°C). Dalam penelitian ini digunakan variasi waktu inkubasi (40,45,50,55, dan 60) menit. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase dapat dilihat pada tabel (L12.3) dan gambar 4.5.



Gambar 4.5 Kurva Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak kasar Enzim Xilanase

Dari gambar 4.5 terlihat bahwa semakin lama waktu inkubasi maka aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase semakin meningkat dan mencapai optimum pada waktu inkubasi 55 menit. Selanjutnya aktivitas enzim akan turun secara berangsur-angsur setelah waktu inkubasi 55 menit. Besarnya aktivitas rata-rata enzim pada waktu inkubasi optimal yaitu $21,78347 \pm 0,1937$ unit.

Aktivitas enzim xilanase sebelum waktu inkubasi optimum belum maksimal, hal ini dikarenakan waktu interaksi (reaksi) antara substrat dengan enzim belum optimal sehingga produk yang dihasilkan juga belum maksimal. Pada waktu optimum interaksi substrat dengan enzim dapat maksimal karena sisi aktif enzim dapat mengikat substrat lebih banyak sehingga produk yang dihasilkan banyak saat reaksi dihentikan. Setelah waktu optimum tercapai aktivitas enzim semakin menurun dan produk yang dihasilkan semakin sedikit, ini disebabkan karena sisi aktif enzim sudah jenuh untuk mengikat substrat, sehingga produk yang dihasilkan hanya mengalami peningkatan yang relatif kecil. Berdasarkan pengertian aktivitas enzim, satu unit aktivitas adalah banyaknya μg gula pereduksi yang dihasilkan oleh 1 mL enzim per satuan waktu, sehingga makin lama waktu inkubasi, aktivitas enzim makin menurun.

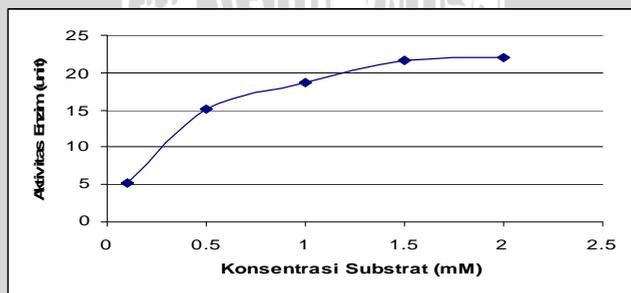
Berdasarkan perhitungan dapat diketahui bahwa perlakuan variasi waktu inkubasi memberikan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas enzim xilanase, penjelasan terperinci dapat dilihat dari tabel (L13.6)

4.3.4. Penentuan K_M dan V_{maks}

Salah satu karakteristik yang khas dari enzim yaitu K_M dan V_{maks} . K_M merupakan konsentrasi substrat pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimum. Sedangkan V_{maks} merupakan kecepatan aktivitas enzim secara maksimal. Penentuan K_M dan V_{maks} dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada variasi konsentrasi substrat yang berbeda dengan jumlah enzim yang digunakan konstan dan dilakukan pada kondisi optimum enzim. Variasi konsentrasi substrat yaitu (0.1;0.5;1;1.5; dan 2 mM). Variasi konsentrasi substrat ini didasarkan pada penelitian Isil (2005),

Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase ditunjukkan pada gambar 4.5. Dari gambar 4.5 terlihat bahwa konsentrasi substrat berbanding lurus dengan aktivitas enzim xilanase, dimana semakin besar konsentrasi substrat aktivitas enzim juga semakin besar hingga pada suatu titik dimana peningkatan konsentrasi substrat tidak sebanding lagi dengan peningkatan aktivitas enzim. Menurut Martin, *et al.*, (1983), aktivitas reaksi enzimatik meningkat saat konsentrasi substrat meningkat hingga mencapai suatu titik dimana enzim dikatakan “jenuh” dengan substrat. Keadaan ini berarti bahwa kompleks yang terbentuk (substrat-enzim) tidak dipengaruhi oleh berapapun jumlah substrat yang ditambahkan karena substrat terdapat dalam jumlah yang melebihi konsentrasi enzim. Dalam keadaan ini aktivitas enzim yang diukur mencapai maksimum.

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim ini digunakan untuk menentukan besarnya nilai K_M dan V_{maks} ekstrak kasar enzim xilanase.



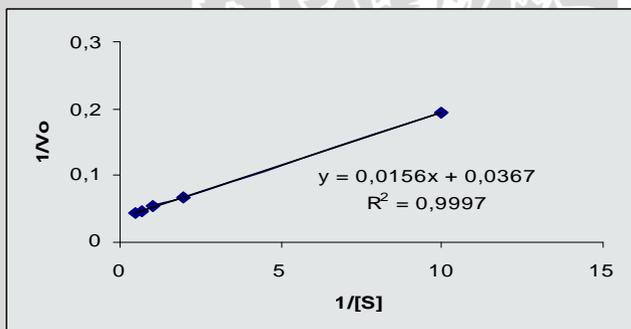
Gambar 4.6. Kurva Pengaruh konsentrasi substrat terhadap Aktivitas Ekstrak kasar Enzim Xilanase

Dari gambar 4.6 masih sulit untuk menentukan berapa besar konsentrasi substrat yang dibutuhkan enzim untuk mencapai K_M dan V_{maks} , karena penambahan konsentrasi hanya meningkatkan aktivitas enzim yang sangat kecil sehingga tidak diketahui secara pasti berapa konsentrasi substrat yang dibutuhkan enzim untuk mencapai K_M dan V_{maks} . Untuk mengetahui nilai K_M dan V_{maks} ditentukan dengan menggunakan persamaan *Lineweaver-Burk* (Lehninger, 1997):

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

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

Berdasarkan gambar 4.6 diperoleh nilai a (K_M/V_{maks}) sebesar 0,0156 dan nilai b ($1/V_{maks}$) sebesar 0,0367 sehingga persamaan linier tersebut diperoleh nilai K_M sebesar 0,4251% dan nilai V_{maks} sebesar 27,25 $\mu\text{mol/mLmenit}$



Gambar 4.7. Kurva Hubungan $1/[S]$ terhadap $1/V$

Nilai K_M merupakan konsentrasi substrat yang dibutuhkan oleh enzim agar dapat bekerja maksimal. Sehingga dari harga K_M yang diperoleh dapat menunjukkan bahwa enzim xilanase dapat bekerja maksimal pada konsentrasi substrat 0,4251%. Nilai K_M menunjukkan konstanta pengikatan enzim terhadap substrat. K_M dapat digunakan sebagai indikator untuk mengetahui kekuatan ikatan kompleks enzim-substrat (ES). Makin besar harga K_M , maka ikatan yang terjadi pada kompleks ES makin lemah dan sebaliknya, harga K_M makin kecil menunjukkan ikatan enzim-substrat makin kuat.

BAB V KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa kondisi kerja ekstrak kasar enzim xilanase dalam menghidrolisis substrat xilan menjadi gula pereduksi dicapai pada kondisi optimum pada pH 8, temperatur 55°C dan waktu inkubasi selama 55 menit serta harga V_{maks} sebesar 27,25 $\mu\text{mol}/\text{mLmenit}$ dan K_M sebesar 0,4251%.

5.2 Saran

Untuk mendapatkan aktivitas yang lebih tinggi perlu dilakukan pemurnian ekstrak kasar enzim xilanase terlebih dahulu dan pengaruh ion logam yang dapat mengaktivasi dan menginhibisi aktivitas enzim.



DAFTAR PUSTAKA

- Bangbegaars, 1977 dalam Wirakartakusumah, M. A., 1987, Isolasi dan Karakterisasi Enzim dari *Aspergillus niger* serta Pemanfaatan dalam Pengembangan Industri Gula Cair, Laporan Penelitian, IPB, Bogor
- Bailey, M. J., and L. Viikari., 1993, Production of Xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on Xylan-based media, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 80-84
- Dashek, W.V., 1997, Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology, <http://www.en.wikipedia.org/wiki/xylanase>, diakses tanggal 18 januari 2008.
- Dekker, R.F.H., 1983, Bioconversion of Hemicellulose: Aspect of Hemicellulose Production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and Enzymic Saccharification of Hemicellulose, *Biotechnol, Bioeng*, 25:1127-1146
- Evans, P.J., 1979, Chemical and Physical Aspects of The Introduction of Sodium Hydroxide With the Cell Wall Component of Straw, Paper presented at symposium on Straw Decey Hed and Hotfield
- Fardiaz, S., 1988, Fisiologi Fermentasi, Pusat Antar Universitas IPB, Bogor, hal 165-166
- Girindra, A., 1993, Biokimia 1, P.T. Gramedia, Jakarta
- Hadioetomo, R.S., 1985, Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium, PT. Gramedia, Jakarta.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W. and Zupaneie, S., 1996, Production of fungal xylanases, <http://www2.psu.ac.th/PresidentOffice/EduService/journal/27-2-pdf/10xylanase.pdf>, diakses tanggal 23 Desember 2007.
- Hettenhaus, J., 2002, Talking About Corn Stover With Jim Hettenhaus, Issue No. 2, V.4
- Isil, S. and N. Aksoz, 2005, Investigation of Factors Affecting Xilanase Activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3,

Brazilian Journal of Biology and Technology 48(2):1516-8913, diakses tanggal 15 Juni 2007.

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

Lehninger, 1997, *Dasar- Dasar Biokimia*, Alih Bahasa: Thenawijaya, Erlangga, Jakarta

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

Martin et al., 1986, *Biokimia*, ed. 19, Terjemahan: Dharma, A., Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta

Marsiati, H. 1995, *Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase dari Jamur *Volvariella volvacea**, *Jurnal Matematika dan Sains Suplemen G. F-MIPA ITB*, Bandung

Muchtadi, D. S. R., Palupi dan M. Astawan, 1992, *Enzim Dalam Industri Pangan*, P. T. Gramedia

Nakamura, dkk., 1993, *Purification and same Properties of an Alkaline Xilanase from Alkaliphilic Bacillus sp. Strain 41M1 Application and Environ, Microbiology* 59(7): 2311-2316

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

Prescott, S. C., dan Duun, G. C., 1962, *Industrial Microbiology*, 3th ed, Mc Graw Hill Books Company Ltd, London

Reilly, A. D., 1991, *Food from Waste Paper*, Applied Science Publisher Ltd., London

Richana, N., 2002, *Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia*, *Jurnal AgroBio* 5(1):29-36, diakses tanggal 27 Juni 2007

Rodwell, 1988, dalam Wirakartakusumah, M. A., 1987, *Isolasi dan Karakterisasi Enzim dari *Aspergillus niger* serta Pemanfaatan dalam Pengembangan Industri Gula Cair*, Laporan Penelitian, IPB, Bogor

- Schlegel, H.G. dan K. Schmidt, 1994, Mikrobiologi Umum, Edisi 6, Alih Bahasa: R.M. Tedjo Baskoro, UGM Press, Yogyakarta.
- Suharsono, 1989, Enzim dan Bioteknologi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB, Bogor
- Straiyer, L., 1984, Biochemistry, 2 rd ed, W. H. Freeman and Company, New York
- Theander, A. D., dan P. Anam, 1984, Anatomical and Chemical Characteristic, Edited by F. Sundstol and E. Owen, Elsevier, Amsterdam
- Tsujibo, et all., 1992, Purification Properties and Partial Amino Acid Sequences of Thermostable Xylanase from *Streptomyces termoviolaceus* OPC-520, Appl. Environ Microbiology 58:371-375
- Underwood, A. L., dan Day, Jr., R. A., 1993, Analisa Kimia Kuantitatif, Edisi keempat, Cetakan keempat, Penerbit Erlangga, Jakarta
- Voet, D., dan Voet, J., 1990, Biochemistry, John Willey and Sons, London
- Vogel, A. I. 1954, A Text- Book of Macro and Semimicro Qualitative Inorganic Analysis, 4thed, Longmans, Green and Co Ltd, pp 241-242
- Winarno, F. G., 1986, Enzim Pangan, P. T. Gramedia, Jakarta
- Winugroho, M., 1996, Impoved Rice Straw As Elephant Grass (*Pennisetum purpureum* Schumach), Subtitute for Ruminants, Fak. Pasca Sarjana, IPB, Bogor
- Wolf, 1949 dalam Wirakartakusumah, 1987, Isolasi dan Karakterisasi Enzim dari *Aspergillus niger* serta Pemanfaatan dalam Pengembangan Industri Gula Cair, Laporan Penelitian, IPB, Bogor
- Wirakartakusumah, 1987, Isolasi dan Karakterisasi Enzim dari *Aspergillus niger* serta Pemanfaatan dalam Pengembangan Industri Gula Cair, Laporan Penelitian, IPB, Bogor

Yitnosumarto, S., 1993, Percobaan Perancangan, Analisis dan Interpretasinya, Edisi Kedua, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Yang, et all., 1988, Molecular Cloning and Expression of Xylanase Gene from *Bacillus Polymyxa* in *Escheriacia Coli*, *Environ microbiology* 54:10023-1029

Yong-Eok Lee, S.E. Lowe, B. Henrissat and J. Gregory Zeikus, 1993, Charactrization of the Active Site and Thermostability Regions of Endoxilanase 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

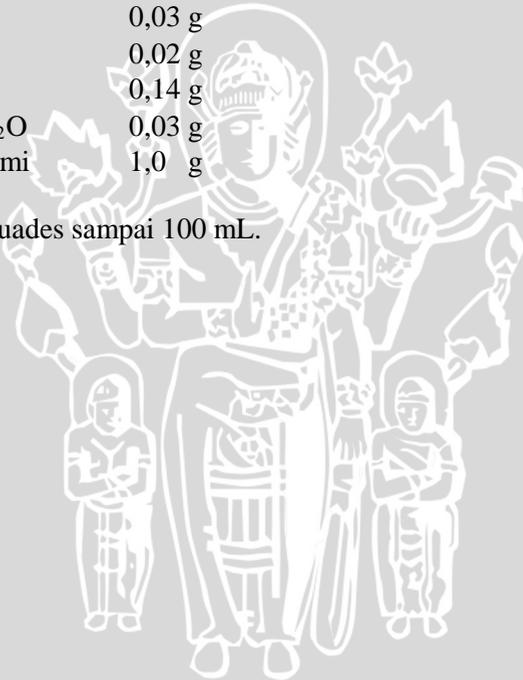
- Kentang 20 g
- Dextrosa 2,0 g
- Tepung agar 1,5 g

Dilartukan 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 |
| • $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0,14 g |
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,03 g |
| • Serbuk jerami | 1,0 g |

Dilartukan dengan akuades sampai 100 mL.



Lampiran 2. Preparasi Larutan

2.1. Pembuatan Reagen

2.1.1. Pembuatan Reagen Nelson

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

Nelson A : dilarutkan 1,20 g KNa-tartrat, 2,40 g Na_2CO_3 , 1,60 g NaHCO_3 , 14,40 g Na_2SO_4 ke dalam 80 mL akuades dengan pemanasan.

Nelson B : dilarutkan 2,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 18,0 g Na_2SO_4 ke dalam 100 mL akuades.

2.1.2. Pembuatan Reagen Somogyi

Dilarutkan 25,0 g amonium molibdat dalam 450 mL akuades, setelah itu ditambahkan 25,0 mL H_2SO_4 pekat sambil diaduk-aduk. Dilarutkan pada gelas beaker lain, 3,0 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 25 mL akuades, kemudian larutan ini dituang ke dalam larutan pertama dan disimpan dalam botol berwarna gelap dan diinkubasi pada temperatur 37°C selama 48 jam.

2.2. Pembuatan Air Bebas Reduktor

Akuades ditambah dengan KMnO_4 hingga berwarna merah (± 4 tetes), kemudian didestilasi, sehingga diperoleh air bebas reduktor.

2.3. Pembuatan Larutan Stok Glukosa 1000 ppm

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

2.4. Pembuatan Larutan Baku Gula Pereduksi

Dipipet 10,0 mL larutan stok glukosa 1000 mg/L, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian larutan baku glukosa 100 ppm tersebut dipipet berturut-turut 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 ; 7,0 dan 8,0 mL, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan gula pereduksi dengan konsentrasi 20, 30, 40, 50, 60,70 dan 80 ppm.

2.5. Pembuatan Larutan Asam asetat 0,2 M

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

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

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

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

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

2.6. Pembuatan Larutan Na-asetat 0,2 M

$$\begin{aligned}\text{BM Na-asetat} &= 82,0 \text{ g/mol} \\ \text{Massa Na-asetat} &= \text{BM} \times \text{M} \\ &= 82,0 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L} \\ &= 16,4 \text{ g/L}\end{aligned}$$

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

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

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

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

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

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

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

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

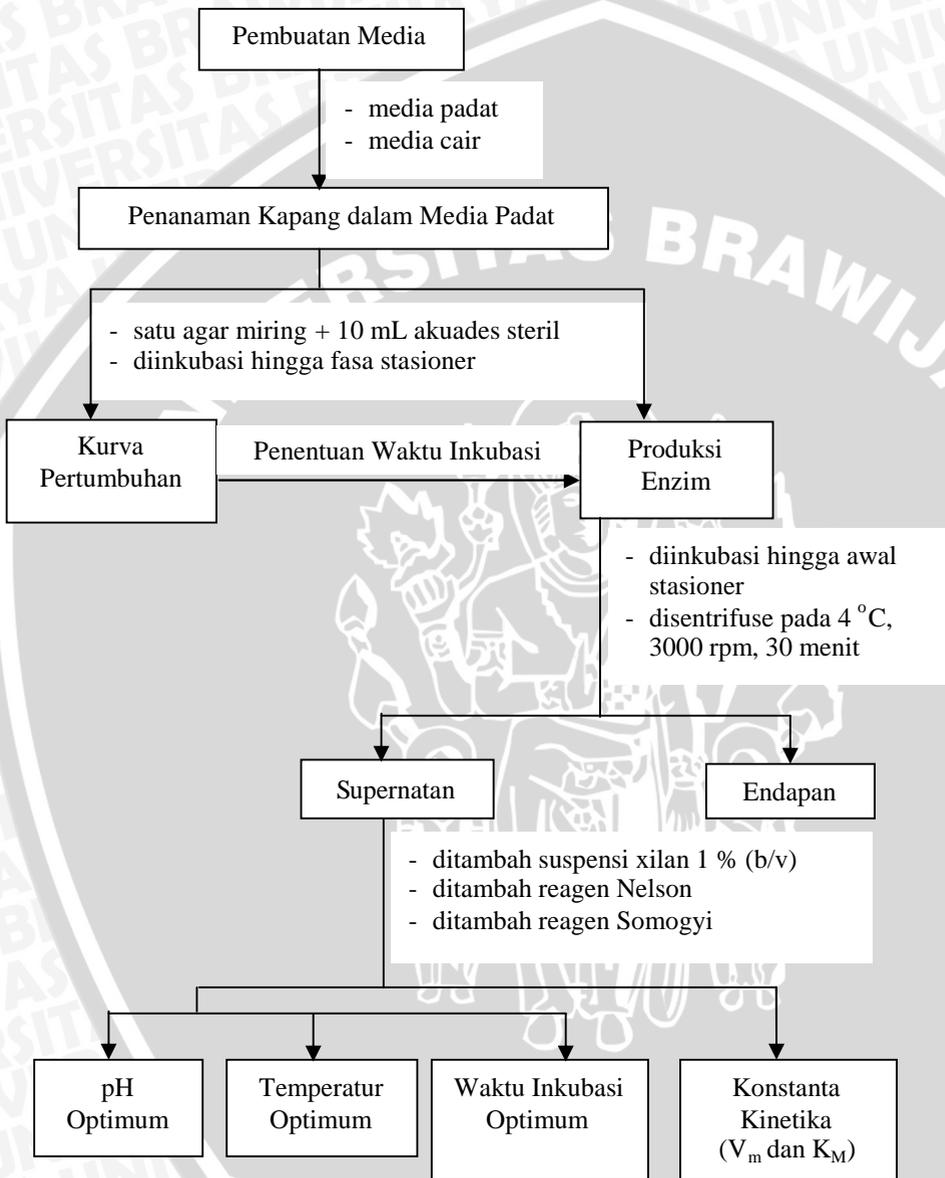
$$5 = 4,74 - \log \frac{(50,0 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mmol/mL})}{(v \text{ mL} \times 0,2 \text{ mmol/mL})}$$

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

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

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

Lampiran 4. Tahapan Kerja



Lampiran 5. Skema Kerja

1. Pembuatan Substrat Jerami Padi

Jerami Padi

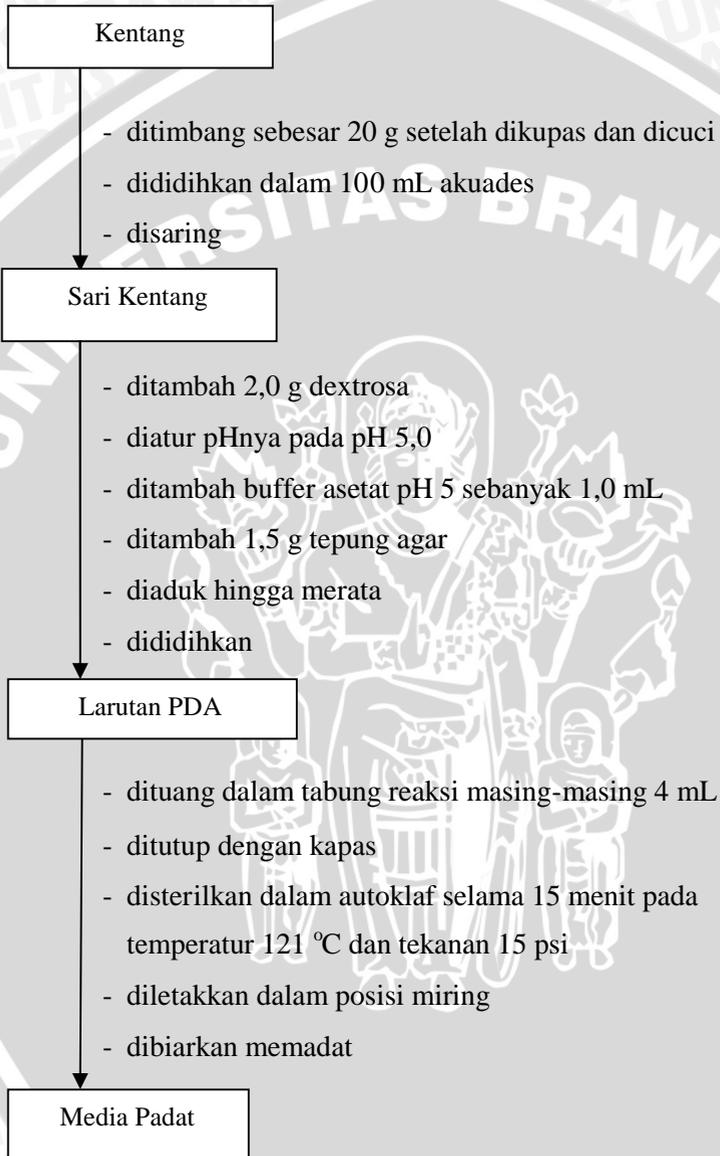
- dicuci
- dikeringkan di bawah terik matahari selama 2 hari
- digiling
- disaring dengan saringan 150 mesh

Tepung Jerami Padi



2. Pembuatan Media

2.1. Media Padat



2.2. Media Cair

1,0 g Tepung Jerami Padi

- 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mL dan 2,5 g tepung jerami
- 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°C dan tekanan 15 psi

Media Cair

3. Penanaman Murni *Aspergillus niger*

Kultur Murni *A. niger*

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

Hasil Biakan *A. niger*

4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Hasil Biakan *A. niger*

- disuspensikan dalam 10 mL akuades steril
- diambil masing-masing 2 mL dan dimasukkan dalam 24 erlenmeyer yang berisi 10 mL media cair
- diinkubasi dalam shaker pada temperatur kamar
- diamati pertumbuhannya setiap interval 12 jam dan sisanya setiap 4 jam, dengan cara menimbang berat kering sel
- dibuat kurva hubungan antara waktu inkubasi terhadap berat kering sel

Kurva Pertumbuhan

5. Pembuatan Inokulum

Hasil Biakan *A. niger*

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

Larutan Inokulum

6. Produksi Enzim

Larutan Inokulum

- dipindah secara aseptis masing-masing ke dalam 3 buah erlenmeyer yang berisi 150 mL media cair steril
- diinkubasi dalam shaker pada temperatur kamar sampai mencapai awal fase stasioner

Hasil Produksi Enzim

7. 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 °C

Ekstrak Kasar Enzim Xilanase



8. Tahap Analisis Gula Pereduksi

8.1. Penentuan panjang gelombang maksimum Nelson-Somogyi

1,0 mL larutan Glukosa Standar 40 mg/L

- ditambah 1,0 mL air bebas reduktor
- ditambah 1,0 mL reagen Nelson
- dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan hingga temperatur mencapai temperatur kamar
- ditambah 1,0 mL reagen 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

8.2. Pembuatan Kurva Baku Larutan Gula Pereduksi

1,0 mL Larutan Baku Glukosa
(0,2,3,4,5,6,7,8) 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

8.3. Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase

1 % Substrat Xilan (b/v)

- dipipet masing-masing sebanyak 1,0 mL ke dalam 5 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit
- ditambahkan 1,0 mL ekstrak kasar enzim xilanase
- ditambah buffer asetat pH 5,0 sebanyak 1,0 mL
- diinkubasi pada temperatur $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 50 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

9. Penentuan Kondisi Optimum Ekstrak Kasar Enzim Xilanase

9.1. Penentuan pH Optimum

1 % Substrat Xilan (b/v)

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

Larutan Uji

9.2. Penentuan Temperatur Optimum

1 % Substrat Xilan (b/v)

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

Data

9.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

1 % Substrat Xilan (b/v)

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

Data

10. Penentuan nilai V_m dan K_M

Substrat Xilan
(0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0) % (b/v)

- dipipet masing-masing sebanyak 1,0 mL ke dalam 5 buah tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada $T = 60^\circ\text{C}$ selama 15 menit
- ditambahkan 1,0 mL ekstrak kasar enzim xilanase
- ditambah buffer asetat pH optimum (9.1) sebanyak 1,0 mL
- diinkubasi pada temperatur optimum (9.2) dan waktu inkubasi optimum (9.3)
- 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

11. 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

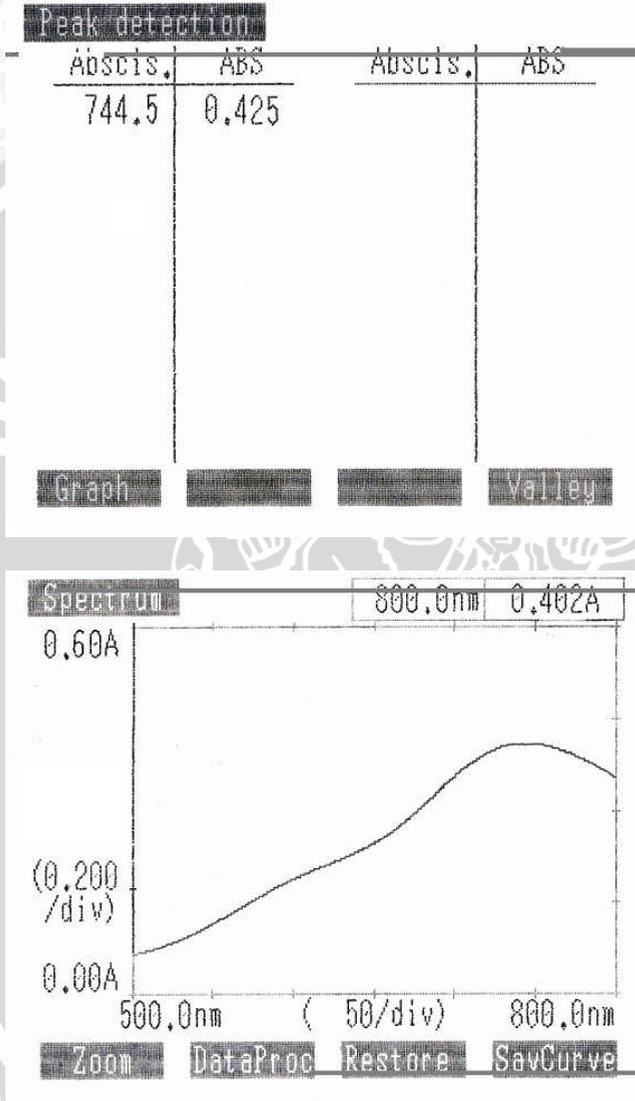
Data

Lampiran 6. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Aspergillus niger*

Tabel L.6. Data berat kering sel pada berbagai waktu

Waktu (jam)	Berat (gram)
0	0.0397
12	0.0397
24	0.0396
36	0.0399
48	0.0401
60	0.0405
64	0.0407
68	0.0409
72	0.0411
76	0.0413
80	0.0417
84	0.0417
88	0.0418
92	0.042
96	0.0421
100	0.042
104	0.0419
108	0.0418
112	0.0417
116	0.0418
120	0.0417

Lampiran 7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Gula Pereduksi

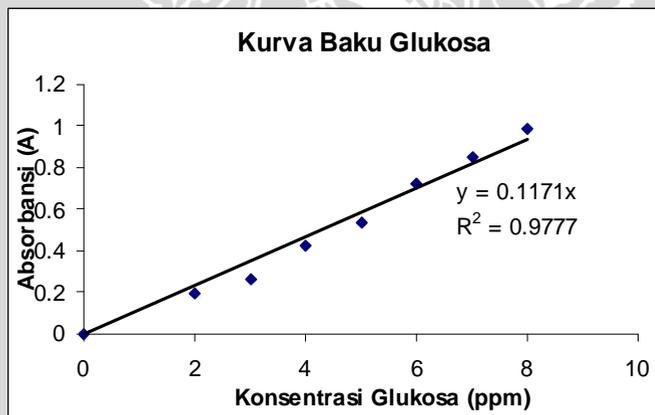


Gambar L.7. Spektrum Absorbsi

Lampiran 8. Pembuatan Kurva Standar Gula Pereduksi

Tabel L.8. Data absorbansi kurva standar gula pereduksi

Konsentrasi glukosa (ppm)	Absorbansi (A)		
	1	2	rata2
0	0	0	0
2	0.197	0.199	0.198
3	0.261	0.262	0.2615
4	0.423	0.421	0.422
5	0.536	0.539	0.5375
6	0.727	0.728	0.7275
7	0.851	0.853	0.852
8	0.988	0.987	0.9875



Gambar L.8. Kurva Standar Gula Pereduksi

Lampiran 9.

Data Serapan Gula Pereduksi dalam Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase pada kondisi pH 8,0; temperatur 55 °C dan waktu inkubasi 55 menit dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Tabel L.9.1. Data Serapan Gula Pereduksi

Substrat (%) (b/v)	Serapan			Serapan Rata-rata
	I	II	III	
1,0	0.3556	0.3475	0.3574	0.3535

Tabel L.9.2. Data Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase

Substrat (%) (b/v)	Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase (Unit)			Aktivitas Rata-rata (Unit)
	I	II	III	
1,0	15.1966	14.8504	15.2735	15.1068±0.2254

Lampiran 10.

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

Tabel L.10.1. Serapan Gula Pereduksi terhadap Pengaruh pH

pH	Serapan			Serapan rata-rata
	I	II	III	
5,0	0.3753	0.3745	0.3734	0.3744
6,0	0.4125	0.4012	0.4154	0.4097
7,0	0.4142	0.4157	0.4161	0.4153
8,0	0.5045	0.5115	0.5124	0.5095
9,0	0.4325	0.3975	0.4297	0.4199

Tabel L.10.2. Serapan Gula Pereduksi terhadap Pengaruh Temperatur

Temperatur (°C)	Serapan			Serapan rata-rata
	I	II	III	
40	0.3325	0.3278	0.3434	0.3346
45	0.3582	0.3455	0.3632	0.3556
50	0.4373	0.4423	0.4568	0.4455
55	0.5093	0.5175	0.5601	0.529
60	0.4255	0.4375	0.4411	0.4347

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

Waktu Inkubasi (menit)	Serapan			Serapan rata-rata
	I	II	III	
40	0.3145	0.3186	0.3105	0.3145
45	0.3342	0.3275	0.3433	0.335
50	0.4125	0.4035	0.4065	0.4075
55	0.5045	0.5123	0.5124	0.5097
60	0.4147	0.4011	0.4267	0.4142

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

Konsentrasi Substrat (%) (b/v)	Serapan			Serapan rata-rata
	I	II	III	
0,1	0.1065	0.1267	0.1313	0.1215
0,5	0.3087	0.3807	0.3662	0.3519
1,0	0.4057	0.4136	0.4892	0.4362
1,5	0.5013	0.5035	0.5194	0.5081
2,0	0.5125	0.5192	0.5203	0.5173



Lampiran 11.

Pengukuran Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim 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 enzim xilanase dihitung menggunakan persamaan berikut :

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

di mana:

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

Contoh perhitungan:

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

Absorbansi = 0,5045

p = 1 mL

V = volume substrat (1 mL) + volume buffer asetat (1 mL) + volume ekstrak kasar enzim (1 mL)
= 3 mL

q = 60 menit

fp = 100 kali

Berdasarkan kurva standar gula pereduksi diperoleh persamaan linier $y = 0,117x$, sehingga:

$0,5045 = 0,117x$

$x = 4,3119658 \mu\text{g}/\text{mL}$

$$AE = \frac{4,3119658 \mu\text{g}/\text{mL} \times 3 \text{ mL} \times 100}{1 \text{ mL} \times 60 \text{ menit}} \\ = 21.5598 \mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{menit}$$

Lampiran 12.

Data Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase

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

pH	Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase (Unit)			Aktivitas rata-rata (Unit)
	I	II	III	
5,0	16.0385	16.0043	15.9573	16
6,0	17.6282	17.1453	17.7521	17.5085
7,0	17.7009	17.765	17.7821	17.7493
8,0	21.5598	21.859	21.8974	21.7721
9,0	18.4829	16.9872	18.3632	17.9444

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

Temperatur (°C)	Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase (Unit)			Aktivitas rata-rata (Unit)
	I	II	III	
40	14.2094	14.0085	14.6752	14.2977
45	15.3077	14.765	15.5214	15.198
50	18.688	18.9017	19.5214	19.037
55	21.765	22.1154	23.9359	22.6054
60	18.1838	18.6966	18.8504	18.5769

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

Waktu Inkubasi (menit)	Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase (Unit)			Aktivitas rata-rata (Unit)
	I	II	III	
40	13.4402	13.6154	13.2692	13.4416
45	14.2821	13.9957	14.6709	14.3162
50	17.6282	17.2436	17.3718	17.4145
55	21.5598	21.8932	21.8974	21.7835
60	17.7222	17.141	18.235	17.6994

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

Konsentrasi Substrat (%) (b/v)	Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Xilanase (Unit)			Aktivitas rata-rata (Unit)
	I	II	III	
0,1	4.55128	5.41453	5.61111	5.19231
0,5	13.1923	16.2692	15.6496	15.037
1,0	17.3376	17.6752	20.906	18.6396
1,5	21.4231	21.5171	22.1966	21.7123
2,0	21.8205	21.5615	22.7521	22.0447



Lampiran 13.

Analisis Statistika

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

a. pH

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

pH	Aktivitas			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
5,0	16.0385	16.0043	15.9573	48	16±0.0408
6,0	17.6282	17.1453	17.7521	52.5256	17.5085±0.3206
7,0	17.7009	17.765	17.7821	53.2479	17.7493±0.0428
8,0	21.5598	21.859	21.8974	65.3162	21.7721±0.1848
9,0	18.4829	16.9872	18.3632	53.8333	17.9444±0.8312

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

1 Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n.p} = \frac{74487,006}{15} = 4965,8004$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK = 5022,5015 - 4965,8004 = 56,70114$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK = 5020,8389 - 4965,8004 = 55,038$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$\text{JKG} = \text{JKT} - \text{JKP} = 56,701 - 55,038 = 1,663$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. $\text{KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{55,038}{4} = 13,7595$

b. $\text{KT Galat percobaan} = \frac{\text{JKG}}{\text{dB percobaan}} = \frac{1,663}{10} = 0,1663$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}} = \frac{13,7595}{0,1663} = 82,739026$$

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

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

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2\text{KTP}/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 0,1663/3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 0,3329665 = 0,7418 \end{aligned}$$

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

FK	4965,8004
JKT	56,70114
JKP	55,038
JKG	1,663
KTP	13,7595
KTG	0,1663
Fhitung	82,739026
Ftabel 5 %	3,84
BNT 5 %	0,7418

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

pH	rataaan	5,0	6,0	7,0	9,0	8,0
		16	17.5085	17.7493	17.9444	21.7721
5,0	16	0	1.5085*	1.7493*	1.9444*	5.7721*
6,0	17.5085		0	0.2408	0.4359	4.2636*
7,0	17.7493			0	0.1951	4.0228*
9,0	17.9444				0	3.8277*
8,0	21.7721					0

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

b. Temperatur

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

Temperatur (°C)	Aktivitas			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
40	14,2094	14,0085	14,6752	42,8932	14,2977 ± 0,34
45	15,3077	14,765	15,5214	45,5940	15,198 ± 0,3899
50	18,688	18,9017	19,5214	57,1111	19,037 ± 0,4328
55	21,765	22,1154	23,9359	67,8162	22,6054 ± 1,1655
60	18,1838	18,6966	18,8504	55,7308	18,5769 ± 0,3407

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

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{72493,192}{15} = 4829,2795$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK = 4965,6324 - 4829,2795 = 136,3529$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$\text{JKP} = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - \text{FK}$$
$$= 4961,7592 - 4829,2795 = 132,47978$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$\text{JKG} = \text{JKT} - \text{JKP} = 136,3529 - 132,47978 = 3,874$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. $\text{KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{132,479}{4} = 33,11975$

b. $\text{KT Galat percobaan} = \frac{\text{JKG}}{\text{dB percobaan}} = \frac{3,874}{10} = 0,3874$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}} = \frac{33,11975}{0,3874} = 85,492385$$

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

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

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2\text{KTG}/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 0,3874/3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 0,5081994 = 1,1323 \end{aligned}$$

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

FK	4829,2795
JKT	136,3529
JKP	132,47978
JKG	3,874
KTP	33,11975
KTG	0,3874
Fhitung	85,492385
Ftabel 5 %	3,84
BNT 5 %	1,1323

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

Temperatur (°C)	Rata-rata	40	45	60	50	55
		14,2977	15,198	18,5769	19,037	22,6054
40	14,2977	0	0,9003	4,2792*	4,7393*	8,3077*
45	15,198		0	3,3789*	3,839*	7,4074*
60	18,5769			0	0,4601	4,0285*
50	19,037				0	3,5684*
55	22,6054					0

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

c. Waktu Inkubasi

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

Waktu Inkubasi (menit)	Aktivitas			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
40	13,44017	13,61538	13,26923	40,32478	13,44159±0,1731
45	14,28205	13,99573	14,67094	42,94872	14,31624±0,3389
50	17,62821	17,24359	17,37179	52,24359	17,41453±0,1958
55	21,55983	21,89316	21,89744	65,35043	21,78347±0,1937
60	17,72222	17,14103	18,23504	53,09829	17,69943±0,5473

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

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n.p} = \frac{64498,634}{15} = 4299,9089$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. JK Total (JKT)

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

$$= 4431,1007 - 4299,9089 = 131,19175$$

b. JK Perlakuan (JKP)

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

$$= 4430,0601 - 4299,9089 = 130,15117$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 131,19175 - 130,15117 = 1,041$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. KT Perlakuan = $\frac{JKP}{dBperlakuan} = \frac{130,151}{4} = 32,53775$

b. KT Galat percobaan = $\frac{JKG}{dBpercobaan} = \frac{1,041}{10} = 0,1041$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{32,52775}{0,1041} = 312,56244$$

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

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

$$\begin{aligned} BNT_{5\%} &= t_{(\alpha/2; dB)} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= t(0,025; 10) \times (2 \times 0,1041/3)^{0,5} \\ &= 2,228 \times 0,2634388 = 0,5869 \end{aligned}$$

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

FK	4299,9089
JKT	131,19175
JKP	130,15117
JKG	1,041
KTP	32,53775
KTG	0,1041
Fhitung	312,56244
Ftabel 5 %	3,84
BNT 5 %	0,5869

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

Waktu Inkubasi (menit)	Rataan	40	45	50	60	55
		13,4416	14,3162	17,4145	17,6994	21,7835
40	13,4416	0	0,8746*	3,9729*	4,2578*	8,3419*
45	14,3162		0	3,0983*	3,3832*	7,4673*
50	17,4145			0	0,2849	4,369*
60	17,6994				0	4,0841*
55	21,7835					0

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