

**Pengaruh Penambahan Mg^{2+} Terhadap Aktivitas Pektinase
dari *Bacillus firmus***

SKRIPSI

oleh :
LILIS SOBAKHAH
0810923017



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012

**Pengaruh Penambahan Mg^{2+} Terhadap Aktivitas Pektinase
dari *Bacillus firmus***

SKRIPSI

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

oleh :

LILIS SOBAKHAH

0810923017



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

LEMBAR PENGESAHAN

**Pengaruh Penambahan Mg^{2+} Terhadap Aktivitas Pektinase
dari *Bacillus firmus***

oleh:

LILIS SOBAKHAH

0810923017

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal**

**Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, Ms.
NIP. 19520412 1980021001

Dra. Anna Roosdiana,M.App.Sc
NIP. 19580711 1992032002

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 19630404 1987011001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lilis Sobakhah
NIM : 0810923017
Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

**Pengaruh Penambahan Mg^{2+} terhadap Aktivitas Pektinase dari
*Bacillus firmus***

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari tugas akhir 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 tugas akhir ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata tugas akhir yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, Juli 2012
Yang menyatakan,

Lilis Sobakhah
NIM 0810923017

Pengaruh Penambahan Mg^{2+} terhadap Aktivitas Pektinase dari *Bacillus firmus*

ABSTRAK

Pektinase merupakan enzim ekstraseluler yang menghidrolisis pektin menjadi asam galakturonat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan Mg^{2+} terhadap aktivitas ekstrak kasar pektinase dari *Bacillus firmus* serta menentukan parameter kinetika meliputi V_{maks} , K_M , dan K_I . Pengaruh Mg^{2+} terhadap aktivitas pektinase dilakukan dengan membandingkan antara aktivitas pektinase tanpa penambahan Mg^{2+} dan aktivitas pektinase dengan penambahan Mg^{2+} . Pengukuran aktivitas enzimnya menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan menggunakan reagen Asam Dinitro Salisilat (DNS) pada temperatur $50^{\circ}C$, pH 7; waktu inkubasi 30 menit dan variasi konsentrasi substrat 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; dan 0,8% dengan penambahan konsentrasi ion Mg^{2+} 2, 4, 6, 8 dan 10 mM. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar pektinase mempunyai aktivitas sebesar 56,192 U/mL. Nilai K_M tanpa penambahan Mg^{2+} dan dengan penambahan Mg^{2+} sama yaitu sebesar 0,31%, sedangkan nilai V_{maks} berbeda yaitu 80,645 U/mL dan 62,112 U/mL. Pada penambahan konsentrasi Mg^{2+} 2 dan 4 mM, Mg^{2+} bertindak sebagai aktivator sedangkan pada penambahan konsentrasi Mg^{2+} 6, 8 dan 10, Mg^{2+} bertindak sebagai inhibitor. Hasil uji statistika menunjukkan bahwa penambahan Mg^{2+} dengan variasi konsentrasi memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap aktivitas pektinase ($P < 0,01$). Jenis inhibisi Mg^{2+} terhadap pektinase termasuk inhibisi non kompetitif dengan nilai K_I sebesar 2,684.

Kata kunci : Mg^{2+} , Pektinase, Bacillus firmus, pektin, asam galakturonat, inhibisi non kompetitif

The Effect of Mg^{2+} Addition to Pectinase Activity from *Bacillus firmus*

ABSTRACT

Pectinase is an extracellular enzyme that hydrolyze pectin to galacturonate acid. This research has a certain purpose to investigate the effect of Mg^{2+} addition to the crude extract pectinase from *Bacillus firmus* and to determine kinetic parameter including K_M , V_{max} and K_I . The influence of Mg^{2+} to the pectinase activity was conducted by comparing pectinase activity with the addition of Mg^{2+} ion and pectinase activity without the addition of Mg^{2+} . The enzyme activity of was measured by UV-Vis spectrofotometry using Dinitrosalicylic Acid (DNS) as the reagent at temperature $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7 ; incubation time 30 minutes and 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8 % of substrates concentrations with 2, 4, 6, 8 and 10 mM Mg^{2+} . The result of this research showed that pectinase crude enzyme has optimum activity 56.192 U/mL. The value of K_M without and with addition of Mg^{2+} showed the same value 0.31%, while both V_{max} showed 80.645 U/mL and 62.112 U/mL. The addition of 2 and 4 mM Mg^{2+} , the ion became an activator but at 6, 8 and 10 mM of Mg^{2+} , became inhibitor. The result of statistic test showed that Mg^{2+} addition with various concentration effected significantly to pectinase activity ($P < 0,01$). Inhibition Mg^{2+} type to pectinase was noncompetitive inhibition with value of K_I 2.684.

Keywords: Mg^{2+} , Pectinase, *Bacillus firmus*, pectin, galacturonate acid, non competitive inhibition

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan ke hadirat Allah SWT, karena hanya dengan rahmatnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Penambahan Mg^{2+} terhadap Aktivitas Pektinase dari *Bacillus firmus*” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Penulis skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis memberikan penghargaan dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, Ms, selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, arahan, serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc, selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, arahan, serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS, selaku Ketua Jurusan Kimia, Siti Maria Maria Ulfa, Dr. Sc., selaku dosen penguji dan Drs.Budi Kamulyan, selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan, kritik, dan masukan bagi penulis.
4. Segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia.
5. Ayah, Ibu, Adik, seluruh keluarga, dan teman-teman yang selalu mendoakan, memberikan dukungan, semangat, dan kasih sayang kepada penulis dalam mengerjakan skripsi ini.
6. Semua pihak yang telah banyak membantu memberikan dukungan dan semangat sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan

Malang, Juli 2012

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	2
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pektin.....	4
2.2 <i>Bacillus Firmus</i>	4
2.3 Enzim	5
2.4 Pektinase	6
2.5 Isolasi Enzim.....	7
2.6 Magnesium.....	7
2.7 Penentuan Kadar Gula Pereduksi dengan Metode DNS	8
2.8 Kinetika Reaksi Enzimatik.....	8
2.9 Inhibitor.....	11
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	15
3.2.1 Bahan Penelitian	15
3.2.2 Alat Penelitian.....	15
3.3 Rancangan Penelitian	15
3.4 Tahapan Penelitian	16
3.5 Cara Kerja	16

3.5.1 Pembuatan Media Padat.....	16
3.5.2 Pembuatan Media Cair.....	16
3.5.3 Peremajaan Biakan Murni <i>Bacillus firmus</i>	17
3.5.4 Pembuatan Biakan Aktif (Inokulum)	17
3.5.5 Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Pektinase.....	17
3.5.6 Pembuatan Kurva Standrat Glukosa	17
3.5.7 Penentuan Aktivitas Pektinase	18
3.5.8 Uji Aktivitas Enzim dengan Penambahan Mg^{2+}	18
3.5.9 Penentuan V_{maks} , K_M dan K_I	19
3.5.10 Analisis Data	20

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan Produksi Ekstrak Kasar Pektinase.....	21
4.2 Penentuan Aktivitas Pektinase	21
4.3 Pengaruh Penambahan Mg^{2+} Terhadap Aktivitas Pektinase	23
4.4 Penentuan Nilai Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis	25

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	28
5.2 Saran.....	28

DAFTAR PUSTAKA	29
LAMPIRAN	33

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Struktur Pektin..... 4
Gambar 2.2	Reaksi DNS dengan gula pereduksi 8
Gambar 2.3	Kurva Hubungan Konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi 9
Gambar 2.4	Kurva Lineweaver-Burk 11
Gambar 2.5	Skema Reaksi Enzimatis Untuk Inhibitor Kompetitif..... 11
Gambar 2.6	Grafik Inhibisi Kompetitif 12
Gambar 2.7	Skema Reaksi Enzimatis Untuk Inhibitor nonkompetitif..... 13
Gambar 2.8	Grafik inhibisi nonkompetitif 13
Gambar 2.9	Skema Reaksi Enzimatis Untuk Inhibitor unkompetitif..... 14
Gambar 2.10	Grafik inhibisi unkompetitif..... 14
Gambar 4.1	Mekanisme Reaksi Pektinase dan pektin..... 22
Gambar 4.2	Kurva Aktivitas Pektinase dengan penambahan variasi konsentrasi ion Mg^{2+} 24
Gambar 4.3	Kurva Hubungan $1/V_0$ dengan $1/[S]$ 25
Gambar 4.4	Skema Reaksi Enzimatis untuk Inhibitor non- kompetitif..... 27
Gambar C.2.1	Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus firmus</i> 41
Gambar C.3.1	Kurva Standar Gula Pereduksi 42
Gambar C.5.2	Kurva Aktivitas Pektinase dengan Penambahan Variasi Konsentrasi Mg^{2+} 44
Gambar C.6.2	Kurva Michaelis-Menten 46
Gambar C.6.4	Kurva Hubungan $1/V_0$ dan $1/[S]$ Pektinase..... 47

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel D.2.1 Data Absorbansi Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus firmus</i>	41
Tabel D.3.1 Data Absorbansi Gula Pereduksi.....	42
Tabel D.4.1 Data Absorbansi Aktivitas Pektinase pada $\lambda = 540 \text{ nm}$	43
Tabel D.4.2 Data Aktivitas Pektinase	43
Tabel D.5.1 Data Absorbansi Pektinase dengan Variasi Konsentrasi Mg^{2+}	43
Tabel D.5.2 Data Aktivitas Pektinase dengan Variasi Konsentrasi Mg^{2+}	44
Tabel D.6.1 Data Absorbansi Pektinase dengan Variasi Konsentrasi Substrat (tanpa Mg^{2+}) pada $\lambda=540 \text{ nm}$	45
Tabel D.6.2 Data Aktivitas Pektinase dengan Variasi Konsentrasi Substrat (tanpa Mg^{2+}) pada $\lambda=540\text{nm}$	45
Tabel D.6.3 Data Absorbansi Pektinase dengan Variasi Konsentrasi Substrat (dengan Mg^{2+}) pada $\lambda= 540 \text{ nm}$	46
Tabel D.6.4 Data Aktivitas Pektinase dengan Variasi Konsentrasi substrat (dengan Mg^{2+}) pada $\lambda = 540 \text{ nm}$	47
Tabel E.1.1 Data statistika pengaruh penambahan logam terhadap enzim	48
Tabel E.2.1 Tabel Daftar Analisis Ragam Satu Arah	50
Tabel E.2.2 Data uji BNT Pengaruh Mg^{2+} terhadap Aktivitas Pektinase	51

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Preparasi Larutan	33
A.1 Air Bebas Reduktor.....	33
A.2 Reagen DNS.....	33
A.3 Larutan Stok Glukosa.....	33
A.4 Larutan Baku Gula Pereduksi.....	33
A.5 Larutan Asam sitrat 0,1 M.....	33
A.6 Larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M.....	34
A.7 Larutan Baku Na-Sitrat.....	34
A.8 Substrat Pektin.....	34
A.9 Larutan Mg^{2+} 0,1 M.....	35
A.10 Larutan Mg^{2+} 2, 4, 6, 8, dan 10 mM dari larutan stok MgCl_2 0,1 M.....	35
A.11 Buffer Sitrat fosfat pH 7.....	35
A.12 Buffer sitrat pH 6.....	36
Lampiran B. Diagram Alir Penelitian	37
Lampiran C. Perhitungan	38
C.1 Perhitungan V_{maks} , K_M , dan K_I	38
C.2 Penentuan Konstanta Inhibisi.....	38
Lampiran D. Data Penelitian	40
D.1 Pengukuran Aktivitas Pektinase.....	40
D.2 Pembuatan kurva Pertumbuhan <i>Bacillus firmus</i>	41
D.3 Pembuatan kurva baku gula pereduksi.....	42
D.4 Aktivitas Pektinase.....	43
D.5 Aktivitas Pektinase dengan Variasi Konsentrasi Mg^{2+}	43
D.6 Pengukuran konstanta kinetika V_{maks} , K_M , dan K_I	45
Lampiran E. Uji Statistika	48
E.1 Aktivitas Pektinase dengan Penambahan Mg^{2+}	48
E.2 Perhitungan Nilai BNT 1%.....	50

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim adalah biokatalisator yang merupakan molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Peranan enzim sangat penting dalam reaksi kimia di dalam sel hidup yang mungkin sangat sulit dilakukan oleh reaksi kimia biasa. Kelebihan enzim dibandingkan katalis biasa adalah bersifat spesifik, selektif terhadap substrat tertentu[1], tanpa produk samping, dan ramah lingkungan. Sifat-sifat tersebut menyebabkan penggunaan enzim semakin meningkat dari tahun ke tahun, diperkirakan peningkatan mencapai 10-15% pertahun[2].

Pektinase merupakan enzim yang mendegradasi pektin, pada umumnya terdapat pada tumbuhan dan mikroorganisme[3]. Senyawa pektin merupakan polisakarida kompleks dengan komponen utama adalah asam D-Galakturonat yang dihubungkan dengan ikatan α -(1,4)-Glukosida. Substansi tersebut menunjukkan turunan karbohidrat dengan berat molekul dan komposisi kompleks[4].

Beberapa mikroba merupakan sumber penghasil enzim yang sangat potensial[5]. Mikroba yang dapat menghasilkan pektinase diantaranya adalah berbagai jenis bakteri seperti *Bacillus sp*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, berbagai kapang seperti *Aspergillus*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Fuzarium* dan berbagai jenis kamir seperti *Candida*, *Saccharomyces*, dan *Endomycopsis*[3]. Dalam penelitian ini digunakan *Bacillus firmus* karena dalam penelitian Roosdiana dkk menyatakan bahwa *Bacillus firmus* hasil isolasi dari air susu sapi telah menunjukkan adanya aktivitas pektinase[6].

Dalam bidang industri, pektinase banyak digunakan dalam pengolahan limbah cair, pemutihan kertas, pembuatan minuman anggur (wine) dan penjernihan sari buah[7]. Disisi lain dalam proses penjernihan sari buah, adanya pengaruh ion-ion logam yang terkandung dalam buah terhadap aktivitas pektinase dalam proses penjernihan sari buah belum banyak diteliti. Ion logam yang banyak terkandung dalam buah-buahan salah satunya adalah Magnesium. Kandungan magnesium dalam buah berbeda-beda misalnya alpukat 6,44 mg/100g , anggur 4,5 mg/100g, apel 2,41 mg/100g, jeruk 10,06

mg/100g, durian 16,8 mg/100g, dan lain-lain[8]. Dari kandungan magnesium diatas, diperoleh konsentrasi magnesium berturut-turut adalah 2,68 mM, 1,874 mM, 1,004 mM, dan 4,19 mM, 7,004 mM

Adanya ion logam dapat mempengaruhi sisi aktif enzim dan kestabilan molekul protein, sehingga pada konsentrasi tinggi ion logam dapat mempengaruhi ikatan antara enzim dan substrat. Dengan demikian ion logam dapat bertindak sebagai aktivator atau inhibitor. Pada konsentrasi 0-30 mM logam alkali misalnya K^+ , Na^+ , Ca^{2+} dan Mg^{2+} dapat meningkatkan aktivitas pektinase[9], akan tetapi pada penelitian Banu [10] menyatakan bahwa penambahan 5 mM Mg^{2+} yang ditambahkan pada uji aktivitas pektinase yang diproduksi oleh *Penicillium chrysogenum* dapat menghambat aktivitas pektinase sebesar 21,2%. Oleh karena itu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan Mg^{2+} terhadap aktivitas pektinase yang diperoleh dari *Bacillus firmus*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dirumuskan permasalahan berikut:

1. Bagaimana pengaruh penambahan Mg^{2+} terhadap aktivitas pektinase yang diisolasi dari *Bacillus firmus*?
2. Berapa nilai parameter kinetika (V_{maks} , K_M , dan K_I) reaksi enzimatik pektinase yang diproduksi dari *Bacillus firmus*?

1.3 Batasan Masalah

1. *Bacillus firmus* hasil isolasi dari susu sapi blitar, diperoleh dari Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya.
2. Pektinase yang digunakan berupa ekstrak kasar
3. Variasi konsentrasi Mg^{2+} yang digunakan 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 mM
4. Substrat pektin dalam buffer sitrat-fosfat pH 7 dengan variasi konsentrasi yang digunakan 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 dan 0,8 % (b/v).

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh penambahan Mg^{2+} terhadap aktivitas pektinase hasil isolasi dari *Bacillus firmus*.
2. Mengetahui nilai parameter kinetika meliputi V_{maks} , K_M , dan K_I pada pektinase dari *Bacillus firmus*

1.5 Manfaat Penelitian

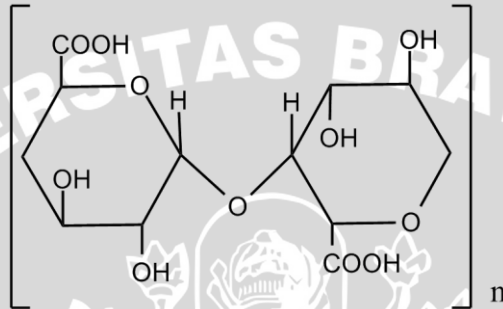
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh Mg^{2+} terhadap aktivitas pektinase pada proses penjernihan jus buah.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 PEKTIN

Pektin merupakan senyawa kompleks polisakarida yang terdiri dari asam D-Galakturonat yang dihubungkan dengan ikatan α -(1,4)-Glikosida[11] yang ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 struktur pektin

Senyawa ini terdapat pada komponen utama lamela tengah antar dinding sel[12]. Pektin pada tumbuhan banyak terdapat pada lapisan kulit pada buah[13]. Kandungan pektin dari setiap buah berbeda-beda misalnya apel 0,5-16%, pisang 0,7-1,2%, stroberi 0,6-0,7% dan lain-lain[12].

Pektin berwujud bubuk putih hingga coklat terang. Pektin banyak dimanfaatkan pada industri pangan sebagai bahan perekat dan stabilizer dengan tujuan agar tidak terbentuk endapan pada suatu larutan[13]. Pektin dapat membentuk gel dengan bantuan adanya asam dan gula[14].

2.2 *Bacillus firmus*

Bacillus firmus merupakan bakteri gram positif yang berbentuk batang, biasanya diisolasi dari tanah dan mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim ekstraseluler, salah satunya adalah pektinase[5]. Adapun klasifikasi dari *Bacillus firmus* adalah sebagai berikut[15]:

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Divisi	: <i>Firmicutes</i>
Klas	: <i>Bacilli</i>

Ordo : *Bacillales*
 Famili : *Bacillaceae*
 Genus : *Bacillus*
 Spesies : *Firmus*

Bakteri ini mempunyai panjang antara 1,5 µm sampai 3 µm dan lebar antara 0,6 µm sampai 0,8 µm [16]. Suhu pertumbuhannya minimum 15°C dan maksimum 55°C [15].

2.3 Enzim

Enzim merupakan kelompok protein yang mempunyai peran penting dalam aktivitas biologis [17]. Peranan enzim sangat penting dalam reaksi kimia di dalam sel hidup yang mungkin sangat sulit dilakukan oleh reaksi kimia biasa. Dalam reaksi tersebut enzim mengubah senyawa yang disebut substrat menjadi bentuk suatu senyawa baru yang disebut produk [18] dengan reaksi enzimatik yang ditunjukkan pada persamaan 2.1



Dimana :
 E = enzim
 S = substrat
 ES = kompleks enzim substrat
 P = hasil reaksi

Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim diantaranya:

a. Suhu

Enzim memiliki kisaran suhu optimum tertentu untuk mempengaruhi kemampuan katalisnya. Apabila suhu terlalu rendah. Sedangkan pada suhu yang tinggi akan merusak struktur enzim, dan akhirnya enzim kehilangan aktivitasnya. Oleh karena itu enzim harus berada pada suhu yang optimum karena dapat meningkatkan laju reaksi [18].

b. Pengaruh pH

Perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. pH rendah atau pH tinggi dapat pula

menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim[18].

c. Waktu inkubasi

Waktu inkubasi merupakan waktu yang dibutuhkan enzim untuk berikatan dengan substrat. Semakin lama waktu inkubasi semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat. Sehingga, produk yang dihasilkan semakin besar[19].

d. Konsentrasi substrat

Kecepatan reaksi enzimatik dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Penambahan konsentrasi enzim sampai jumlah tertentu dengan jumlah enzim yang tetap akan mempercepat reaksi enzimatik sampai mencapai maksimum[19].

e. Pengaruh aktivator dan inhibitor

Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat menaikkan kecepatan reaksi enzimatik. Komponen kimia yang membentuk aktifitas enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion anorganik seperti Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} dan Mg^{2+} atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim. Selain itu aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh Inhibitor. Inhibitor adalah molekul atau ion yang dapat menghambat aktivitas enzim[20].

2.4 Pektinase

Pektinase merupakan kelompok enzim hidrolase yang menghidrolisis zat pektin, yang biasanya terdapat pada tanaman[12]. Enzim tersebut adalah (1) Pektin metil esterase (PME), enzim ini mengkatalisis deesterifikasi gugus metoksi pada pektin sehingga menghasilkan asam pektat dan methanol (2) Pektin asetil esterase (PAE), enzim ini menghidrolisis ester asetil pada pektin sehingga menghasilkan asam pektat dan asetat (3) Polimetil Galakturonase, enzim ini mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik pada kerangka pektin sehingga menghasilkan 6-metil-D-galakturonat[21].

Pektinase ini ini banyak diproduksi oleh mikroorganisme seperti bakteri dan jamur[12]. Jamur yang dapat memproduksi pektinase adalah *Aspergillus sp.*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma*

sp. dll[22]. Sedangkan bakteri yang dapat menghasilkan pektinase adalah *Bacillus coagulans* dan *Bacillus firmus*[23].

Kondisi optimum aktivitas pektinase tergantung pada jenis mikroba yang menghasilkan. Seperti, pektinase dari *Penicillium chrysogenum* mempunyai aktivitas maksimum pada pH 6,5, dan suhu 50 °C[10], pektinase dari *Bacillus sp.* optimum pada pH 7,0 dan suhu 60 °C, sedangkan pektinase dari *Aspergillus niger* optimum pada pH 4,6 dan suhu 40 °C[21].

Pektinase dalam industri sari buah digunakan sebagai biokatalis untuk merombak senyawa pektat atau pektin sehingga dapat meningkatkan kemampuan penyaringan (filterability) sari buah[12].

2.5 Isolasi enzim

Berdasarkan lokasinya enzim terbagi menjadi dua macam, yaitu enzim ekstraseluler (di luar sel) dan enzim intraseluler (di dalam sel). Dalam hal ini isolasi enzim ekstraseluler lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan isolasi enzim intraseluler, karena tanpa melalui proses pemecahan sel [24]

Isolasi enzim merupakan pelepasan enzim dari sel dengan cara menghancurkan dinding sel atau membran secara kimiawi, mekanik, fisik dan enzimatis. Untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan enzim dari sisa sel yang telah hancur [25]. Ada beberapa metode yang digunakan untuk isolasi enzim antara lain ekstraksi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi, presipitasi, dan kromatografi[26]. Metode sentrifugasi merupakan operasi utama untuk pemisahan partikel dari larutan dalam proses isolasi enzim, pemisahan sel-sel dari medium biakan, pemisahan atau penghancuran sel dan presipitat [27] untuk mempertahankan kestabilan enzim pada saat isolasi dilakukan ditambahkan larutan buffer dan dilakukan pada suhu rendah [28].

2.6 Magnesium

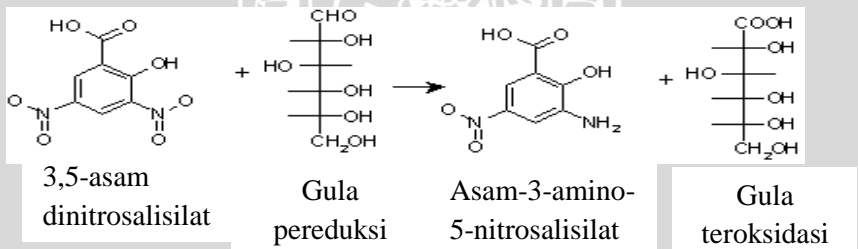
Ion magnesium merupakan ion yang berperan dalam menstabilkan sub satuan protein oligomerik. Mg^{2+} juga merupakan salah satu ion yang mempunyai peranan yang sangat penting dalam proses metabolik yang berkaitan erat dengan kerja katalitik enzim.[20] selain itu ion Magnesium merupakan unsur yang penting

untuk pertumbuhan tanaman. Tanpa magnesium tanaman tidak dapat menggunakan cahaya untuk berfotosintesis. Kandungan magnesium dalam buah berbeda-beda misalnya alpukat 2,68 mM, anggur 1,874 mM, apel 1,004 mM, jeruk 4,19 mM, durian 7,004 mM, dan lain-lain[8].

2.7 Penentuan Kadar Gula Pereduksi dengan Metode DNS

Gula pereduksi merupakan gula yang mampu mereduksi senyawa pengoksidasi. Konsentrasi gula dapat ditentukan dengan cara mengukur konsentrasi senyawa pengoksidasi yang tereduksi oleh suatu larutan gula tertentu[20]

Pengukuran aktivitas pektinase dapat ditentukan dengan metode spektrofotometri yaitu dengan mengukur absorbansi larutan sampel yang telah bereaksi dengan reagen. Metode yang digunakan adalah metode DNS (Asam dinitrosalisilat). Prinsip dari metode ini adalah gula pereduksi hasil hidrolisis enzim akan mereduksi asam dinitrosalisilat dan selanjutnya akan membentuk kompleks warna merah kecoklatan sebagai kompleks warna dari asam-3-amino-5-nitrosalisilat dalam suasana basa sedangkan glukosa akan teroksidasi menjadi asam glukonat. Kompleks warna tersebut kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yaitu 540 nm. Reaksi yang terjadi pada saat penambahan reagen DNS dalam sampel enzim yang akan dianalisis[29] ditunjukkan pada Gambar 2.2



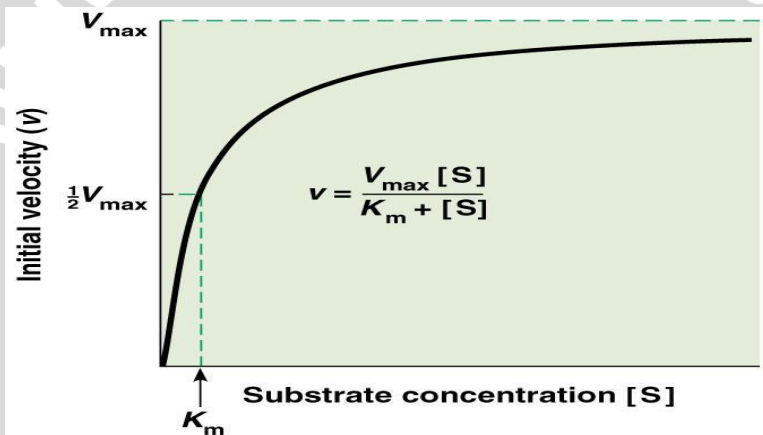
Gambar 2.2 Reaksi DNS dan Gula pereduksi

2.8 Kinetika reaksi enzimatik

Analisis kinetika reaksi enzimatis meliputi dua parameter, yaitu kecepatan maksimum (V_{maks}) dan tetapan Michaelis-Menten (K_M). V_{maks} merupakan 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. Nilai V_{maks} ini dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Semakin besar konsentrasi substrat, maka laju reaksi enzimatik akan semakin cepat sehingga pada akhirnya akan tercapai titik batas. Jika titik batas telah dilampaui, maka laju reaksi hanya akan meningkat sedemikian kecil dengan bertambahnya konsentrasi substrat dan tidak akan pernah mencapai laju maksimum.

Pada batas laju maksimum (V_{maks}), enzim menjadi jenuh oleh substrat, sehingga pada suatu saat penambahan konsentrasi substrat tidak memberikan pengaruh lagi terhadap laju reaksi[20]. Kondisi tersebut ditunjukkan pada Gambar 2.3



Gambar 2.3 Kurva Hubungan konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzim

Sedangkan K_M merupakan konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimumnya. Nilai K_M perlu ditetapkan karena [30]:

1. K_M menetapkan pendekatan nilai pada tingkat intraseluler substrat
2. K_M dapat digunakan untuk membandingkan enzim dari organisme yang berbeda dari jaringan yang berbeda atau dari jaringan yang berbeda pada organisme yang sama

3. Perubahan induksi ligan pada nilai efektif K_M merupakan salah satu bentuk pengaturan aktivitas enzim
4. Jika kita mengetahui nilai K_M maka kita dapat menyesuaikan kondisi penentuan dan memudahkan penentuan V_{maks}
5. K_M mengindikasikan kesesuaian relatif pergantian substrat dengan enzim atau menggambarkan kesetimbangan disosiasi kompleks enzim substrat.

Untuk menentukan nilai K_M dan V_{maks} terlebih dahulu ditentukan daerah konsentrasi substrat yang optimum. Hubungan antara penambahan konsentrasi substrat dengan laju reaksi (V) dapat dinyatakan secara oleh persamaan Michaelis-Menten pada persamaan 2.2

$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.2)$$

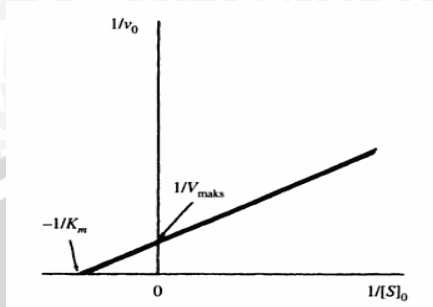
dengan V_0 = kecepatan awal pada konsentrasi substrat $[S]$

V_{maks} = kecepatan maksimum

K_M = tetapan Michaelis-Menten

Pengukuran yang didasarkan pada persamaan Michaelis-Menten masih sederhana. Nilai K_M dapat diperoleh dengan menggunakan prosedur kurva Michaelis-Menten. Akan tetapi sulit untuk menentukan nilai V_{maks} dengan tepat dari kurva Michaelis-Menten, karena hanya berupa dugaan dan tidak pernah diketahui nilai sebenarnya. Untuk mendapatkan nilai K_M dan V_{maks} pada saat sebelum dan sesudah adanya inhibitor yang lebih tepat, dapat diperoleh dengan memetakan data yang sama dengan cara menggunakan persamaan Lineweaver-Burk yang merupakan kebalikan dari persamaan Michaelis-Menten. Persamaan Lineweaver-Burk yang merupakan kebalikan dari persamaan Michaelis-Menten[31] pada persamaan 2.4

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2.3)$$



Gambar 2.4 Kurva Lineweaver-Burk

Nilai K_M dan V_{maks} pektinase dari *Penicillium chrysogenum* pada penelitian Banu [10] adalah 1% dan $85 \mu\text{g/mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ sedangkan dari *Pleurotus Ostreatus* adalah 1,33% dan $28,6 \mu\text{g/mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ [32].

2.9 Inhibitor

Inhibitor dapat bersifat reversible maupun irreversible, jika bersifat irreversible inhibitor akan memodifikasi enzim secara kimiawi. Modifikasi suatu gugus fungsi dalam molekul enzim tersebut akan menyebabkan enzim tidak aktif. Sebaliknya jika inhibitor bersifat reversible tidak terjadi proses destruksi atau modifikasi suatu gugus fungsi dalam molekul enzim tersebut sehingga enzim tidak rusak. Ada tiga golongan inhibitor reversible[20] :

1. Inhibitor kompetitif

Inhibitor ini berkompetisi secara langsung dengan substrat untuk mengikat sisi aktif enzim, inhibitor akan berikatan secara reversible kepada enzimaq dan dicapai kesetimbangan dengan cepat membentuk kompleks enzim inhibitor yang secara katalitik tidak aktif. Model umum untuk inhibisi kompetitif diperlihatkan pada Gambar 2.5



+

I

↓

E

Gambar 2.5 Skema reaksi enzimatik untuk inhibitor kompetitif

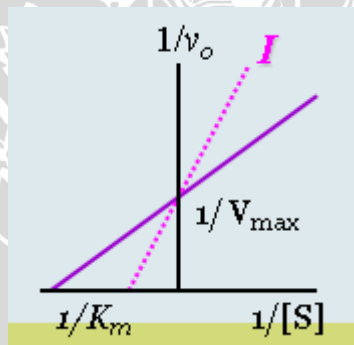
Dengan demikian didapatkan persamaan reaksi enzimatik untuk inhibisi kompetitif dapat dilihat sebagai berikut:

$$V_0 = \frac{V_{\text{maks}} [S]}{\alpha K_M + [S]} \quad (2.4)$$

dengan : $\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$

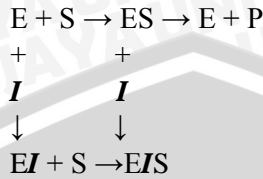
Dari persamaan 2.4 dapat dibuat grafik *Lineweaver-Burk* (Gambar 2.6) dengan cara membalik persamaan tersebut, sehingga diperoleh persamaan 2.5:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{\text{maks}}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{maks}}} \quad (2.5)$$



Gambar 2.6 Grafik inhibisi kompetitif

2. Inhibitor non-kompetitif
inhibitor jenis ini disebabkan oleh adanya inhibitor yang berikatan dengan enzim bebas maupun kompleks enzim substrat, sehingga dapat menurunkan kadar enzim yang aktif. Model umum untuk inhibisi non-kompetitif diperlihatkan pada Gambar 2.7



Gambar 2.7 Skema reaksi enzimatik untuk inhibitor non-kompetitif

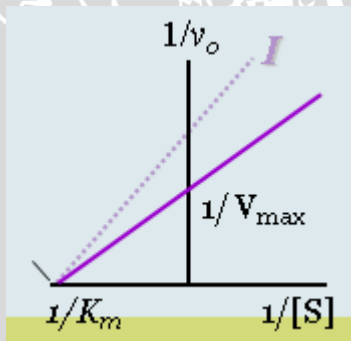
Dengan demikian didapatkan persamaan reaksi enzimatik untuk inhibisi kompetitif dapat dilihat sebagai berikut:

$$V_0 = \frac{V_{\text{maks}} [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]} \quad (2.6)$$

dengan : $\alpha = (1 + \frac{[I]}{K_i})$

Dari persamaan 2.6 dapat dibuat grafik *Lineweaver-Burk* (Gambar 2.8) dengan cara membalik persamaan tersebut, sehingga diperoleh persamaan 2.7:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{\text{maks}}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\text{maks}}} \quad (2.7)$$

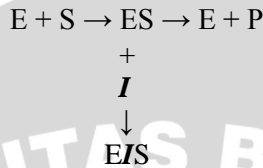


Gambar 2.8 Grafik inhibisi non-competitif

3. Inhibitor unkompetitif

Inhibitor jenis ini disebabkan oleh adanya inhibitor yang menyerang kompleks enzim substrat (ES). Inhibitor jenis ini

tidak menghalangi pembentukan kompleks ES akan tetapi menghalangi pembentukan produk. Model umum untuk inhibisi unkompetitif diperlihatkan pada Gambar 2.9



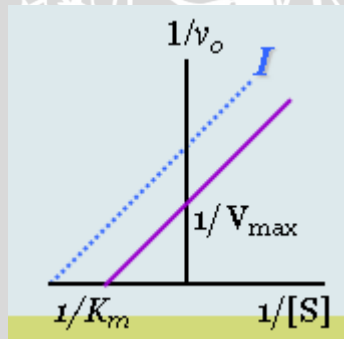
Gambar 2.9 Skema reaksi enzimatik untuk inhibitor unkompetitif

Dengan demikian didapatkan persamaan reaksi enzimatik untuk inhibisi kompetitif dapat dilihat sebagai berikut :

$$V_0 = \frac{V_{\text{maks}} [S]}{K_M + \alpha' [S]} \quad (2.8)$$

Dari persamaan 2.8 dapat dibuat grafik *Lineweaver-Burk* (Gambar 2.10) dengan cara membalik persamaan tersebut, sehingga diperoleh persamaan 2.9:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_M}{V_{\text{maks}}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\text{maks}}} \quad (2.9)$$



Gambar 2.10 Grafik inhibisi unkompetitif

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama tiga bulan, yaitu dimulai pada bulan Maret sampai Mei 2012 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia – FMIPA, Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur murni bakteri *Bacillus firmus* yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya. Bahan-bahan *for microbiology* digunakan antara lain pektin, *bactoagar*, pepton, *yeast extract*, dan bahan kimia p.a antara lain asam sitrat ($C_6H_8O_7$), natrium sitrat ($C_6H_7O_7Na$), asam dinitrosalisilat (DNS), kalium hidrofosfat (KH_2PO_4), kalsium klorida ($CaCl_2$), amonium fosfat ($(NH_4)_2SO_4$), magnesium hidrofosfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), magnesium klorida ($MgCl_2$), Na-K Tartat, natrium hidroksida (NaOH), sodium sulfat (Na_2SO_3), fenol (C_6H_6O), kalium permanganat ($KMnO_4$), glukosa, natrium fosfat (Na_2HPO_4), dan akuades.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain erlenmeyer 100 ml dan 250 ml, pipet ukur 10 ml, pipet tetes, pengaduk kaca, tabung reaksi, gelas arloji, labu ukur 10 mL dan 100 mL, jarum ose, sentrifuse dingin (Joan MR 1889), magnetik stirer, inkubator (Heraeus Type B 5042), neraca analitik mettler (Bosch PE 620), pH meter (inolab WTW), Spektronik 20, kuvet, penangas air (Memmert W 200), autoklaf (All American Model 20x0, shaker (Edmund Buhler SM 252413). Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu)

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu RAL (Rancangan Acak Lengkap), penentuan konsentrasi ion logam dan substrat terhadap aktivitas ekstrak kasar pektinase dalam penentuan konstanta inhibisi dan jenis inhibisi pada *Bacillus firmus* dengan perlakuan sebagai berikut:

Percobaan penentuan pengaruh konsentrasi Mg^{2+} dengan variasi konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 mM.

3.4 Tahapan penelitian

Tahapan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Penyiapan media padat
2. Pembuatan media cair
3. Peremajaan biakan murni *Bacillus firmus*
4. Pembuatan inokulum
5. Produksi dan isolasi ekstrak kasar pektinase
6. Pembuatan kurva standar glukosa
7. Penentuan aktivitas pektinase
8. Uji aktivitas enzim dengan penambahan Mg^{2+}
9. Penentuan konstanta kinetika
10. Analisis data

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pembuatan media padat

Media yang digunakan untuk peremajaan kultur murni bakteri *Bacillus firmus* adalah media agar miring yang terdiri dari 0,5 gram pektin, 0,25 gram pepton, 0,02 gram KH_2PO_4 , 0,03 gram $CaCl_2$, 0,14 gram $(NH_4)_2SO_4$ dan 0,03 gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 mL dan yeast extract sebanyak 0,1 g, lalu ditambahkan larutan buffer sitrat pH 6,0 sebanyak 5 mL dan dilarutkan dalam erlenmeyer yang berisi 100 mL akuades. Setelah itu dipanaskan hingga mendidih dan kemudian ditambahkan 1,5 gram agar, kemudian diaduk hingga larutan homogen. Setelah itu larutan tersebut dipipet 4 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas, yang kemudian disterilkan dalam autoklav pada suhu $121^{\circ}C$ dengan tekanan 15 psi, selama 15 menit. Selanjutnya tabung reaksi tersebut diposisikan miring pada suhu ruang hingga mengeras.

3.5.2 Pembuatan Media cair

Media pertumbuhan *Bacillus firmus* untuk menghasilkan enzim pektinase adalah dengan media cair yang dibuat dengan menimbang 2,5 gram pektin, 1,25 gram pepton, 0,1 gram KH_2PO_4 , 0,15 gram $CaCl_2$, 0,7 gram $(NH_4)_2SO_4$, 0,15 gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, dan 0,5 g yeast extract kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia dan

ditambahkan 25 mL buffer sitrat pH 6,0 lalu ditambahkan akuades hingga larutan mencapai 500 mL sambil diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya larutan tersebut dipipet 100 mL ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian ditutup kapas dan disterilkan dalam autoklav pada suhu 121⁰C, tekanan 15 psi, selama 15 menit.

3.5.3 Peremajaan Biakan Murni *Bacillus firmus*

Biakan murni *B. firmus* diremajakan dalam media padat agar miring yang telah siap dengan cara menggosokkan jarum ose yang mengandung *B. firmus* dengan mendekatkan mulut tabung pada nyala api saat menggosokkan jarum. Tabung ditutup kembali dengan kapas steril dan diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 72 jam yang akan dihasilkan subkultur biakan murni.

3.5.4 Pembuatan Biakan Aktif (Inokulum)

Bakteri yang telah tumbuh dalam media padat miring yang berumur 1 hari diambil sebanyak satu mata ose dan dimasukkan ke dalam 250 mL media cair. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang di atas shaker dengan kecepatan putar 125 rpm selama setengah fasa logaritmik yaitu 13 jam.

3.5.5 Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Pektinase

Erlenmeyer 250 mL yang terisi 100 mL media cair yang telah disterilkan ditambahkan 10 mL inokulum secara aseptis, kemudian diinkubasi dalam suhu dan dikocok di atas shaker dengan kecepatan 125 rpm sampai mencapai akhir fase logaritma yaitu 18 jam (kurva pertumbuhan *Bacillus firmus* didapatkan dari penelitian sebelumnya)[33]. (Lampiran D.2)

Selanjutnya ditambahkan 1 mL buffer sitrat pH 6, dan disentrifugasi dingin dengan kecepatan putar 3000 rpm selama 20 menit. Supernatant yang merupakan ekstrak kasar pektinase, dipisahkan dan kemudian diuji aktivitasnya.

3.5.6 Pembuatan kurva standar Glukosa

Disiapkan 5 tabung reaksi, masing-masing diisi dengan 1 ml larutan glukosa standart dengan konsentrasi 500; 1000; 1500; 2000 dan 2500 mg/L. Kemudian, ditambahkan buffer sitrat-fosfat pH 7 sebanyak 1 mL dan 2 mL reagen DNS pada masing-masing tabung.

Ditambahkan lagi akuades sebanyak 3 mL. Selanjutnya, mulut tabung ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam penangas air selama 5 menit. Kemudian didiamkan hingga larutan mencapai suhu kamar dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL setelah itu ditambahkan akuades hingga tanda batas. Selanjutnya dibaca intensitasnya pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dan dibuat kurva standart antara konsentrasi glukosa (ppm) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

3.5.7 Penentuan aktivitas pektinase

Penentuan aktivitas enzim pektinase dilakukan dengan cara menguji larutan uji yang terdiri dari 1 mL pektin 0,7%, 1 mL buffer sitrat-fosfat pH 7, dan 1 mL ekstrak kasar enzim serta 2 mL akuades. Campuran ini diinkubasi pada 50 °C selama 30 menit. Kemudian ditambahkan 2 mL reagent DNS yang selanjutnya dipanaskan selama 5 menit lalu didinginkan hingga mencapai suhu kamar. Setelah dingin, larutan tersebut dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Mengukur aktivitas enzim dilakukan dengan cara mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh sebelumnya pada persamaan linier kurva standar gula pereduksi, kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$AE = \frac{x \cdot v \cdot fp}{p \cdot q} \quad (3.1)$$

Dimana :

- AE = aktivitas enzim ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{menit}^{-1}$)
- x = konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)
- v = volume total sampel tiap tabung (mL)
- p = volume ekstrak kasar enzim (mL)
- q = waktu reaksi (menit)
- fp = factor pengenceran

3.5.8 Uji Aktivitas Enzim dengan Penambahan Mg^{2+}

Diambil 1 mL substrat pektin 0,7% (g/mL) ke dalam 6 tabung reaksi. Selanjutnya tiap tabung ditambahkan 1 mL pektinase, 1 mL buffer sitrat-fosfat pH 7 dan 1 mL air bebas reduktor. selanjutnya masing- masing tabung (tabung 2-6) ditambahkan 1 ml $MgCl_2$ 2; 4; 6; 8 dan 10 mM. Untuk menyamakan volume larutan pada tabung 1 ditambahkan 2 mL akuades. Kemudian semua tabung reaksi tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu $50^{\circ}C$ selama 30 menit. Selanjutnya, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan pada penangas air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya dibiarkan hingga larutan mencapai suhu kamar dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL setelah itu ditambahkan akuades hingga tanda batas. Selanjutnya diukur kadar gula pereduksinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada pajang gelombang 540 nm.

3.5.9 Penentuan V_{maks} , K_M dan K_I

Untuk penentuan nilai V_{maks} dan K_M dilakukan dengan menguji aktivitas pektinase dengan cara membuat variasi konsentrasi pektin 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 %(g/mL). Kemudian, dipipet 1 mL ke masing-masing tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 1 mL buffer sitrat-fosfat pH 7, 1 mL pektinase, 2 mL akuades, dan diinkubasi pada suhu $50^{\circ}C$ selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya, didinginkan dalam air es sehingga mencapai suhu kamar dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL setelah itu ditambahkan akuades hingga tanda batas. Kemudian diukur kadar gula pereduksinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada pajang gelombang 540 nm.

Sedangkan untuk menentukan harga konstanta inhibisi (K_I) ditentukan dengan menguji aktivitas pektinase dengan cara membuat variasi konsentrasi substrat pektin 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5% (g/mL). Kemudian dipipet 1 mL kedalam masing-masing tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL buffer sitrat-fosfat pH 7, 1 mL pektinase, 1 mL air bebas reduktor, 1 mL $MgCl_2$ 8 mM. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu $50^{\circ}C$ selama 30 menit, dan ditambahkan 2 mL reagen DNS Kemudian dimasukkan penangas air mendidih selama 5 menit, setelah dingin, masing-masing larutan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Selanjutnya,

masing-masing larutan diukur kadar gula pereduksinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada pajang gelombang 540 nm

3.5.10 Analisis Data

Data pengaruh konsentrasi Mg^{2+} terhadap aktivitas pektinase dianalisis menggunakan analisis ragam (uji F) pada Rancangan Acak Lengkap (RAL) dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil 1% (BNT). Langkah perhitungan analisa data adalah sebagai berikut:

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}]^2}{np} \quad (3.2)$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK)

- a. JK total = $[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2] - FK$ (3.3)

- b. JK perlakuan (JK_p) = $\frac{[\sum_{i=1}^p (\sum_{j=1}^n Y_{ij})^2]}{n_1} - FK$ (3.4)

- c. JK galat percobaan (JK_G) = JK_{total} - JK_{perlakuan} (3.5)

3. Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber keragaman

- a. Kuadrat Tengah perlakuan (KT_p) = $\frac{JK_p}{db_{perlakuan}}$ (3.6)

- b. Kuadrat Tengah galat percobaan (KT_G) = $\frac{JK_{GP}}{db_{percobaan}}$ (3.7)

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KT_p}{KT_G} \quad (3.8)$$

Keterangan: p = banyaknya percobaan

n = banyaknya ulangan

5. Untuk mengetahui perlakuan mana saja yang berpengaruhberbeda satu dengan lainnya, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT):

Menghitung nilai BNT dengan $\alpha = 1\%$

$$BNT(\alpha) = t_{dbg}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KT_{galat}}{n}} \quad (3.9)$$

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini mengkaji mengenai pengaruh penambahan Mg^{2+} pada berbagai konsentrasi terhadap aktivitas pektinase dan penentuan nilai parameter kinetika reaksi enzimatik yaitu V_{maks} , K_M dan K_I

4.1 Isolasi dan Produksi Ekstrak Kasar Pektinase

Media produksi yang telah disterilkan ditambahkan 10 mL inokulum secara aseptik, kemudian diinkubasi dalam suhu dan dikocok diatas shaker dengan kecepatan 125 rpm selama 18 jam atau sampai mencapai akhir fase logaritma karena pada fase ini bakteri sangat aktif mensintesis enzim untuk memenuhi kebutuhan hidupnya. Selanjutnya dilakukan isolasi pektinase, isolasi enzim merupakan pelepasan enzim dari sel dengan cara menghancurkan dinding sel atau membran secara kimiawi, mekanik, fisik dan enzimatik.

Isolasi pektinase ini dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi. Sentrifugasi merupakan suatu metode pemisahan yang berdasarkan pada perbedaan kecepatan sedimentasi dari partikel-partikel molekul yang disebabkan oleh adanya gaya sentrifugal.

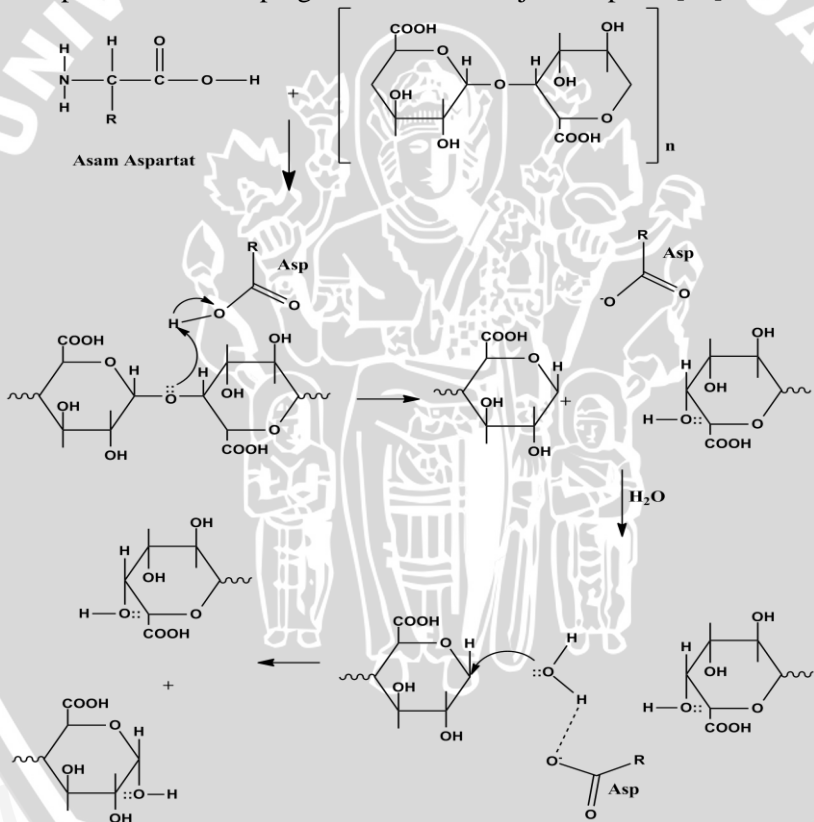
Sentrifugasi dalam penelitian ini dilakukan dengan penambahan buffer sitrat pH 6 yang berfungsi untuk meningkatkan kelarutan sehingga mempermudah dalam pemisahannya dari molekul-molekul lainnya yang tidak larut seperti sisa-sisa jaringan *Bacillus firmus*. Selain itu digunakan buffer pH 6 karena pH ini merupakan pH optimum untuk produksi pektinase dari *Bacillus firmus*. Selanjutnya larutan campuran tersebut disentrifugasi dingin pada temperatur 4°C. Proses sentrifugasi ini dilakukan pada suhu rendah untuk menjaga kestabilan enzim. Dari proses sentrifugasi ini dihasilkan endapan dan supernatan yang merupakan ekstrak kasar pektinase.

4.2 Penentuan Aktivitas Pektinase

Pektinase dari hasil isolasi kemudian digunakan dalam penentuan aktivitasnya pada pengukuran selanjutnya. Pektinase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis pektin menjadi asam galakturonat yang merupakan gula pereduksi. Aktivitas pektinase

dapat ditentukan berdasarkan banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan oleh pektinase. Pada penelitian ini penentuan aktivitas pektinase ditentukan dengan metode spektrofotometri dengan menggunakan reagen asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Gula pereduksi yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis akan mereduksi asam dinitrosalisilat sehingga dapat membentuk kompleks warna merah kecoklatan. Setelah itu diukur dengan spektrofotometer Uv-Vis dengan $\lambda = 540 \text{ nm}$.

Mekanisme reaksi enzimatik seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.1 menunjukkan bahwa pektinase mempunyai gugus aktif yang dapat menghidrolisis pektin yaitu gugus karboksil yang merupakan rantai samping dari asam amino jenis aspartat[34].



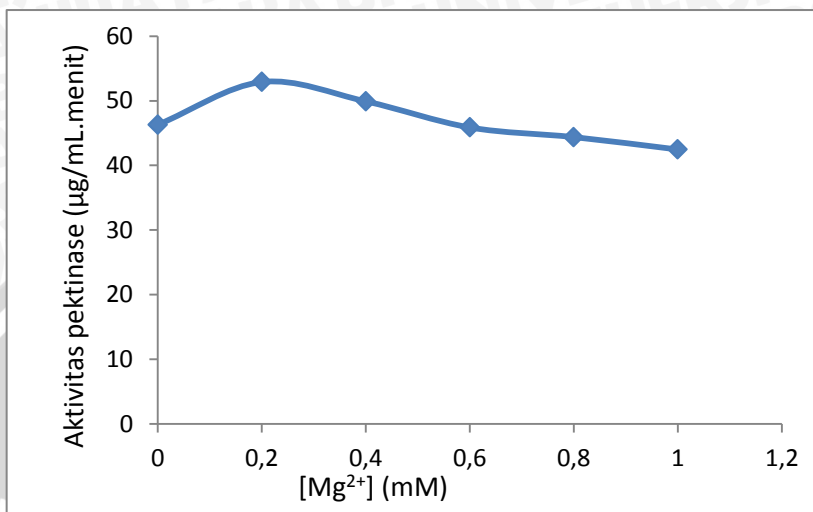
Gambar 4.1 Mekanisme reaksi pektinase dan pektin

Mekanisme tersebut menjelaskan bahwa elektron bebas dari atom oksigen pada ikatan glikosidik akan menarik ion H^+ dari asam aspartat, sehingga atom oksigen tersebut akan berikatan dengan ion H^+ dari asam aspartat dan ikatan pada C_1 terputus, sehingga atom C_1 bermuatan positif, disisi lain adanya elektron bebas dari atom oksigen pada H_2O akan menyerang C_1 dan membentuk ikatan antara C_1 dan atom oksigen dari H_2O , sedangkan salah satu atom H dari H_2O akan berikatan dengan gugus karboksil yang bermuatan negatif. Dari reaksi tersebut terbentuk monomer-monomer pektin yaitu asam galakturonase. Dalam penelitian ini didapatkan aktivitas pektinase maksimum yaitu sebesar 56,192 U/mL yang pada 0,7 % substrat pektin (Lampiran D.4.2)

4.3 Pengaruh penambahan Mg^{2+} terhadap aktivitas pektinase

Pada penentuan aktivitas pektinase dengan penambahan Mg^{2+} dengan variasi konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 mM yang diencerkan 10 mL sehingga konsentrasi dalam sampel menjadi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mM. Gambar 4.2 menunjukkan bahwa penambahan Mg^{2+} berpengaruh terhadap aktivitas pektinase. Pada kurva tersebut dapat disimpulkan bahwa Mg^{2+} dapat bertindak sebagai aktivator maupun inhibitor. Jika Mg^{2+} sebagai aktivator maka aktivitas enzim akan meningkat dibandingkan sebelum penambahan Mg^{2+} , sebaliknya jika Mg^{2+} sebagai inhibitor maka aktivitas enzim akan menurun dibandingkan sebelum penambahan.

Dari Gambar 4.2 dapat diketahui bahwa pada konsentrasi sampel 0,2 dan 0,4 mM Mg^{2+} berfungsi meningkatkan aktivitas pektinase (aktivator) yang berperan dalam pembentukan kompleks enzim dengan substrat. Mg^{2+} merupakan asam lewis keras yang mempunyai peran yang sama seperti ion H^+ pada asam aspartat. Mg^{2+} mendorong pasangan elektron bebas dari atom O yang digunakan untuk membentuk ikatan glikosidik, selanjutnya terjadi proses hidrolisis oleh adanya H_2O yang menyebabkan terjadinya pemutusan ikatan enzim dengan substrat dan terbentuklah monomer gula pereduksi.



Gambar 4.2 Kurva aktivitas pektinase dengan penambahan variasi konsentrasi Mg²⁺

Pada penelitian ini penambahan konsentrasi 2 mM (konsentrasi dalam sampel 0,2 mM), Mg²⁺ mempunyai jumlah yang sama dengan jumlah elektron bebas yang mampu diikat pada reaksi enzimatik pektinase dengan pektin, sehingga aktivitas yang dihasilkan merupakan aktivitas tertinggi.

Pada konsentrasi Mg²⁺ dalam sampel 0,6; 0,8 dan 1 mM Mg²⁺ mengalami penurunan aktivitas pektinase. Hal ini dikarenakan Mg²⁺ tidak lagi mendorong pasangan elektron bebas pada reaksi enzimatik pektinase dengan pektin akan tetapi mengikat sisi selain sisi aktif pektinase sehingga konformasi enzim berubah, tidak sesuai dengan substrat dan akibatnya aktivitas pektinase semakin menurun.

Selanjutnya dilakukan uji statistika dengan RAL untuk mengetahui pengaruh penambahan Mg²⁺ terhadap aktivitas pektinase. Dari data yang telah didapatkan menunjukkan bahwa penambahan Mg²⁺ berpengaruh terhadap aktivitas pektinase, hal ini ditunjukkan dengan F hitung >F tabel (data lengkap lampiran E.1) sedangkan untuk uji BNT 1% menunjukkan bahwa pada konsentrasi sampel 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mM mempunyai pengaruh yang nyata terhadap aktivitas pektinase

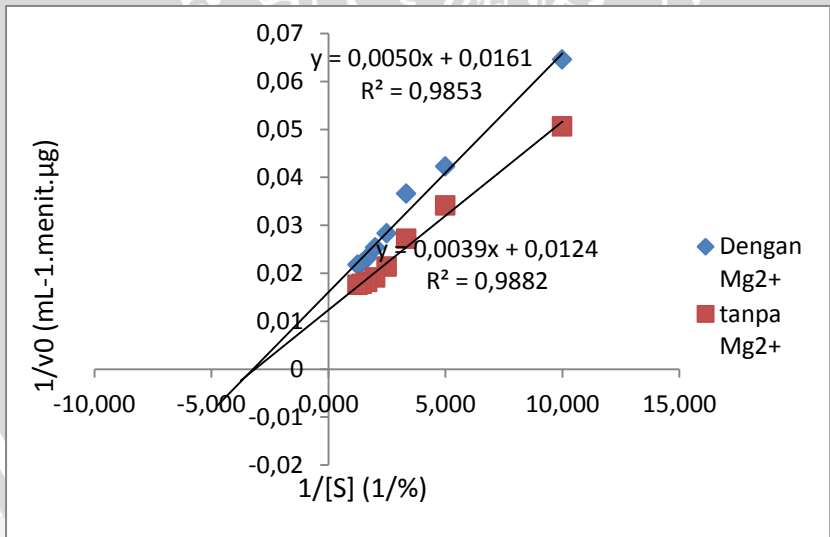
4.4. Penentuan nilai parameter kinetika reaksi enzimatis

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi substrat. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas ekstrak kasar pektinase dilakukan dengan memvariasi konsentrasi substrat sebesar 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 % yang direaksikan pada kondisi optimum.

Harga K_M dan V_{maks} dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk pada persamaan 4.1 [30]:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (4.1)$$

Berdasarkan kurva hubungan antara $1/V_0$ dengan $1/[S]$ dijelaskan pada Gambar 4.3 untuk kurva hubungan antara $1/v_0$ dengan $1/[S]$ tanpa penambahan Mg^{2+} diperoleh intersep 0,0124 dan slope 0,0039 sehingga diperoleh harga V_{maks} sebesar 80,64 U/mL dan nilai K_M sebesar 0,31%. Sedangkan untuk kurva hubungan antara $1/v_0$ dengan $1/[S]$ dengan penambahan Mg^{2+} diperoleh intersep 0,0161 dan slope 0,0050 diperoleh nilai V_{maks} sebesar 62,112 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai K_M sebesar 0,31%, sehingga didapatkan nilai K_I sebesar 2,684



Gambar 4.3 Kurva hubungan $1/V_0$ dengan $1/[S]$

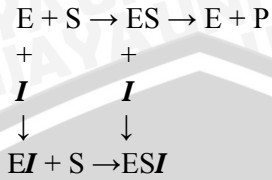
Selain konsentrasi substrat, enzim juga dipengaruhi oleh adanya zat lain berupa aktivator maupun inhibitor. Penambahan ion Mg^{2+} pada konsentrasi 6, 8 dan 10 mM menyebabkan aktivitas enzim menurun sehingga perlu diketahui jenis inhibisi tersebut, selain itu juga untuk mengetahui konstanta inhibisinya (K_I).

Konstanta inhibisi (K_I) merupakan konstanta yang menunjukkan kesetimbangan disosiasi kompleks enzim inhibitor (EI). Jika nilai K_I besar, maka enzim tersebut memiliki afinitas yang rendah terhadap inhibitor sehingga kompleks enzim-inhibisi tidak stabil dan cenderung terurai menjadi enzim dan inhibitor, sebaliknya jika nilai K_I kecil, maka enzim tersebut memiliki afinitas yang besar terhadap inhibitor sehingga inhibitor akan terikat kuat pada enzim yang mengakibatkan konformasi enzim berubah, tidak sesuai dengan konformasi substrat sehingga menghambat terbentuknya kompleks enzim-substrat yang akan digunakan untuk membentuk gula pereduksi yaitu asam galakturonat.

Hasil perhitungan V_{maks} dan K_M apabila dibandingkan keduanya memiliki nilai K_M yang sama, berbeda dengan nilai V_{maks} pektinase tanpa penambahan Mg^{2+} lebih besar dibanding dengan nilai V_{maks} dengan penambahan Mg^{2+} . Pada Gambar 4.3 dapat diketahui bahwa jenis inhibisi Mg^{2+} adalah inhibisi non kompetitif.

Pada Gambar 4.4 dijelaskan bahwa pada reaksi enzimatik untuk inhibitor non-kompetitif, inhibitor akan menyerang enzim sehingga akan membentuk kompleks enzim inhibitor (EI), selain itu inhibitor juga dapat menyerang kompleks enzim substrat (ES) sehingga membentuk kompleks enzim substrat inhibitor (ESI).

Sebagai inhibitor non kompetitif (Mg^{2+}) selain terikat pada enzim bebas (EI) dapat juga terikat pada saat enzim berikatan dengan substrat sehingga membentuk enzim substrat inhibitor (ESI). Dalam hal ini baik kompleks enzim-inhibitor maupun kompleks enzim substrat inhibitor bersifat tidak aktif, karena inhibitor tidak dapat dilawan dengan penambahan konsentrasi substrat, sehingga pembentukan asam galakturonat ini menjadi lambat dan kecepatan reaksi (V_{maks}) berubah. Akan tetapi dikarenakan substrat masih mengikat enzim maka nilai K_M tetap.



Gambar 4.4 Skema reaksi enzimatik untuk inhibitor non-kompetitif

Nilai K_M dan V_{maks} pektinase dari *Bacillus firmus* ini berbeda dengan nilai K_M dan V_{maks} dari *Penicillium chrysogenum* pada penelitian Banu [10] yang memiliki nilai V_{maks} lebih besar yaitu 85 U/mL dan nilai K_M 0,1%



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa penambahan Mg^{2+} dapat mempengaruhi aktivitas pektinase. Pada penambahan konsentrasi 2 dan 4 mM Mg^{2+} aktivitas pektinase meningkat, hal ini berarti Mg^{2+} bertindak sebagai aktivator, akan tetapi pada penambahan konsentrasi Mg^{2+} 6 mM aktivitas mulai menurun, sehingga Mg^{2+} bertindak sebagai inhibitor.

Nilai K_M dan K_{Mapp} sama yaitu 0,31% akan tetapi nilai V_{maks} dari keduanya berbeda yaitu 80,645 U/mL dan 62,112 U/mL. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa jenis inhibisi antar pektinase dengan Mg^{2+} adalah inhibisi non-kompetitif dan nilai konstanta inhibisi (K_I) dalam penelitian ini adalah 2,684

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian dan hasil yang didapatkan, maka pada penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan mikroba jenis lain yang dapat menghasilkan aktivitas pektinase yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Dharani dan Aiyer, 2004, **Effect Of C:N Ratio on Alpha Amylase Production By *Bacillus licheniformis* SPT 27**, African Journal of Biotechnology Vol. 3 (10), pp.519-522
- [2] Rahayu Sri, 2004, **Karakteristik Biokimiawi Enzim Termostabil Penghidrolisis Kitin**, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [3] Widyawati, E., 1990, **Mempelajari Sifat-sifat Pektinase *Aspergillus niger* L51 yang ditumbuhkan pada Fermentasi Padat**, FTP Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [4] L. Parenicova, J. A. E. Benen, H. C. M. Kester, dan J. Visser, 2000, **Studies on polygalacturonase of certain yeasts**, Biochemical Journal, vol. 259, pp. 577–585.
- [5] Dali, S., Abd., Rauf P., M. Noor J., dan Pirman AP., 2009, **Pengaruh Substrat dan Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim Lipase dari *Aspergillus oryzae* pada Kopro Berjamur**, Majalah Farmasi dan Farmakologi Vol. 13, No. 3
- [6] Roosdiana A., Arie S., Chanif M., Sasangka P., 2009, **Diseminasi Teknologi Industri Pertanian Berbasis Kelapa dan Susu Sapi**, Laporan Penelitian, Universitas Brawijaya
- [7] Yonalia, H., 1988, **Penjernihan Sari Buah Pisang (*Musa paradisiaca*) dengan Menggunakan Enzim Pektinase (Pektin Metil Esterase)**, FTP Institut Pertanian Bogor, Bogor
- [8] Surahman, D. N., 2004, **Kajian Analisa Kandungan Vitamin dan Mineral Pada Buah-buahan Tropis dan Sayuran di Toyama Prefecture Japan**, Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang

- [9] Adejuwon, A. O., dan P. O. Olutiola, 2007, **Pectin Lyase Activity in Culture of *Penicillium species***, Journal of Plant Sciences 2 (3): 347-352 ISSN 1816-4951
- [10] Banu, A. R., M. K. Devi, G. R. Gnanaprabhal, B. V. Pradeep, dan M. Palaniswamy, 2010, **Production and Characterization of Pectinase Enzyme from *Penicillium chrysogenum***, Indian Journal of Science and Technology, Vol. 3 No. 4
- [11] Hart, H., Craine, L.E, and Hart, D.J. (2003). **Kimia Organik**. Penerjemah: Achmadi S.S., Edisi Kesebelas. Jakarta. Penerbit Erlangga. Hal. 511
- [12] Jayani, R. S., S. Saxena, dan R. Gupta, 2005, **Microbial Pectinolytic Enzymes: A Review**, Process Biochemistry 40 2931-2944
- [13] Sharma, B. R., Naresh L., N. C. Dhuldhoya, S. U. Merchant, dan U. C. Merchant, 2006, **An Overview on Pectins**, Times Food Processing Journal, June-July Issue, Page no. 44-51, India.
- [14] Berry S. H., Yusuf Ahda, 2009, **Pengolahan Limbah Kulit Pisang Menjadi Pektin dengan Metode Ekstraksi**, Universitas Diponegoro, Semarang.
- [15] Haetami, K., Abun, dan Yuniar Mulyani, 2008, **Studi Pembuatan Probiotik (*Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger*, dan *Sacharomices cereviseae*) Sebagai Feed Supplement serta Implikasinya terhadap Pertumbuhan Ikan Nila Merah**, Laporan Penelitian, Hal 7-8
- [16] Fardiaz.. 2003, **Microbiologi Pangan**, PAU Pangan dan Gizi, IPB Bogor, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

- [17] Poedjiadi, A., 1994, **Dasar-dasar Biokimia**, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta
- [18] Winarno, F.G., 2002, **Enzim Pangan**, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- [19] Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., dan Rodwell, V.W., 2003 **Harper's Biochemistry 25th ed.** Appleton and Lange, America
- [20] Lehninger, L.A., 1997, **Dasar-dasar Biokimia**, Jil.1, Alih Bahasa: Maggy Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta
- [21] Pedrolli, B.P., Monteiro, AC., Gomes, E., dan Carmona, EC., 2009, **Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes**, The Open Biotechnology Journal. Vol.3, hal.2.
- [22] Kumar Joshi, V., Parmar, M., dan Rana, S., 2006, **Pectin Esterase Production from Apple Pomace in Solid-State and Submerged Fermentations**, *Food Technol. Biotechnol.* 44(2) 253-256.
- [23] Odeniyi, O. A., A. A. Onilude, dan M. A. Ayodele, 2009, **Production Characteristic and Properties of Cellulase/Polygalacturonase by *Bacillus coagulans* Strain from a Fermenting Palm-Fruit Industrial Residue**, African Journal of Microbiology Research Vol. 3(8) pp. 407-417
- [24] Muchtadi, S., Nurleni dan Made, 1992, **Enzim dalam Industri Pangan**, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [25] Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., dan Rodwell, V.W., 2003 **Harper's Biochemistry 25th ed.** Appleton and Lange, America.

- [26] Rahman, A., 1992, **Teknologi Fermentasi Industrial Produksi Metabolit Primer**, Arcan, Jakarta.
- [27] Judoamidjojo, R.M., Darwis, A.A., dan Sa'id E.G, 1992, **Teknologi Fermentasi**, Rajawali Press, Jakarta
- [28] Nicole, M., Roy, M., Daniel, and Helen, H.P., 1995, **The Effect of Low Temperatures on Enzyme Activity**, Biochem. Journal. 305: 17-20
- [29] Chaplin, M., 2008, **Enzymes and Enzyme Technology**, www.1sbu.ac.uk/biology/enzyme/practical1.html, tanggal akses 08 Maret 2012
- [30] Segel, I.H., 1975, **Biochemical Calculation**, 2nd ed, John Wiley and Sons, New York
- [31] Lehninger, L. A., 1982, **Dasar-dasar Biokimia**, Erlangga, Jakarta
- [32] Rashad, M.M., dkk, 2010, **Purification and Characterization of Extraceluler Polygalacturonase from Pleurotus Ostreatus Using Citrus Limonium Waste**. Journal of Applied Sciences Research, 6 (1),81-88
- [32] Asmodiwati, A.S., 2011. **Pengaruh Pengembangan Pada Kestabilan Aktivitas Enzim Amilase dari *Bacillus firmus***, *Skripsi*, FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang.
- [33] Santen, Y. V., Jacques A. E. B., Klaus-Hasso, Kor, Sylvie, Jaap, dan Bauke, 1999. **1.68-Å Crystal Structure of Endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and Identification of Activ Site Residues by Site-directed Mutagenesis**, The Journal of Biological Chemistry.

Lampiran A.

Preparasi Larutan

A.1 Air Bebas Reduktor

Akuades ditambah dengan KMnO_4 hingga larutan berwarna merah ($\pm 4-5$ tetes), kemudian didestilasi sehingga diperoleh air bebas reduktor.

A.2 Reagen DNS

Sebanyak 1 gram NaOH ; 18,2 gram Na-K Tartarat ; 0,2 gram fenol dan 0,5 gram Na_2SO_3 dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam beaker glass 100 mL. Ditambahkan 1 gram asam dinitrosalisilat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan magnetik stirer. Setelah larut, dipindahkan dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas.

A.3 Larutan Stok Glukosa 5000 ppm

Ditimbang 5 g glukosa anhidrat kemudian dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia, kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas.

A.4 Larutan Baku Gula Pereduksi

Larutan baku glukosa 5000 ppm dipipet masing-masing 1, 2, 3, 4 dan 5 mL dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas, sehingga larutan glukosa yang diperoleh adalah 500, 1000, 1500, 2000 dan 2500 ppm

A.5 Larutan Asam sitrat 0,1 M

Larutan asam sitrat 0,1 M dibuat dalam 100 mL (BM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 = 210,14$ g/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned} \text{mol } \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 &= [\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,01 \text{ mol} \\ \text{Massa } \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 &= \text{mol } \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{BM } \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 210,14 \text{ g/mol} \\ &= 2,1014 \text{ g} \end{aligned}$$

Jadi, $C_6H_8O_7$ yang harus ditimbang untuk membuat larutan $C_6H_8O_7$ 0,1 M adalah 2,1014 gram.

A.6 Larutan $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0,2 M

Larutan Na_2HPO_4 0,2 M dibuat dalam 100 mL (BM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O = 178$ g/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned} \text{Mol } Na_2HPO_4 &= [Na_2HPO_4] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa } Na_2HPO_4 &= \text{mol } Na_2HPO_4 \times \text{BM } Na_2HPO_4 \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 178 \text{ g/mol} \\ &= 3,56 \text{ g} \end{aligned}$$

Jadi, Na_2HPO_4 yang harus ditimbang untuk membuat larutan Na_2HPO_4 0,2 M adalah 3,56 gram.

A.7 Larutan Baku Na-sitrat

Larutan Na-sitrat 0,1 M dibuat dalam 100 mL (BM Na-sitrat = 275,9 g/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned} \text{Mol Na-sitrat} &= [Na-sitrat] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,01 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa Na-sitrat} &= \text{mol Na-sitrat} \times \text{BM Na-sitrat} \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 275,9 \text{ g/mol} \\ &= 2,759 \text{ g} \end{aligned}$$

Jadi, Na-sitrat yang harus ditimbang untuk membuat larutan Na-sitrat 0,1 M adalah 2,759 gram.

A.8 Substrat pektin

Ditimbang *citrus pectin* masing-masing 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 dan 0,8 gram kemudian dilarutkan dengan akuades secukupnya ke dalam gelas kimia, masing-masing larutan pektin tersebut dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan larutan buffer sitrat-fosfat pH 7 sebanyak 10 ml, selanjutnya ditanda bataskan dengan akuades, sehingga diperoleh substrat pektin 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,7% dan 0,8%

A.9 Larutan Mg^{2+} 0,1 M

Larutan Mg^{2+} 0,1 M dibuat dalam 100 mL (BM $MgCl_2 \cdot 6H_2O = 203,31$ g/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned} \text{Mol } MgCl_2 &= [MgCl_2] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,01 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa } MgCl_2 &= \text{mol } MgCl_2 \times \text{BM } MgCl_2 \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 203,31 \text{ g/mol} \\ &= 2,03331 \text{ g} \end{aligned}$$

Jadi, $MgCl_2$ yang harus ditimbang untuk membuat larutan $MgCl_2$ 0,1 M adalah 2,03331 gram.

A.10 Larutan Mg^{2+} 2, 4, 6, 8, dan 10 mM dari larutan stok $MgCl_2$ 0,1 M

Untuk membuat variasi konsentrasi larutan Mg^{2+} menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

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

$$V_1 \times 0,1 \text{ M} = 100 \text{ mL} \times 2 \cdot 10^{-3} \text{ M} \quad (2 \text{ mM})$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

$$V_1 \times 0,1 \text{ M} = 100 \text{ mL} \times 4 \cdot 10^{-3} \text{ M} \quad (4 \text{ mM})$$

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

$$V_1 \times 0,1 \text{ M} = 100 \text{ mL} \times 6 \cdot 10^{-3} \text{ M} \quad (6 \text{ mM})$$

$$V_1 = 6 \text{ mL}$$

$$V_1 \times 0,1 \text{ M} = 100 \text{ mL} \times 8 \cdot 10^{-3} \text{ M} \quad (8 \text{ mM})$$

$$V_1 = 8 \text{ mL}$$

$$V_1 \times 0,1 \text{ M} = 100 \text{ mL} \times 10 \cdot 10^{-3} \text{ M} \quad (10 \text{ mM})$$

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

A.11 Buffer Sitrat fosfat pH 7

Larutan buffer sitrat fosfat dengan suatu pH tertentu dapat dibuat dengan cara mencampurkan larutan asam sitrat dengan larutan Natrium fosfat menggunakan persamaan rumus sebagai berikut :

$$pH = pKa - \log \frac{[\text{asam}]}{[\text{garam}]}$$

Sebagai contoh, untuk membuat larutan buffer sitrat fosfat pH 7, maka 50 mL larutan asam sitrat ditambah dengan 6,3 mL larutan Na-fosfat dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\begin{aligned}
 \text{pH} &= 6,40 - \log \frac{(50,0\text{mL} \times 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})}{(v \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})} \\
 7 &= 6,40 - \log \frac{5}{0,2v} \\
 0,6 &= \log \frac{5}{0,2v} \\
 3,98 &= \frac{5}{0,2v} \\
 0,2v &= 1,26 \\
 v &= 6,3 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

A.12 Buffer sitrat pH 6

Larutan buffer sitrat dengan suatu pH tertentu dapat dibuat dengan cara mencampurkan larutan asam sitrat dengan larutan Natrium sitrat 0,1 M menggunakan persamaan rumus sebagai berikut :

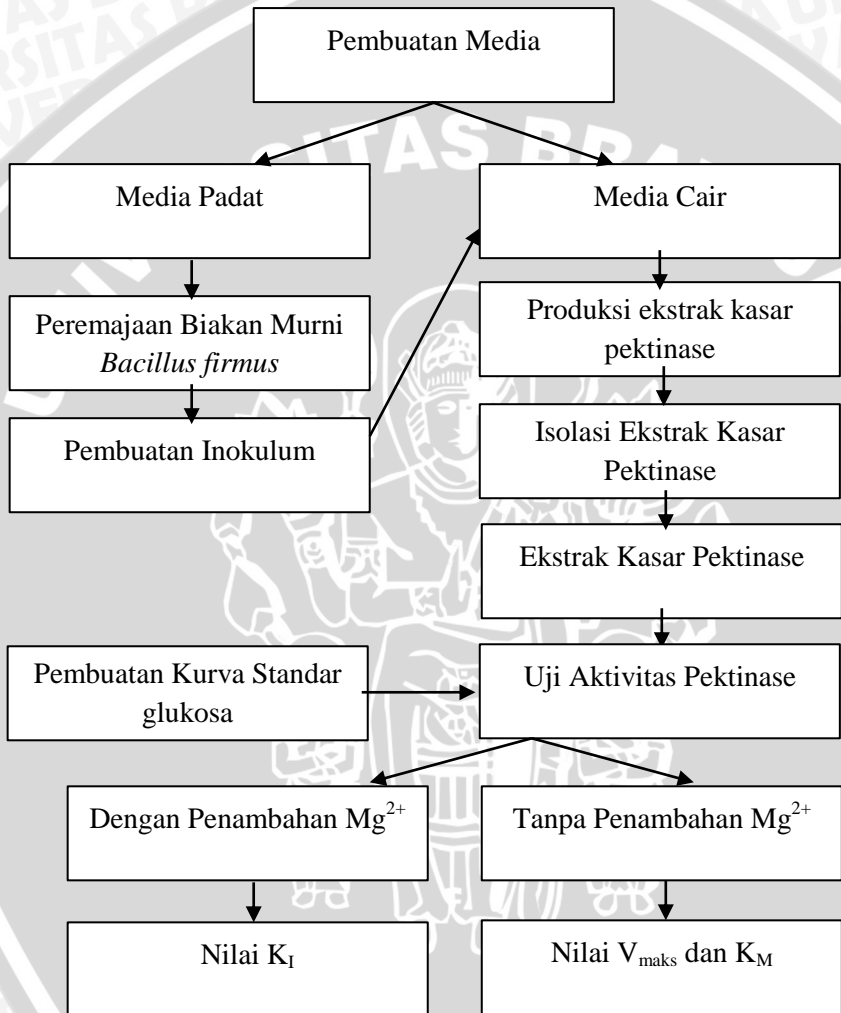
$$\text{pH} = \text{pKa} - \log \frac{[\text{asam}]}{[\text{garam}]}$$

Sebagai contoh, untuk membuat larutan buffer sitrat pH 6, maka 50 mL larutan asam sitrat ditambah dengan 19,92 mL larutan Natrium sitrat dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\begin{aligned}
 \text{pH} &= 6,4 - \log \frac{(50,0\text{mL} \times 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})}{(v \text{ mL} \times 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})} \\
 6 &= 6,4 - \log \frac{50}{v} \\
 0,4 &= \log \frac{50}{v} \\
 2,51 &= \frac{50}{v} \\
 v &= 19,92 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Lampiran B

Diagram Alir Tahapan Penelitian



Lampiran C.

Perhitungan

C.1 Perhitungan V_{maks} , K_M , dan K_I

Nilai V_{maks} , K_M , dan K_I ditentukan dari persamaan garis pada kurva hubungan antara $1/[S]$ dan $1/V_0$.

a. Tanpa menggunakan ion Mg^{2+}

$$y = 0,0039x + 0,0124$$

$$\frac{1}{V_{maks}} = 0,0124$$

$$V_{maks} = 80,645 \text{ U/mL}$$

$$\frac{K_M}{V_{maks}} = \frac{K_M}{80,64} = 0,0039$$

$$K_M = 0,31 \%$$

b. Menggunakan ion Mg^{2+}

$$y = 0,0050x + 0,0161$$

$$\frac{1}{V_{maks}} = 0,0161$$

$$V_{mapp} = 62,112 \text{ U/mL}$$

$$\frac{K_M}{V_{maks}} = \frac{K_M}{62,112} = 0,0050$$

$$K_{M \text{ app}} = 0,31 \%$$

C.2 Penentuan konstanta inhibisi

Membandingkan persamaan Lineweaver-Burk tanpa dan menggunakan Mg^{2+} :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{(1 + \frac{[I]}{K_I}) \cdot K_M}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{(1 + \frac{[I]}{K_I})}{V_{maks}}$$

$$\frac{1}{V_{mapp}} = \frac{1}{V_{maks}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

$$0,0161 \text{ U/mL} = 0,0124 \text{ U/mL} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

$$1,298 \text{ U/mL} = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$0,298 = \frac{[0,8mM]}{K_I}$$

$$K_I = 2,684$$



Lampiran D

Data Penelitian

D.1 Pengukuran Aktivitas Pektinase

Aktivitas pektinase merupakan banyaknya gula pereduksi (μg) yang diperoleh oleh 1 mL pektinase dalam waktu 1 menit.

Pengukuran aktivitas pektinase dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$AE = [\text{Gula pereduksi}] \times \frac{V \cdot fp}{p \cdot q}$$

dimana :
AE = aktivitas enzim ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$)
V = volume total sampel tiap tabung (ml)
fp = faktor pengenceran
p = volume ekstrak kasar enzim (ml)
q = waktu reaksi (menit)

Contoh perhitungan:

Data rata-rata absorbansi pektinase pada $\lambda = 540 \text{ nm}$ adalah 0,6237 Sedangkan persamaan regresi linier pada kurva standart gula pereduksi adalah $y = 0,0037x$, sehingga dari persamaan tersebut dapat ditentukan konsentrasi gula pereduksi:

$$\begin{aligned} Y &= 0,0037x \\ 0,6237 &= 0,0037x \\ x &= \frac{0,6237}{0,0037} \\ &= 168,576 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

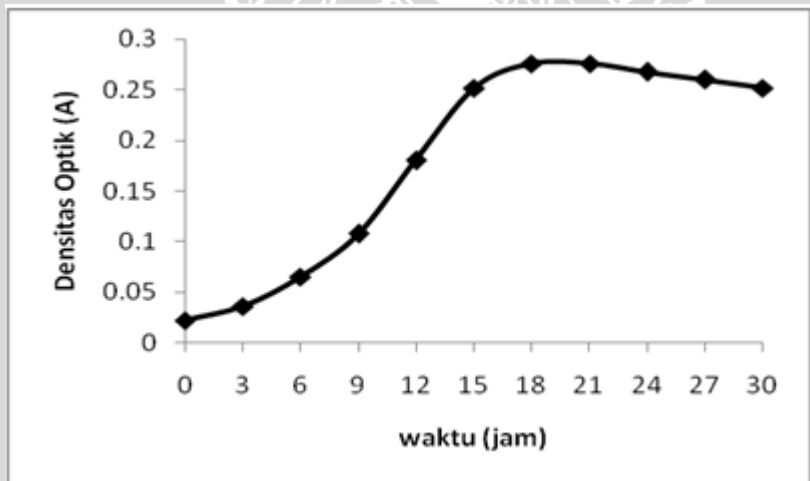
Dengan demikian dapat ditentukan aktivitas pektinase:

$$\begin{aligned} AE &= [\text{Gula pereduksi}] \times \frac{V \cdot fp}{p \cdot q} \\ &= 168,576 \mu\text{g/mL} \times \frac{10 \text{ mL} \times 1}{1 \text{ mL} \times 30 \text{ menit}} \\ &= 56,192 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

D.2 Pembuatan kurva Pertumbuhan *Bacillus firmus*

D.2.1 Data Absorbansi kurva Pertumbuhan *Bacillus firmus*

Waktu (Jam)	Absorbansi			A _{rata-rata}
	A ₁	A ₂	A ₃	
0	0,022	0.022	0.022	0.022
3	0,031	0.045	0.031	0.036
6	0,064	0.060	0.071	0.065
9	0,102	0.113	0.107	0.107
12	0,180	0.108	0.108	0.180
15	0,251	0.244	0.259	0.251
18	0,283	0.267	0.283	0.275
21	0,275	0.275	0.275	0.275
24	0,267	0.267	0.267	0.267
27	0,283	0.244	0.251	0.259
30	0,259	0.244	0.251	0.251

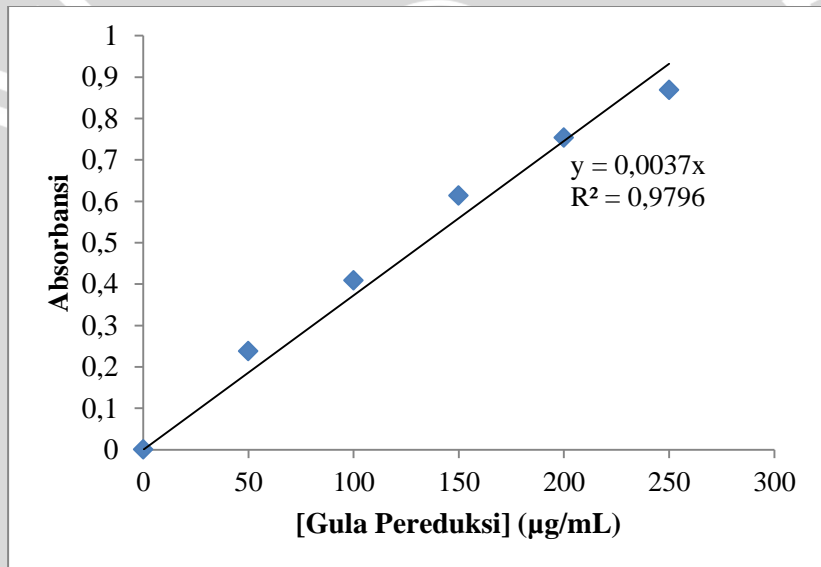


Gambar D.2.1 Kurva Pertumbuhan *Bacillus firmus*

D.3 Pembuatan kurva baku gula pereduksi

D.3.1 Data absorbansi gula pereduksi

Konsentrasi Glukosa ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			
	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{rata-rata}}$
50	0,2375	0,2376	0,2374	0,2375
100	0,4086	0,4084	0,4084	0,4085
150	0,6136	0,6135	0,6134	0,6135
200	0,7536	0,7537	0,7537	0,7537
250	0,8684	0,8683	0,8682	0,8683



Gambar D.3.1 Kurva Standar gula pereduksi

D.4 Aktivitas Pektinase

D.4.1 Data absorbansi aktivitas pektinase pada $\lambda = 540 \text{ nm}$

Fraksi Enzim	Absorbansi			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{rata-rata}
Ekstrak Kasar	0,6238	0,6237	0,6237	0,6237

D.4.2 Data aktivitas Pektinase

Fraksi enzim	A _{rata-rata}	Konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas enzim (U/mL)
Ekstrak kasar	0,6237	168,576	56,192

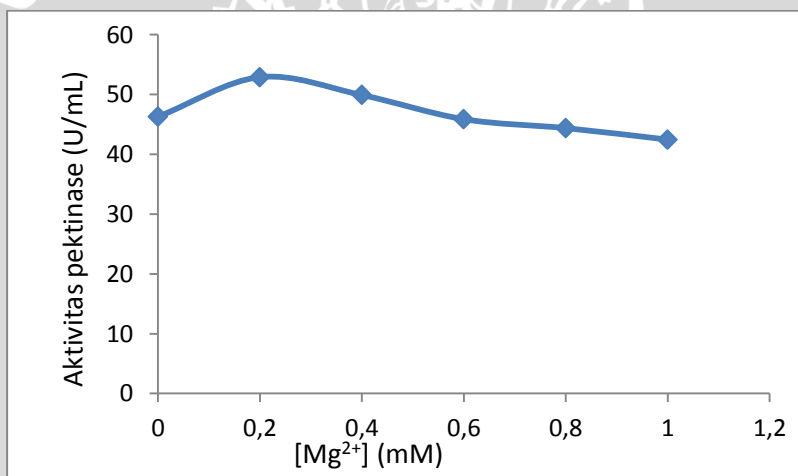
D.5 Aktivitas Pektinase dengan Variasi Konsentrasi Mg^{2+}

D.5.1 Data absorbansi pektinase Dengan Variasi Konsentrasi Mg^{2+}

konsentrasi Mg^{2+} (mM)	Absorbansi			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{rata-rata}
0	0,5138	0,5140	0,5139	0,5139
0,2	0,5873	0,5871	0,5873	0,5872
0,4	0,5541	0,5540	0,5539	0,5540
0,6	0,5093	0,5090	0,5092	0,5092
0,8	0,4928	0,4925	0,4925	0,4926
1	0,4715	0,4712	0,4712	0,4713

D.5.2 Data Aktivitas Pektinase dengan variasi konsentrasi Mg^{2+}

konsentrasi Mg^{2+} (mM)	Absorbansi	Konsentrasi Gula Pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas Pektinase (U/mL)
0	0,5139	138,8919	46,297
0,2	0,5872	158,7117	52,904
0,4	0,5540	149,7297	49,910
0,6	0,5092	137,6126	45,871
0,8	0,4926	133,1351	44,378
1	0,4713	127,3784	42,459



Gambar D.5.2 Kurva aktivitas pektinase dengan penambahan variasi konsentrasi Mg^{2+}

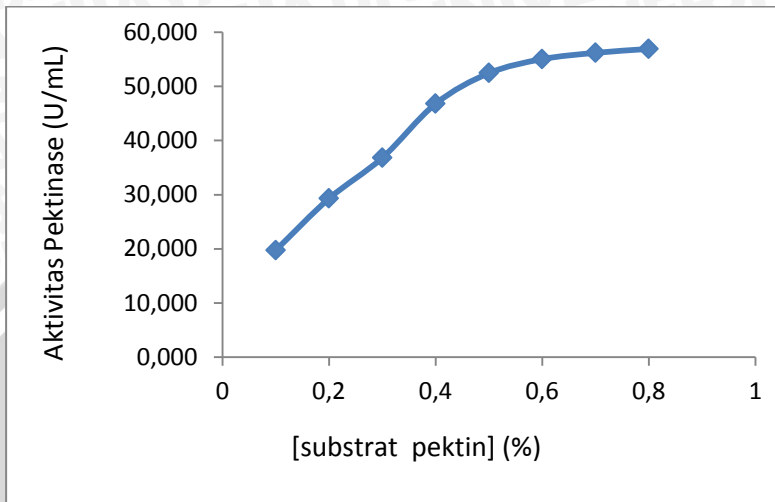
D.6 Pengukuran konstanta kinetika V_{maks} , K_M , dan K_I

D.6.1 Data absorbansi pektinase dengan variasi konsentrasi substrat (tanpa Mg^{2+}) pada $\lambda = 540 \text{ nm}$

konsentrasi pektinase % (b/v)	Absorbansi			
	A_1	A_2	A_3	$A_{rata-rata}$
0,1	0,2194	0,2192	0,2191	0,2192
0,2	0,3250	0,3253	0,3251	0,3251
0,3	0,4088	0,4087	0,4085	0,4087
0,4	0,5195	0,5193	0,5192	0,5193
0,5	0,5821	0,5823	0,5819	0,5821
0,6	0,611	0,6107	0,6108	0,6108
0,7	0,6238	0,6237	0,6237	0,6237
0,8	0,6319	0,6317	0,6318	0,6318

D.6.2 Data aktivitas pektinase dengan variasi konsentrasi substrat (tanpa Mg^{2+}) pada $\lambda=540 \text{ nm}$

Konsentrasi Pektin % (b/v)	Absorbansi	Konsentrasi gula pereduksi	Aktivitas Pektinase (U/mL)
0,1	0,2192	59,2522	19,751
0,2	0,3251	87,8738	29,291
0,3	0,4087	110,4505	36,817
0,4	0,5193	140,3604	46,787
0,5	0,5821	157,3243	52,441
0,6	0,6108	165,0901	55,030
0,7	0,6237	168,5766	56,192
0,8	0,6318	170,7568	56,919



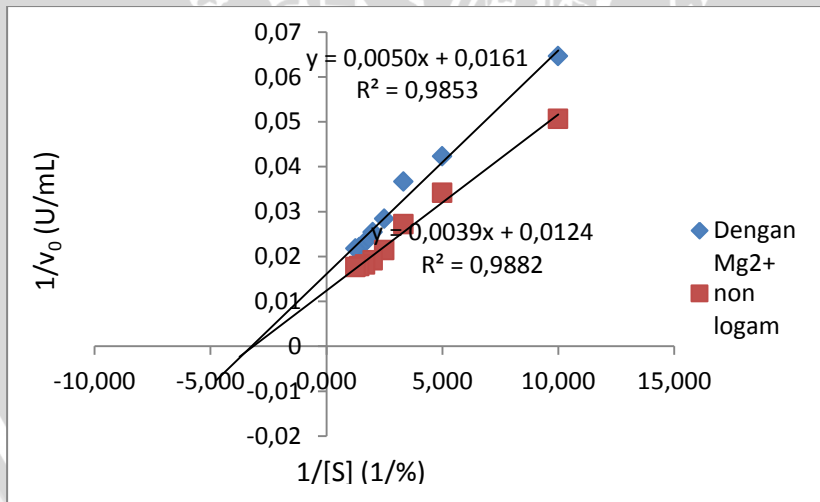
Gambar D.6.2 Kurva Michaelis-Menten

D.6.3 Data absorbansi pektinase dengan variasi konsentrasi substrat (dengan Mg^{2+}) pada $\lambda = 540 \text{ nm}$

konsentrasi pektinase %(b/v)	Absorbansi			
	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{rata-rata}}$
0,1	0,1718	0,1719	0,1718	0,1718
0,2	0,2627	0,2629	0,2626	0,2627
0,3	0,3031	0,3032	0,3031	0,3031
0,4	0,3918	0,3917	0,3917	0,3917
0,5	0,4373	0,4373	0,4371	0,4372
0,6	0,4787	0,4786	0,4784	0,4786
0,7	0,5041	0,5039	0,5041	0,5040
0,8	0,5102	0,5104	0,5104	0,5103

D.6.4 Data aktivitas pektinase dengan variasi konsentrasi substrat (dengan Mg^{2+} 0,8 mM) pada $\lambda = 540$ nm

Konsentrasi Pektin % (b/v)	Absorbansi	Konsentrasi gula pereduksi	Aktivitas Pektinase (U/ml)
0,1	0,1718	46,4414	15,480
0,2	0,2627	71,0090	23,670
0,3	0,3031	81,9279	27,309
0,4	0,3917	105,8738	35,291
0,5	0,4372	118,1711	39,390
0,6	0,4786	129,3423	43,114
0,7	0,5040	136,2252	45,408
0,8	0,5103	137,9279	45,976



Gambar D.6.4 Kurva hubungan $1/V_0$ dan $1/[S]$ Pektinase

Lampiran E

Uji statistika

E.1 Aktivitas Pektinase dengan Penambahan Mg^{2+}

Data aktivitas pektinase dengan penambahan variasi konsentrasi Mg^{2+} dianalisis menggunakan pola rancangan acak lengkap:

Konsentrasi Mg^{2+} (mM)	Aktivitas Enzim (U/mL)			Jumlah	Rataan
	1	2	3		
0	46,2883	46,3063	46,2973	138,8919	46,2973± 0,0090
0,2	52,9099	52,8919	52,9099	158,7117	52,9039± 0,0104
0,4	49,9189	49,9099	49,9009	149,7297	49,9099± 0,0090
0,6	45,8829	45,8559	45,8739	137,6126	45,8709± 0,0138
0,8	44,3964	44,3694	44,3694	133,1351	44,3784± 0,0156
1	42,4775	42,4505	42,4505	127,3784	42,4595± 0,0156

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh penambahan Mg^{2+} terhadap aktivitas pektinase, maka dilakukan analisis menggunakan uji F dengan cara sebagai berikut:

E.1.1 Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}]^2}{np} = \frac{(845,4595)^2}{3 \times 6} = 39711,205$$

E.1.2 Menghitung jumlah kuadrat (JK)

a. JK total = $[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2] - FK$
= 39928,936 - 39711,205

$$= 217,73103$$

$$\begin{aligned} \text{b. JK}_{\text{perlakuan}} (\text{JK}_p) &= \frac{[\sum_{i=1}^p (\sum_{j=1}^n Y_{ij})^2]}{n_1} - \text{FK} \\ &= 39928,935 - 39711,205 \\ &= 217,72913 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. JK}_{\text{galat percobaan}} (\text{JK}_G) &= \text{JK}_{\text{total}} - \text{JK}_{\text{perlakuan}} \\ &= 217,73103 - 217,72913 \\ &= 0,001893 \end{aligned}$$

E.1.3 Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber keragaman

$$\begin{aligned} \text{a. Kuadrat Tengah}_{\text{perlakuan}} (\text{KT}_p) &= \frac{\text{JK}_p}{\text{db}_{\text{perlakuan}}} \\ &= \frac{217,72913}{5} \\ &= 43,545 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. Kuadrat Tengah}_{\text{galat percobaan}} (\text{KT}_G) &= \frac{\text{JK}_{GP}}{\text{db}_{\text{percobaan}}} \\ &= \frac{0,001894}{12} \\ &= 0,000158 \end{aligned}$$

E.1.4 Menghitung nilai F

$$\begin{aligned} F_{\text{hitung}} &= \frac{\text{KT}_p}{\text{KT}_G} \\ &= \frac{43,5483}{0,000158} = 275928,8 \end{aligned}$$

$$F_{\text{Tabel 1\%}} = F(0,01;5;12) = 5,0643$$

Karena $F_{hitung} > F_{tabel 1\%}$ maka H_0 ditolak, yang artinya Mg^{2+} berpengaruh nyata terhadap aktivitas pektinase. Untuk mengetahui variasi konsentrasi mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas pektinase, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,01$

E.2 Menghitung nilai BNT dengan $\alpha = 1\%$

$$BNT(\alpha) = t_{dbsg}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KTgalat}{n}}$$

$$BNT(0,01) = t_{16}^{0,01} \sqrt{\frac{2 \times 0,000158}{3}}$$

$$= t_{16}^{0,01} \cdot 0,0102572$$

$$= 3,055 \times 0,0102572$$

$$= 0,03133$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari ketujuh variasi ion Mg^{2+} yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar.

E.2.1 Analisa ragam satu arah pengaruh ion Mg^{2+} terhadap aktivitas pektinase

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel 1%}
Perlakuan	5	217,7291	43,54583	275928,8	5,0643431
Galat Percobaan	12	0,001894	0,000158		
Total	17	217,731	12,80771		

E.2.2 Data uji BNT pengaruh Mg²⁺ Terhadap Aktivitas Pektinase

Ion Mg ²⁺	ion Mg ²⁺	1	0,8	0,6	0	0,4	0,2	Notasi
	Rata-rata	42,459 4	44,378 4	45,870 8	46,297 3	49,909 9	52,903 9	
1	42,4594	0						a
0,8	44,3784	1,9189	0					ab
0,6	45,8708	3,4114 1	1,4925	0				bc
0	46,2973	3,8378	1,9189	0,4264	0			cd
0,4	49,9099	7,4504	5,5315	4,0390	3,6126	0		de
0,2	52,9039	10,444	8,5255	7,0330	6,6066	2,9939	0	ef

Keterangan : ab; bc; cd; de; ef = beda nyata