

**Pengaruh Penambahan K<sup>+</sup> terhadap Aktivitas Pektinase  
Hasil Isolasi dari *Bacillus firmus***

**SKRIPSI**

oleh  
**FITRIA RAHMA DEWI**  
**0810923049**



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

**2012**

**Pengaruh Penambahan K<sup>+</sup> terhadap Aktivitas Pektinase  
Hasil Isolasi dari *Bacillus firmus***

**SKRIPSI**

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

oleh

**FITRIA RAHMA DEWI**

**0810923049**



**JURUSAN KIMIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2012**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Penambahan K<sup>+</sup> terhadap Aktivitas Pektinase Hasil  
Isolasi dari *Bacillus firmus*

oleh:

FITRIA RAHMA DEWI

0810923049

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

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam Bidang Kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra.Anna Roosdiana, M. App.Sc Dr.Sasangka Prasetyawan, M.S

NIP. 19680226 199203 2 002

NIP. 19630404 198701 1 001

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS

NIP. 19630404 198701 1 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Fitria Rahma Dewi

NIM : 0810923049

Jurusan : Kimia

penulis Skripsi berjudul:

“Pengaruh Penambahan K<sup>+</sup> terhadap Aktivitas Pektinase Hasil Isolasi dari *Bacillus firmus*”

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi Skripsi yang saya buat benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka Skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi 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

(Fitria Rahma Dewi)

NIM. 0810923049

# **Pengaruh K<sup>+</sup> terhadap Aktivitas Pektinase Hasil Isolasi dari *Bacillus firmus***

## **ABSTRAK**

Pektinase adalah enzim ekstraseluler yang menghidrolisis pektin menjadi asam galakturonat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan K<sup>+</sup> terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim pektinase yang diisolasi dari *Bacillus firmus* serta menentukan parameter kinetiknya yang meliputi V<sub>m</sub>, K<sub>M</sub>, dan K<sub>I</sub>. Pengaruh K<sup>+</sup> terhadap ekstrak kasar enzim pektinase ditentukan dengan membandingkan aktivitas pektinase tanpa penambahan K<sup>+</sup> dan aktivitas pektinase dengan penambahan K<sup>+</sup> pada konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mM. Pengukuran aktivitas pektinase ditentukan berdasarkan jumlah gula pereduksi secara spektrofotometri dengan menggunakan reagen DNS (dinitrosalisilat) pada  $\lambda = 540$  nm. Aktivitas pektinase tersebut dikondisikan pada pH 7, waktu inkubasi 30 menit, temperatur inkubasi 50 °C, dan variasi substrat pektin 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; dan 0,8 % (b/v). Dari penelitian ini dihasilkan aktivitas ekstrak kasar pektinase sebesar 56,192  $\mu\text{g.ml}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ . Nilai parameter kinetika K<sub>M</sub> tanpa penambahan K<sup>+</sup> dan dengan penambahan K<sup>+</sup> (K<sub>Mapp</sub>) menunjukkan hasil yang sama yaitu sebesar 0,32% sedangkan nilai V<sub>m</sub> dan V<sub>m app</sub> berbeda yaitu 80,645  $\mu\text{g.ml}^{-1}.\text{menit}^{-1}$  dan 40,984  $\mu\text{g.ml}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ . Berdasarkan nilai K<sub>M</sub> = K<sub>Mapp</sub> dan nilai V<sub>m</sub> > V<sub>m app</sub> maka dengan penambahan K<sup>+</sup> sebesar 2, 4, 6, 8, dan 10 mM, K<sup>+</sup> bertindak sebagai inhibitor dengan jenis inhibisi non kompetitif dengan nilai K<sub>I</sub> sebesar 6,25.

*Kata kunci : K<sup>+</sup>, aktivitas pektinase, *Bacillus firmus**

# **Effect of K<sup>+</sup> to Activity of Pectinase Enzyme Isolated from**

## ***Bacillus firmus***

### **ABSTRACT**

Pectinase is enzyme that hydrolyzes pectin to galacturonic acid. This research aimed to find out the effect of K<sup>+</sup> addition to activity of crude pectinase enzyme isolated from *Bacillus firmus* and to determine kinetic parameter V<sub>m</sub>, K<sub>M</sub>, and K<sub>I</sub>. The effect of K<sup>+</sup> to crude pectinase enzyme activity was determined by comparing pectinase activity without and with K<sup>+</sup> 2, 4, 6, 8, and 10 mM addition. Enzyme activity measurement was determined according to amount of reducing sugar by spectrophotometric using dinitrosalicylic (DNS) reagent at =540 nm. That pectinase activity was conditioned at pH 7, incubation time 30 minutes, incubation temperature 50 °C, and pectin substrate variation 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; and 0,8 % (m/v). This research resulted crude pectinase enzyme activity 56,192 µg.ml<sup>-1</sup>.minute<sup>-1</sup>. Value of both K<sub>M</sub> and K<sub>Mapp</sub> were 0,32% whereas the V<sub>m</sub> and V<sub>m app</sub> respectively 80,645 µg.ml<sup>-1</sup>.minute<sup>-1</sup> and 40,984 µg.ml<sup>-1</sup>.minute<sup>-1</sup>. According to value of K<sub>M</sub> = K<sub>Mapp</sub> and V<sub>m</sub> > V<sub>m app</sub> then addition of K<sup>+</sup> at 2, 4, 6, 8, dan 10 mM to pectinase were showed that K<sup>+</sup> acted as non competitive inhibitor yielding in K<sub>I</sub> 6,25.

*Keyword : K<sup>+</sup>, pectinase activity, *Bacillus firmus**

## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena atas segala limpahan rahmat, karunia dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Pengaruh Penambahan K<sup>+</sup> terhadap Aktivitas Pektinase Hasil Isolasi dari *Bacillus firmus*”**. Penyusunan naskah skripsi ini merupakan salah satu persyaratan dalam memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dra. Anna Roosdiana, M. App, Sc selaku dosen pembimbing I atas ilmu, bimbingan, dan pengarahan yang diberikan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS selaku dosen pembimbing II atas ilmu, bimbingan, dan pengarahan yang diberikan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
3. Drs. Suratmo, MS. selaku dosen Penasehat Akademik yang telah memberikan nasehat dan bimbingan kepada penulis selama menempuh studi di Jurusan Kimia Universitas Brawijaya.
4. Dr. H. Sasangka Prasetyawan, MS. selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, staf pengajar, dan semua karyawan Jurusan Kimia atas semua bantuan yang diberikan.
5. Dosen Penguji, atas segala masukan dan saran yang diberikan kepada penulis untuk perbaikan naskah tugas akhir.
6. Kedua orang tua dan keluarga penulis yang selalu memberikan doa, semangat, kasih sayang, dan dukungan hingga terselesaikannya skripsi ini.
7. Semua rekan – rekan di Jurusan Kimia, terutama angkatan 2008 yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis selama penyusunan naskah tugas akhir ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang sangat membangun. Semoga naskah skripsi ini dapat memberikan sumbangan yang bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan

Malang, Juli 2012  
Penulis

## DAFTAR ISI

Halaman

<b>HALAMAN JUDUL.....</b>	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	iii
<b>ABSTRAK.....</b>	iv
<b>ABSTRACT .....</b>	v
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	vi
<b>DAFTAR ISI.....</b>	vii
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	ix
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	xi
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	4
2.1 Pektin.....	4
2.2 <i>Bacillus firmus</i> .....	5
2.3 Enzim Pektinase .....	6
2.4 Pengukuran Aktivitas Enzim Pektinase.....	7
2.5 Kinetika Reaksi Enzimatis.....	8
2.6 Inhibitor .....	10
2.7 Logam K .....	14
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	15
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 Prosedur Kerja .....	16

3.5.1 Pembuatan Media Padat .....	16
3.5.2 Peremajaan Bacillus firmus .....	17
3.5.3 Pembuatan Media Cair .....	17
3.5.4 Pembuatan Inokulum .....	17
3.5.5 Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Pektinase dari Bacillus firmus .....	17
3.5.6 Pembuatan Kurva Standar Glukosa .....	18
3.5.7 Pengukuran Aktivitas Pektinase .....	18
3.5.8 Uji Aktivitas Pektinase dengan Penambahan Variasi Konsentrasi $K^+$ .....	19
3.5.9 Penentuan $V_m$ , $K_M$ , dan $K_I$ .....	19
 <b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	21
4.1 Penentuan Aktivitas Pektinase .....	21
4.2 Pengaruh Penambahan $K^+$ terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Pektinase .....	22
4.3 Penentuan Nilai Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis .....	24
 <b>BAB V PENUTUP</b> .....	26
5.1 Kesimpulan .....	26
5.2 Saran .....	26
 <b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	27
<b>LAMPIRAN</b> .....	31

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
<b>Gambar 2.1</b> Struktur Pektin .....	4
<b>Gambar 2.2</b> Mekanisme reaksi DNS dan Glukosa.....	8
<b>Gambar 2.3</b> Grafik Hubungan Konsentrasi Substrat terhadap Kecepatan Reaksi Enzim.....	9
<b>Gambar 2.4</b> Mekanisme reaksi inhibisi kompetitif .....	10
<b>Gambar 2.5</b> Grafik inhibisi kompetitif.....	11
<b>Gambar 2.6</b> Mekanisme reaksi inhibisi tak kompetitif .....	11
<b>Gambar 2.7</b> Grafik inhibisi tak kompetitif .....	12
<b>Gambar 2.8</b> Mekanisme reaksi inhibisi campuran .....	12
<b>Gambar 2.9</b> Grafik inhibisi campuran.....	13
<b>Gambar 4.1</b> Mekanisme reaksi pektinase dan pektin.....	21
<b>Gambar 4.2</b> Kurva aktivitas pektinase terhadap penambahan $K^+$ .....	23
<b>Gambar 4.3</b> Mekanisme reaksi inhibisi non kompetitif .....	23
<b>Gambar 4.4</b> Kurva Lineweaver-Burk.....	24
<b>Gambar D.1</b> Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus firmus</i> .....	39
<b>Gambar D.2</b> Kurva Standar Glukosa .....	40
<b>Gambar D.3</b> Kurva aktivitas pektinase pada variasi konsentrasi $K^+$ .....	42
<b>Gambar D.4</b> Kurva Lineweaver-Burk.....	46

## DAFTAR TABEL

Halaman

<b>Tabel D.1</b>	Data Pertumbuhan <i>Bacillus firmus</i> .....	39
<b>Tabel D.2</b>	Data Absorbansi Glukosa pada $\lambda = 540$ nm.....	40
<b>Tabel D.3.1</b>	Data Absorbansi Aktivitas Pektinase pada $\lambda = 540$ nm.....	41
<b>Tabel D.3.2</b>	Data Aktivitas Pektinase .....	41
<b>Tabel D.4</b>	Data Absorbansi Pektinase dengan Variasi Konsentrasi $K^+$ .....	42
<b>Tabel D.5.1</b>	Data absorbansi pektinase dengan variasi konsen- trasi substrat (tanpa $K^+$ ) pada $\lambda = 540$ nm.....	43
<b>Tabel D.5.2</b>	Data aktivitas pektinase dengan variasi konsen- trasi substrat (tanpa $K^+$ ) pada $\lambda = 540$ nm.....	43
<b>Tabel D.5.3</b>	Data absorbansi pektinase dengan variasi konsen- trasi substrat (dengan $K^+$ ) pada $\lambda = 540$ nm .....	44
<b>Tabel D.5.4</b>	Data aktivitas pektinase dengan variasi konsen- trasi substrat (dengan $K^+$ ) pada $\lambda = 540$ nm .....	45
<b>Tabel E.1</b>	Data statistika aktivitas ekstrak kasar pektinase dengan penambahan variasi konsentrasi $K^+$ .....	47
<b>Tabel E.2</b>	Analisis ragam satu arah pengaruh $K^+$ terhadap aktivitas pektinase .....	49
<b>Tabel E.3</b>	Data uji BNT pengaruh ion $K^+$ terhadap aktivitas pektinase .....	49

## DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

<b>Lampiran A. Diagram Alir Penelitian.....</b>	31
<b>Lampiran B. Preparasi Larutan .....</b>	32
B.1 Pembuatan Reagen DNS .....	32
B.2 Pembuatan Air Bebas Reduktor .....	32
B.3 Pembuatan Larutan Stok Glukosa 5000 ppm .....	32
B.4 Pembuatan Larutan Baku Glukosa .....	32
B.5 Pembuatan Larutan Asam sitrat 0,1 M .....	32
B.6 Pembuatan larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M .....	33
B.7 Pembuatan Larutan Natrium Sitrat .....	33
B.8 Pembuatan Larutan Substrat Pektin.....	33
B.9 Pembuatan Larutan $\text{K}^+$ dari $\text{KCl}$ .....	33
B.10 Buffer Sitrat fosfat pH 7 .....	34
B.11 Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 6.....	35
<b>Lampiran C. Perhitungan .....</b>	36
C.1 Aktivitas Pektinase .....	36
C.2 Nilai $V_m$ , $K_M$ , dan $K_I$ .....	37
<b>Lampiran D. Data Hasil Penelitian.....</b>	39
D.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus firmus</i> .....	39
D.2 Pembuatan Kurva Baku Glukosa .....	39
D.3 Aktivitas Pektinase .....	41
D.4 Aktivitas Pektinase dengan Penambahan $\text{K}^+$ .....	42
D.5 Penentuan Konstanta Kinetika $V_m$ , $K_M$ , dan $K_I$ .....	43
<b>Lampiran E. Analisis Statistika .....</b>	45
E.1 Aktivitas Pektinase dengan Penambahan $\text{K}^+$ .....	47
E.2 Analisis Statistika Perhitungan BNT 5% .....	47

## BAB I

# PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan protein yang memiliki fungsi sebagai biokatalisator dalam sistem biologis. Dalam proses katalisis tersebut enzim mengubah senyawa yang disebut substrat menjadi bentuk suatu senyawa baru yang disebut produk [1]. Berbeda dari katalis kimia lainnya, enzim bersifat spesifik terhadap substrat yang dikatalisis. Enzim dapat diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Namun dari ketiga sumber enzim tersebut, isolasi enzim dari mikroorganisme lebih banyak dilakukan dibandingkan dari tumbuhan dan hewan karena tidak memerlukan waktu yang lama untuk menghasilkannya [2]. Salah satu enzim yang telah banyak dimanfaatkan dalam bidang industri adalah pektinase. Enzim ini mampu memecah ikatan glikosidik senyawa pektin menjadi asam galakturonat sehingga disebut juga enzim pektinolitik [3]. Enzim ini termasuk golongan hidrolase karena reaksi yang dikatalisis adalah reaksi hidrolisis [4].

Pektinase dapat diproduksi dari berbagai jenis mikroorganisme seperti bakteri, jamur dan kapang misalnya *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Pseudomonas spp* [5], *Penicillium canescens* dan *Aspergillus niger* [6]. Dari penelitian Roosdiana dkk [7], salah satu spesies dari *Bacillus* yaitu *Bacillus firmus* hasil isolasi dari susu sapi menunjukkan aktivitas pektinase akan tetapi kondisi optimum produksi dan karakteristiknya belum diteliti lebih lanjut. Pektinase telah dimanfaatkan secara luas. Sejak tahun 1940, pektinase telah digunakan untuk berbagai aplikasi industri, khususnya digunakan untuk meningkatkan efisiensi filtrasi pada jus buah hingga 50%, pada industri pulp, serta digunakan untuk maserasi dan ekstraksi jaringan pada sayuran [3]. Kandungan pektin sebesar 0,5 - 4% dari massa buah mentah akan meningkatkan viskositas dari jus buah karena struktur pektin yang seperti serat sehingga jus buah yang dihasilkan keruh. Oleh karena itu pektinase diperlukan untuk mendegradasi pektin sehingga jus buah yang dihasilkan memiliki viskositas yang rendah serta meningkatkan efisiensi filtrasi jus buah[8].

Aktivitas pektinase dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, waktu inkubasi, dan temperatur [4]. Selain itu keberadaan ion logam juga mempengaruhi kerja enzim pada sisi aktif katalitiknya sehingga dapat berperan sebagai aktivator atau inhibitor [9]. Adanya ion logam tersebut juga dapat menjadi salah satu hal yang mempengaruhi aktivitas pektinase pada proses filtrasi jus buah. Dari penelitian Adejuwon [10], keberadaan ion logam alkali seperti  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ , dan  $Mg^{2+}$  pada konsentrasi 0-30 mM meningkatkan aktivitas pektinase yang diisolasi dari *Penicillium* sp. Sedangkan pada penelitian lain menunjukkan bahwa penambahan ion logam alkali yaitu  $K^+$  dengan konsentrasi 1 M menurunkan aktivitas pektinase yang diproduksi oleh *Aspergillus flavus* [28]. Kalium pada dasarnya merupakan salah satu logam yang terkandung dalam buah-buahan pada jumlah yang cukup besar. Sebagai contoh buah apel, jeruk, stroberi, dan anggur memiliki kandungan kalium 144, 177, 147, dan 180 mg tiap 100 g berat buah [29]. Dari informasi kandungan kalium dalam buah serta pengaruh  $K^+$  pada pektinase yang diisolasi dari berbagai mikroorganisme maka dilakukan penelitian ini untuk mengetahui seberapa besar pengaruh  $K^+$  terhadap aktivitas pektinase hasil isolasi dari *Bacillus firmus* pada variasi konsentrasi  $K^+$  sebesar 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 mM.

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas,dapat dirumuskan masalah yang akan dibahas yaitu:

1. Bagaimana pengaruh penambahan konsentrasi  $K^+$  terhadap aktivitas pektinase hasil isolasi dari *Bacillus firmus*?
2. Berapa nilai parameter kinetika ( $V_m$ , $K_M$ ,dan  $K_I$ ) dari pektinase hasil isolasi dari *Bacillus firmus* ?

## 1.3 Batasan Masalah

1. Bakteri yang digunakan untuk memproduksi pektinase adalah bakteri *Bacillus firmus* hasil isolasi dari susu sapi daerah Blitar
2. Enzim yang digunakan adalah ekstrak kasar pektinase
3. Konsentrasi KCl sebagai  $K^+$  yang digunakan adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 mM
4. Variasi konsentrasi substrat pektin yang digunakan adalah 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; dan 0,8 % (b/v)

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

1. Mempelajari pengaruh penambahan  $K^+$  terhadap aktivitas ekstrak kasar pektinase hasil isolasi dari *Bacillus firmus*
2. Menentukan nilai konstanta kinetika reaksi yang meliputi  $V_m$ ,  $K_M$ , dan  $K_I$  pada ekstrak kasar pektinase dari *Bacillus firmus*

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh  $K^+$  terhadap aktivitas pektinase hasil isolasi dari *Bacillus firmus*, nilai konstanta kinetika, serta jenis inhibisi yang terjadi pada reaksi enzimatis tersebut sehingga dapat diaplikasikan untuk meningkatkan efisiensi filtrasi jus buah.

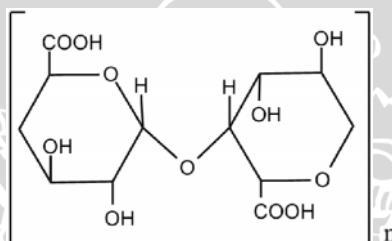


## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Pektin

Pektin merupakan kompleks polisakarida yang mengandung asam galakturonat yang dihubungkan oleh ikatan -(1,4) glikosidik. Pektin terdapat dalam dinding sel tumbuhan dan merupakan komponen dari lapisan ekstraseluler tipis yang terbentuk diantara dinding yang berdekatan dengan sel muda[11]. Pektin memiliki struktur seperti serat yang halus dan terkandung dalam buah-buahan dengan persentase 0,5-4 % dari massa buah mentah. Struktur pektin ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur pektin

Dari Gambar 2.1, struktur pektin memiliki rantai polisakarida linier yang tersusun atas asam galakturonat yang dihubungkan dengan ikatan -(1,4)-glikosidik[12].

#### 2.2 *Bacillus firmus*

*Bacillus firmus* merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang dengan panjang antara 1,5  $\mu\text{m}$  sampai 3  $\mu\text{m}$  dan lebar antara 0,6  $\mu\text{m}$  sampai 0,8  $\mu\text{m}$ . Spora bakteri ini berbentuk batang silindris atau elips dan terdapat pada sentral atau parasentral [13]. Sejak diketahui mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim ekstraseluler (protease, amilase, selulase, lipase, pektinase, dan xilanase) yang aktif dan stabil pada pH tinggi, *Bacillus* mempunyai peran penting di dunia industri [14]. Umumnya genus *Bacillus*

ditemukan dalam tanah dan beberapa dari jenis bakteri ini mempunyai aktivitas proteolitik, yaitu kemampuan untuk mendisintegasi protein [15]. Adapun klasifikasi dari *Bacillus firmus* adalah sebagai berikut [16] :

Kingdom	:	Bacteria
Divisi	:	Firmicutes
Klas	:	Bacilli
Ordo	:	Bacillales
Famili	:	Bacillaceae
Genus	:	Bacillus
Spesies	:	Firmus

### 2.3 Enzim Pektinase

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalisator(katalis dalam sistem biologis)[1]. Tidak seperti katalis kimia biasa,enzim memiliki kelebihan yaitu bersifat spesifik dan selektif terhadap substrat tertentu dalam mengkatalisasi reaksi biokimia tersebut [17]. Mekanisme reaksi katalisasi enzim dengan substrat dapat diterangkan dalam dua model yaitu model *Lock and Key* dan *Induced Fit*. Model *Lock and Key* menjelaskan bahwa reaksi antara enzim dengan substratnya terjadi karena adanya kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan sisi aktif enzim. Sedangkan model *Induced Fit* menjelaskan reaksi antara enzim dengan substranya yang berlangsung karena adanya induksi oleh substrat terhadap enzim sedemikian rupa sehingga struktur enzim menjadi sesuai dengan substrat [18]. Reaksi enzim-substrat ditunjukkan pada persamaan 2.1 [19]



keterangan:  
E = enzim  
S = substrat  
ES = kompleks enzim substrat  
P = produk

Pembentukan senyawa ES dari E dan S berlangsung dengan konstanta kecepatan  $k_1$ . Kemudian kompleks ES mengalami kesetimbangan reaksi saat enzim telah jenuh oleh substrat sehingga tetap dalam bentuk E dan S dengan konstanta kecepatan  $k_1$  sedangkan yang telah berikatan membentuk kompleks ES akan menghasilkan produk P dan E dengan konstanta kecepatan  $k_2$ , dengan asumsi tidak ada P yang dapat diubah lagi menjadi S [20]

Pektinase merupakan enzim yang mampu memecah senyawa pektin menjadi asam galakturonat sehingga disebut juga enzim pektinolitik [3]. Enzim ini termasuk golongan hidrolase karena reaksi yang dikatalisis adalah reaksi hidrolisis[4]. Enzim ini diproduksi dalam jumlah besar oleh beberapa mikroorganisme seperti bakteri, jamur dan kapang seperti *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Pseudomonas spp.* [5], *Penicillium canescens* dan *Aspergillus niger* [6]. Seperti enzim pada umumnya, aktivitas pektinase juga dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti:

### 1. Temperatur

Enzim memiliki kemampuan katalisasi yang berbeda pada kisaran temperatur tertentu[18] yang mempengaruhi energi kinetik reaksi antar molekulnya [21]. Enzim pektinase memiliki kisaran temperatur yang berbeda tergantung dari sumber mikroorganismenya. Seperti pektinase hasil isolasi dari *Bacillus cereus* memiliki temperatur optimum sekitar 37 °C[22], sedangkan yang diisolasi dari *Aspergillus niger* memiliki temperatur optimum 43 °C[23].

### 2. Waktu inkubasi

Waktu inkubasi merupakan waktu yang diperlukan enzim untuk berikatan dengan substrat[24]. Semakin lama waktu inkubasi maka semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat sehingga produk yang dihasilkan semakin banyak dan berhenti saat enzim telah jenuh oleh substrat[24].

### 3. pH

Perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap pembentukan kompleks enzim substrat karena pada kisaran pH tertentu enzim dapat bermuatan positif, negatif, atau juga bermuatan

ganda (membentuk zwitter ion) yaitu berupa molekul [24]. Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa pektinase yang diisolasi dari *Bacillus* sp KSM-P4 10[23] dan *Bacillus cereus* [22]memiliki pH optimum masing-masing pada pH 7,0 dan 8,5.

#### 4. Pengaruh inhibitor

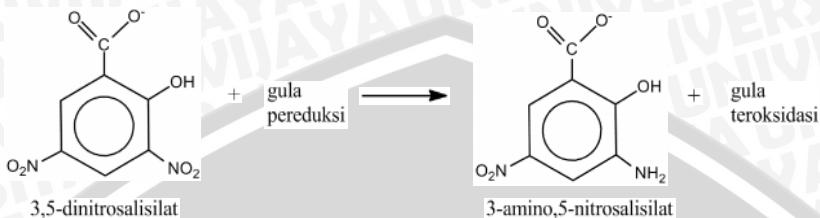
Adanya inhibisi atau hambatan pada reaksi penggabungan substrat pada sisi aktif enzim oleh suatu suatu molekul atau ion yang disebut inhibitor akan mempengaruhi efektivitas reaksi pembentukan kompleks enzim substrat [24]. Sebagai contoh  $Hg^{2+}$  mampu menurunkan aktivitas enzim pektin lyase dari *Penicillium* sp. Hingga 50% [10].

#### 5. Konsentrasi substrat

Penambahan konsentrasi substrat akan meningkatkan kecepatan reaksi pembentukan kompleks enzim substrat hingga batas konsentrasi tertentu sehingga tidak lagi berpengaruh terhadap laju reaksi tersebut karena enzim telah jenuh oleh substrat [24].

### 2.4 Pengukuran Aktivitas Enzim Pektinase

Aktivitas enzim secara umum didefinisikan sebagai jumlah produk yang dihasilkan tiap 1 ml enzim dalam waktu 1 menit. Aktivitas enzim pektinase dapat ditentukan dengan mengukur jumlah gula pereduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisis pektin secara spektrofotometri dengan menggunakan reagen DNS (asam dinitrosalisolat). Prinsip reaksinya adalah glukosa hasil hidrolisis enzim pektinase akan mereduksi asam dinitrosalisolat dan ditandai dengan terbentuknya kompleks warna merah kecoklatan dari asam 3-amino-5-nitrosalisolat yang akan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Mekanisme reaksi glukosa dengan reagen DNS ditunjukkan pada Gambar 2.2[26]:



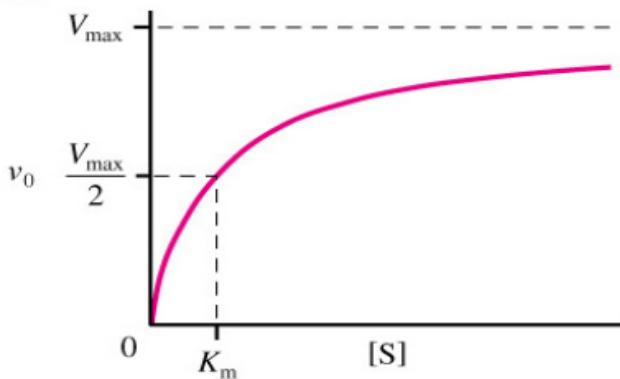
**Gambar 2.2** Mekanisme Reaksi DNS dan Gula Pereduksi

## 2.5 Kinetika Reaksi Enzimatis

Penentuan kinetika reaksi enzimatis dilakukan untuk mengetahui pola suatu reaksi yang melibatkan enzim sebagai biokatalisator. Kinetika enzimatis yang ditentukan meliputi parameter  $V_m$  dan  $K_M$ .  $V_m$  didefinisikan sebagai batas teoritis suatu laju reaksi yang tercapai saat kondisi konsentrasi substrat tinggi sehingga seluruh sisi aktif substrat telah berikatan dengan enzim atau merupakan kecepatan reaksi saat enzim telah jenuh oleh substrat. Sedangkan  $K_M$  merupakan konstanta Michaelis-Menten yang didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu saat enzim mencapai setengah  $V_m$  [25].

Michaelis-Menten menyatakan bahwa kecepatan awal reaksi yang dikatalisis enzim tergantung pada  $[S]$  (konsentrasi substrat) dan  $K_M$  dengan beberapa kondisi[25]:

1. Bila  $[S] < K_M$  maka kecepatan awal reaksi tergantung pada  $[S]$
  2. Bila  $[S] > K_M$  maka kecepatan awal reaksi sama dengan nilai  $V_m$
  3. Bila  $[S] = K_M$  maka kecepatan awal reaksi sama dengan setengah  $V_m$



**Gambar 2.3** Grafik Hubungan Konsentrasi Substrat Terhadap Kecepatan Reaksi Enzim

Gambar 2.3 menunjukkan bahwa pada kondisi  $V_m$  enzim telah jenuh oleh substrat ditandai dengan penambahan konsentrasi substrat yang pengaruhnya semakin kecil terhadap laju reaksi. Secara matematis hubungan ini dinyatakan dalam persamaan Michaelis-Menten (persamaan 2.2)

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

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

$V_{\text{maks}}$  = kecepatan maksimum

$K_M$  = tetapan Michaelis-Menten

Jika nilai  $V_0 = \frac{1}{2} V_{\text{maks}}$  maka nilai  $K_M = [S]$

Penentuan nilai  $K_M$  berdasarkan persamaan Michaelis-Menten dengan metode grafik sederhana tidak dapat secara tepat digunakan untuk menentukan  $V_{\text{maks}}$  karena hanya berupa dugaan dan tidak diketahui nilai sebenarnya. Oleh karena itu dengan memetakan data yang sama dengan cara yang berbeda, yaitu menggunakan persamaan Lineweaver-Burk(persamaan 2.3) yang merupakan kebalikan dari

persamaan Michaelis-Menten, nilai  $K_M$  dan  $V_{\text{maks}}$  dapat ditentukan [27] :

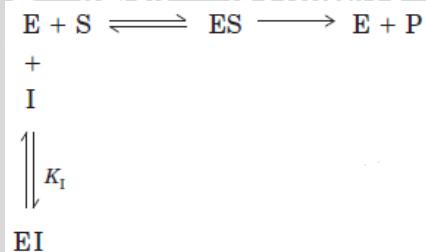
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (2.3)$$

## 2.6 Inhibitor

Inhibitor enzim merupakan molekul yang terlibat pada reaksi enzimatis dimana bersifat memperlambat atau menghentikan reaksi tersebut. Secara umum inhibitor diklasifikasikan menjadi dua jenis reaksi inhibisi yaitu inhibisi reversibel dan irreversibel. Pada inhibisi reversibel terdapat 3 tipe inhibisi yaitu inhibisi kompetitif,bukan kompetitif,dan tak kompetitif[19].

### 1. Inhibisi kompetitif

Jenis inhibisi ini terjadi dimana inhibitor berkompetisi dengan substrat untuk berikatan pada sisi aktif enzim sehingga akan terbentuk kompleks enzim-substrat(ES) dan kompleks enzim-inhibitor(EI). Mekanisme reksinya ditunjukkan pada Gambar 2.4 [19]:



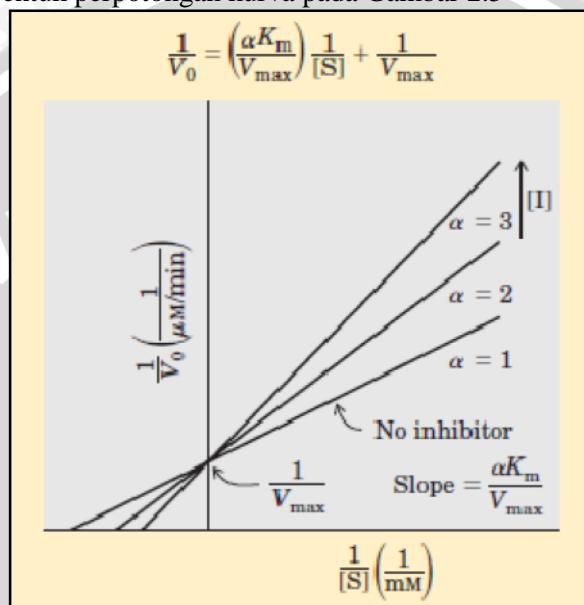
Gambar 2.4 Mekanisme reaksi inhibisi kompetitif

Persamaan Michaelis-Menten untuk jenis inhibisi ini adalah persamaan 2.4[19]:

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

$$\text{dimana } = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{dan } K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

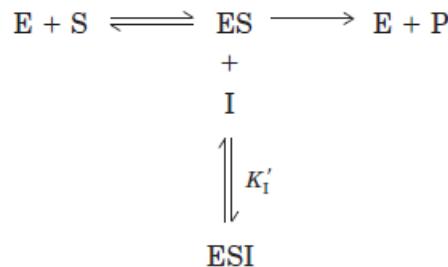
dengan bentuk perpotongan kurva pada Gambar 2.5



**Gambar 2.5** Grafik inhibisi kompetitif

## 2. Inhibisi tak kompetitif

Jenis inhibisi ini disebabkan adanya inhibitor yang berikatan dengan sisi selain sisi aktif substrat sehingga berikatan pada kompleks ES. Skema reaksinya ditunjukkan pada Gambar 2.6[19]:



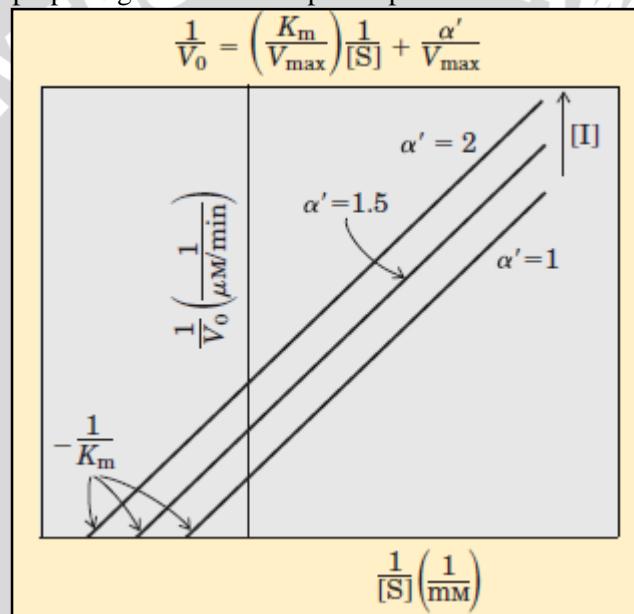
**Gambar 2.6** Mekanisme reaksi inhibisi tak kompetitif

Persamaan Michaelis-Menten untuk jenis inhibisi ini adalah[19]:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.5)$$

dengan  $\gamma = 1 + \frac{[I]}{K_i}$  dan  $K'_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$

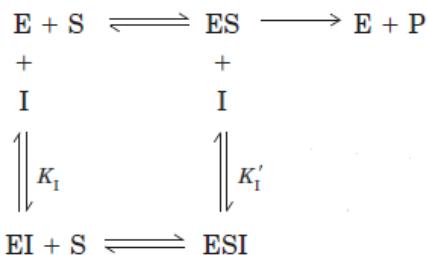
dimana perpotongan kurva ditampilkan pada Gambar 2.7:



Gambar 2.7 Grafik inhibisi tak kompetitif

### 3. Inhibisi campuran

Inhibisi campuran merupakan gabungan dari kedua inhibisi di atas dan hal ini mengakibatkan nilai  $K_M$  maupun  $V_m$  dari rekasi enzimatis berubah. Mekanisme reaksinya ditunjukkan pada 2.8 [19]:

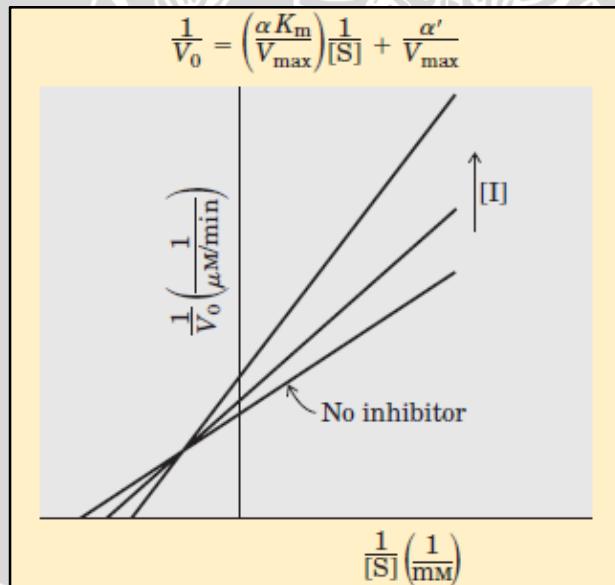


Gambar 2.8 Mekanisme reaksi inhibisi campuran

Persamaan Michaelis-Menten untuk jenis inhibisi ini ditunjukkan pada persamaan 2.9[19]:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.6)$$

dengan model kurva pada Gambar 2.9



Gambar 2.9 Grafik inhibisi campuran

## 2.7 Logam K

Kalium merupakan unsur dengan nomor atom 19 dan nomor massa 39,10 g/mol yang termasuk unsur golongan IA yang memiliki 1 elektron valensi. Di alam, kalium terdapat dalam bentuk garamnya yaitu KCl yang dalam penelitian Makky [28] diperoleh hasil bahwa KCl sebagai sumber garam pada media pertumbuhan menghambat pertumbuhan *Aspergillus flavus* serta produksi pektinase dari jamur tersebut pada konsentrasi 1M. Selain itu penelitian lain menunjukkan bahwa keberadaan ion logam alkali seperti  $K^+$  pada konsentrasi 0-30 mM mampu meningkatkan aktivitas pektinase yang diisolasi dari *Penicillium* sp[10]. Kalium juga terkandung dalam buah-buahan maupun sayuran, pada beberapa buah seperti apel, jeruk, stroberi, dan anggur memiliki kandungan kalium 144, 177, 147, dan 180 mg tiap 100 g berat buah [29]



## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

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

#### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

##### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah kultur bakteri *Bacillus firmus* yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya dan bahan-bahan kimia lain yaitu pektin, tepung agar, pepton, yeast extract, glukosa anhidrat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , KCl, reagen DNS,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dan akuades

##### 3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain erlenmeyer 250 ml, pipet tetes, pipet ukur 5ml dan 10 ml, pengaduk kaca, tabung reaksi, gelas arloji, labu ukur 10 mL, 50 mL, dan 100 mL, jarum ose, sentrifuge dingin (Joan MR 1889), magnetik stirer, inkubator (Heraeus Type B 5042), neraca analitik mettler (Bosch PE 620), pH meter (inolab WTW), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), kuvet, penangas air (Memmert W 200), autoklaf (All American Model 20x), shaker (Edmund Buhler SM 252413).

#### 3.3 Rancangan Penelitian

Dilakukan pembiakan *Bacillus firmus* menggunakan media padat agar miring selama 72 jam kemudian dilanjutkan dengan pembuatan inokulum pada media cair selama setengah fasa log. Selanjutnya dilakukan produksi enzim pektinase selama satu fasa log dan isolasi ekstrak kasar pektinase. Kemudian dilakukan uji aktivitas ekstrak kasar pektinase tersebut melalui kadar gula

pereduksinya dengan dan tanpa penambahan variasi konsentrasi ion logam K<sup>+</sup> secara spektrofotometri menggunakan reagen DNS,serta ditentukan konstanta kinetika enzimatis dari aktivitas tersebut. Dari data yang diperoleh dilakukan analisis statistika dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) 5%.

### 3.4 Tahapan Penelitian

1. Pembuatan media padat
2. Peremajaan bakteri *Bacillus firmus*
3. Pembuatan media cair
4. Pembuatan inokulum
5. Isolasi ekstrak kasar pektinase
6. Pembuatan kurva standar glukosa
7. Pengukuran aktivitas ekstrak kasar pektinase
  - Uji aktivitas pektinase pada variasi konsentrasi substrat
  - Uji aktivitas pektinase dengan penambahan variasi konsentrasi ion K<sup>+</sup>
  - Penentuan konstanta kinetika enzimatis ( $K_M$ ,  $V_m$ , dan  $K_I$ )
8. Analisis statistika data

### 3.5 Prosedur Kerja

#### 3.5.1 Pembuatan Media Padat

Media peremajaan kultur murni *Bacillus firmus* yang digunakan adalah media padat agar miring yang dibuat dengan menimbang 0,5 gram pektin, 0,25 gram pepton,0,02 gram KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0,03 g CaCl<sub>2</sub>,0,14 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,03 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g yeast extract lalu dimasukkan ke gelas kimia 250ml, ditambahkan 5 ml larutan buffer asetat pH 6,0 dan 1,5 gram bacto agar kemudian ditambahkan akuades hingga volume 100 mL. Setelah itu campuran dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk hingga menjadi larutan homogen. Kemudian setiap 4 ml larutan dimasukkan ke tabung reaksi dengan menggunakan gelas ukur lalu ditutup dengan kapas kemudian disterilkan dalam autoklav pada temperatur 121°C, tekanan 15 psi, selama 15 menit. Kemudian masing-masing tabung

reaksi dikeluarkan dari autoklav dan diletakkan pada posisi miring pada temperatur ruang dan dibiarkan mengeras.

### **3.5.2 Peremajaan *Bacillus firmus***

Bakteri *Bacillus firmus* dari biakan murninya digoreskan pada ujung jarum ose secara aseptik yaitu dengan mendekatkan mulut tabung pada nyala api saat menggoreskan jarum ose lalu bakteri diletakkan di atas media padat agar miring secara zig zag kemudian ditutup kembali dengan kapas steril dan diinkubasi pada temperatur 30°C selama 72 jam.

### **3.5.3 Pembuatan Media Cair**

Media pertumbuhan *Bacillus firmus* untuk menghasilkan enzim pektinase dibuat dengan menimbang 2,5 g pektin , 1,25 g pepton, 0,1 gram KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0,15 g CaCl<sub>2</sub>,0,7 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,15 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g yeast extract lalu dimasukkan ke gelas kimia 500ml dan ditambahkan 25 ml larutan buffer asetat pH 6, setelah itu ditambahkan akuades hingga volume 500 mL. Kemudian campuran diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Lalu dengan gelas ukur masing-masing diambil 100 mL dan dimasukkan ke 5 buah erlenmeyer 250 mL kemudian ditutup kapas dan disterilkan dalam autoklav pada temperatur 121°C, tekanan 15 psi, selama 20 menit. Setelah itu media cair didinginkan hingga temperatur ruang.

### **3.5.4 Pembuatan Inokulum**

Bakteri yang telah tumbuh dalam media padat miring selama 72 jam diambil sebanyak satu mata ose dan dimasukkan ke dalam 100 mL media cair secara aseptis. Selanjutnya diinkubasi pada temperatur kamar sambil dikocok dengan shaker pada kecepatan putar 125 rpm selama setengah fasa log (13 jam).

### **3.5.5 Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Pektinase dari *Bacillus firmus***

Sebanyak 10 ml inokulum dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi 100ml media cair steril secara aseptis

lalu diinkubasi pada temperatur kamar dan dikocok dengan shaker dengan kecepatan 125 rpm hingga akhir fase log(18 jam). Selanjutnya ditambahkan 10 ml buffer sitrat pH 6 dan disentrifugasi dingin dengan dengan kecepatan putar 3000 rpm selama 20 menit. Kemudian supernatant yang mengandung ekstrak kasar pektinase dipisahkan.

### 3.5.6 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Disiapkan 5 buah tabung reaksi, masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa standar dengan konsentrasi 500,1000,1500,2000, dan 2500 ppm. Kemudian masing-masing tabung ditambah 1 mL buffer sitrat fosfat pH 7, 2 mL reagen DNS, dan 3ml akuades. Kemudian mulut tabung ditutup dengan aluminium foil, dipanaskan dalam penangas air selama 5 menit lalu didinginkan hingga temperatur kamar,diencerkan hingga volume 10 ml pada labu takar 10 ml, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Selanjutnya dibuat kurva standar dari data konsentrasi glukosa (ppm) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

### 3.5.7 Pengukuran Aktivitas Pektinase

Penentuan aktivitas enzim pektinase dilakukan dengan membuat campuran yang terdiri dari 1 ml substrat pektin 0,7%,1 ml buffer sitrat pH 7,1 ml ekstrak kasar pektinase, dan 2 ml akuades dalam tabung reaksi. Kemudian campuran diinkubasi pada temperatur  $50^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan 2 ml reagen DNS, dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit lalu didinginkan hingga temperatur kamar kemudian diencerkan hingga volume 10 ml dengan labu ukur 10 ml. Kemudian diukur absorbansi gula pereduksi pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan cara nilai absorbansinya disubstitusi ke persamaan garis pada kurva standar gula pereduksi sehingga didapatkan konsentrasi glukosa. Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan unit yaitu banyaknya  $\mu\text{g}$  glukosa yang dihasilkan tiap 1 ml enzim tiap waktu satu menit. Untuk menghitung besarnya satu unit aktifitas enzim digunakan rumus:

$$AE = [Gula pereduksi](\mu\text{g/ml}) \times \frac{V \cdot fp}{p \cdot q}$$

dengan keterangan :

AE = Aktifitas enzim ( $\mu\text{g/ml} \cdot \text{menit}^{-1}$ )

V = volume total sampel dalam percobaan pada tiap tabung (ml)

q = Waktu reaksi (menit)

p = Volum ekstrak kasar pektinase (ml)

fp = Faktor pengenceran

### 3.5.8 Uji Aktivitas Pektinase dengan Penambahan Variasi $K^+$

Disiapkan 6 tabung reaksi dan masing-masing tabung diisi dengan 1ml ekstrak kasar pektinase, 1 ml buffer sitrat fosfat pH 7, 1 ml substrat pektin 0,7% (b/v), dan 1 ml air bebas reduktor. Kemudian pada tabung 1 ditambahkan 2 ml air bebas reduktor sedangkan masing-masing tabung(2-6) ditambahkan 1 ml KCl 2, 4, 6,8, dan 10 mM. Kemudian semua tabung diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Selanjutnya,ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan pada penangas air mendidih selama 15 menit. Selanjutnya didiamkan hingga larutan mencapai temperatur kamar dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas. Kemudian diukur absorbansi gula pereduksinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada pajang gelombang 540 nm.

### 3.5.9 Penentuan $V_m$ , $K_M$ , dan $K_I$

Untuk penentuan nilai  $V_m$  dan  $K_M$  dilakukan dengan menguji aktivitas pektinase dengan cara membuat variasi konsentrasi pektin 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; dan 0,8 % (b/v). Kemudian, dipipet 1 mL ke masing-masing tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 1 mL buffer sitrat-fosfat pH 7, 1 mL ekstrak kasar pektinase, 2 mL akuades, dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya, didinginkan sehingga mencapai temperatur 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.

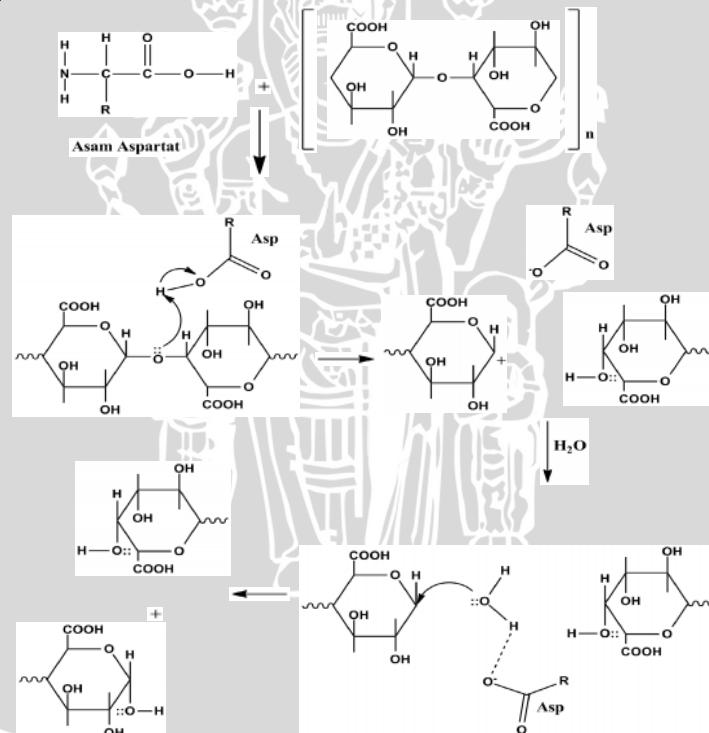
Sedangkan untuk menentukan  $K_I$  ditentukan dengan menguji aktivitas pektinase dengan cara membuat variasi konsentrasi substrat pektin 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; dan 0,8 % (b/v). Kemudian dipipet 1 mL kedalam masing-masing tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL buffer sitrat-fosfat pH 7, 1 mL ekstrak kasar pektinase, 1 mL air bebas reduktor, 1 mL KCl 6 mM. Selanjutnya, diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit, dan ditambahkan 2 mL reagen DNS Kemudian dimasukkan penangas air mendidih selama 5 menit, setelah itu didinginkan hingga temperatur kamar kemudian 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.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Penentuan aktivitas pektinase

Aktivitas pektinase dapat ditentukan berdasarkan banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari reaksi pemutusan ikatan glikosidik pektin oleh pektinas. Pada penelitian ini jumlah gula pereduksi yang dihasilkan ditentukan dengan metode spektrofotometri dengan menggunakan reagen DNS atau asam 3, 5-dinitrosalisilat. Gula pereduksi akan mereduksi DNS sehingga membentuk kompleks 3-amino, 5-nitrosalisilat berwarna merah kecoklatan yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada = 540 nm.



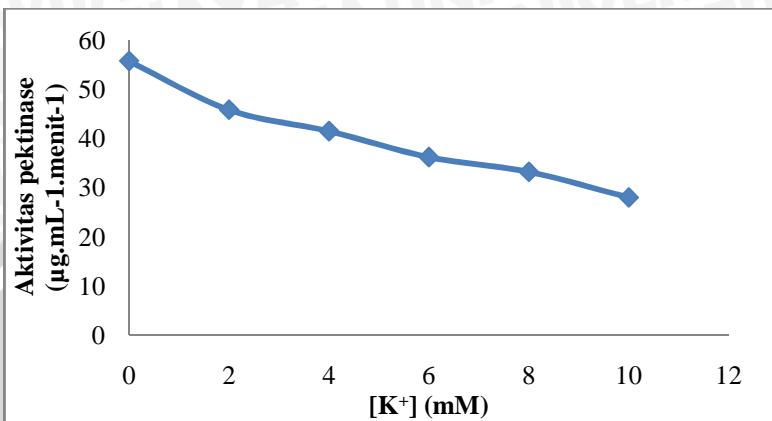
Gambar 4.1 Mekanisme reaksi pektinase dan pektin

Dari Gambar 4.1 dapat dilihat sisi aktif pektinase yang berupa karboksilat pada asam aspartat memiliki atom H yang mengalami induksi oleh elektron bebas yang terdapat pada atom O ikatan glikosidik sehingga ikatan antara H dan O pada asam aspartat terputus begitu pula pada ikatan antara C<sub>1</sub> dan O pada ikatan glikosidik sehingga pektin terbagi menjadi dua asam galakturonat dimana yang satu memiliki karbanion pada atom C<sub>1</sub>. Reaksi pemutusan pada atom C<sub>1</sub> tersebut terjadi karena atom C<sub>1</sub> pada ikatan glikosidik lebih mudah untuk diputus daripada C<sub>4</sub> karena letaknya yang langsung berikatan dengan O sehingga elektron pada atom C<sub>1</sub> cenderung ditarik ke arah atom O pada struktur pektin. Kemudian asam galakturonat dengan karbanion akan berinteraksi dengan O pada H<sub>2</sub>O sedangkan salah satu atom H pada molekul H<sub>2</sub>O berinteraksi dengan elektron bebas pada gugus karboksil aspartat sehingga membentuk asam aspartat kembali serta dua molekul asam galakturonat sebagai produk. Asam galakturonat yang dihasilkan tersebut diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda = 540$  nm dan dari konsentrasi yang dihasilkan dapat digunakan untuk menghitung aktivitas pektinase. Pada penelitian ini diperoleh aktivitas ekstrak kasar pektinase sebesar  $56,192 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ .

#### 4.2 Pengaruh penambahan variasi [K<sup>+</sup>] terhadap aktivitas ekstrak kasar pektinase

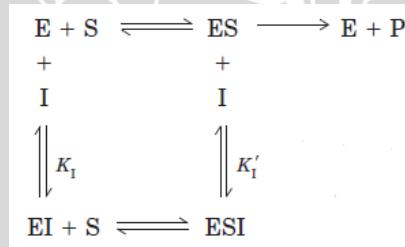
Untuk menentukan pengaruh penambahan K<sup>+</sup> terhadap aktivitas ekstrak kasar pektinase, pada penelitian ini digunakan larutan KCl dengan variasi konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8, 10 mM. Dari perlakuan tersebut diperoleh kurva pada Gambar 4.2 yang menunjukkan adanya pengaruh penambahan K<sup>+</sup> terhadap aktivitas ekstrak kasar pektinase.

Dari Gambar 4.2 dapat diketahui bahwa dengan masing-masing penambahan konsentrasi K<sup>+</sup> sebesar 2-10 mM dengan masing-masing konsentrasi K<sup>+</sup> dalam sampel sebesar 0,2-1 mM, aktivitas pektinase semakin kecil dibandingkan sebelum penambahan K<sup>+</sup>. Hal ini disebabkan oleh K<sup>+</sup> yang menyerang kompleks enzim-substrat (ES) antara pektinase dan pektin pada sisi lain di luar sisi aktif enzim.



**Gambar 4.2** Kurva aktivitas pektinase terhadap penambahan K<sup>+</sup>

Reaksi tersebut menyebabkan pembentukan kompleks enzim-substrat terganggu karena membentuk kompleks dengan inhibitor K<sup>+</sup> di dalamnya yaitu kompleks ESI (Enzim-Substrat-Inhibitor) sehingga pembentukan produk yang berupa asam galakturonat tidak optimal dan semakin banyak K<sup>+</sup> yang terlibat dalam reaksi enzimatis tersebut maka jumlah asam galakturonat yang dihasilkan semakin menurun.



**Gambar 4.3** Mekanisme reaksi inhibisi non kompetitif

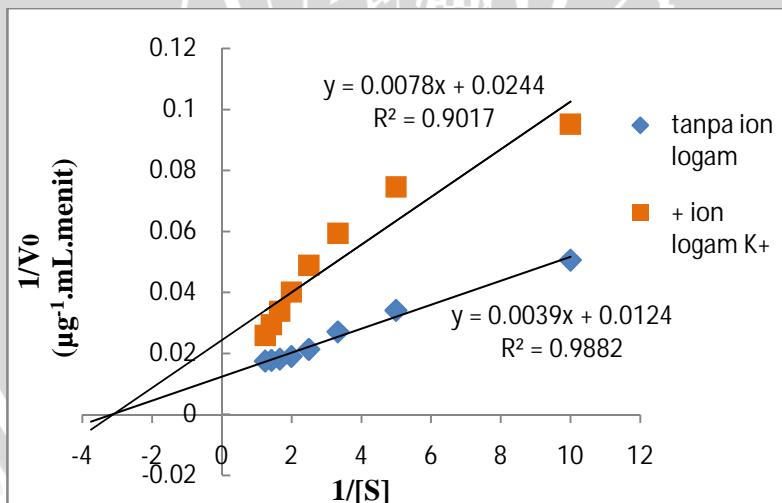
Dari Gambar 4.3 dapat diketahui bahwa mekanisme penyerangan inhibitor terjadi pada E dan ES. Akan tetapi karena inhibitor K<sup>+</sup> menyerang sisi lain di luar sisi aktif enzim sehingga nilai K<sub>Mapp</sub> tidak terpengaruh melainkan nilai V<sub>m</sub>. Nilai K<sub>M</sub> dan K<sub>Mapp</sub> sama sebesar 0,32% sedangkan nilai V<sub>m</sub> dan V<sub>mapp</sub> adalah 80,645 µg

$\text{ml}^{-1}\text{menit}^{-1}$  dan  $40,984 \mu\text{g ml}^{-1}\text{menit}^{-1}$ . Nilai  $V_{\text{mapp}}$  yang lebih kecil menunjukkan bahwa pembentukan produk yaitu asam galakturonat yang lebih kecil dibandingkan sebelum mengalami inhibisi.

Selanjutnya dilakukan uji statistika dengan metode RAL untuk mengetahui seberapa besar ion  $K^+$  berpengaruh terhadap aktivitas pektinase. Dari hasil uji menunjukkan bahwa pada Tabel I.2 nilai  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$  yang berarti menunjukkan bahwa terdapat pengaruh ion  $K^+$  terhadap aktivitas pektinase. Kemudian untuk mengetahui besarnya pengaruh perlakuan tersebut maka dilakukan uji BNT 1% yang menunjukkan bahwa pada penambahan konsentrasi  $K^+$  8 dan 10 mM memiliki pengaruh yang sangat nyata terhadap aktivitas pektinase.

### 4.3 Penentuan nilai parameter kinetika reaksi enzimatis

Nilai parameter kinetika enzimatis perlu ditentukan untuk mengetahui pola reaksi enzimatis yang terjadi. Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap reaksi enzimatis adalah konsentrasi substrat sehingga dalam penelitian ini dilakukan pengukuran aktivitas pektinase dengan beberapa variasi konsentrasi substrat pektin sebesar 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; dan 0,8 % (b/v).



Gambar 4.4 Kurva Lineweaver-Burk

Berdasarkan kurva hubungan antara  $1/V_0$  dengan  $1/[S]$  tanpa penambahan  $K^+$  pada Gambar 4.4 diperoleh nilai intersep 0,0124 dan slope 0,0039 sehingga diperoleh nilai  $V_m$  sebesar  $80,645 \mu\text{g ml}^{-1}\text{menit}^{-1}$  dan nilai  $K_M$  sebesar 0,32%. Sedangkan pada kurva hubungan  $1/V_0$  dengan  $1/[S]$  dengan penambahan ion  $K^+$  diperoleh nilai intersep sebesar 0,0244 dan slope 0,0078 sehingga diperoleh nilai  $V_m$  sebesar  $40,984 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{menit}^{-1}$  dan  $K_M$  sebesar 0,32%. Dari hasil perhitungan maupun perpotongan kurva, jenis inhibisi yang terjadi adalah inhibisi non kompetitif ditunjukkan dengan nilai  $K_M$  sama dengan nilai  $K_{Mapp}$  (dengan inhibisi). Hal tersebut terjadi karena  $K^+$  tidak menyerang sisi aktif enzim melainkan menyerang sisi lain enzim yaitu sisi alosterik (sisi selain sisi aktif enzim yang memiliki gugus karboksil dengan elektron bebas) sehingga pembentukan kompleks ES tidak terhambat melainkan pembentukan produk dari reaksi enzimatis tersebut terhambat karena keberadaan inhibitor pada sisi allosterik akan memberikan tekanan sehingga terjadi perubahan konformasi pada kompleks ESI dan pembentukan produk berupa asam galakturonat terhambat.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 1.1 Kesimpulan

1. Penambahan  $K^+$  dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mM mengakibatkan aktivitas pektinase mengalami penurunan, oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa  $K^+$  bertindak sebagai inhibitor
2. Nilai  $K_M$  pektinase dengan perlakuan tanpa inhibitor dan dengan inhibitor ( $K_{M\ app}$ ) sama yaitu 0,32% dengan nilai  $V_m$  dan  $V_{m\ app}$  yang berbeda yaitu  $80,645 \mu\text{g ml}^{-1}\text{menit}^{-1}$  dan  $40,984 \mu\text{g ml}^{-1}\text{menit}^{-1}$ . Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa jenis inhibisi yang melibatkan ion  $K^+$  dalam ikatan enzim substrat pada penelitian ini adalah inhibisi non kompetitif dengan nilai konstanta inhibisi ( $K_I$ ) sebesar 6,25.

#### 1.1 Saran

Penulis menyarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mempelajari pengaruh ion logam alkali lain terhadap aktivitas pektinase dari *Bacillus firmus*.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Maier, R.M., Pepper, I.L., dan Gerba, C.P., 2000, **Environmental Microbiology**, Academic Press, London.
- [2] Nursalim, M. 2005. **Isolasi, Pemurnian, dan Penentuan Beberapa Sifat Amilase yang Dihasilkan oleh Kapang**, PS MIPA Universitas Sudirman, Purwokerto.
- [3] Reda, A. B., Hesham, M.Y., Mahmoud, A.S., Ebtsam,Z.A.,2008, **Production of Bacterial Pectinase(s) from Agro-Industrial Wastes Under Solid State Fermentation Conditions**, Journal of Applied Sciences Research, 4(12),1708-1721
- [4] Yonalia, H., 1988, **Penjernihan Sari Buah Pisang (*Musa paradisiaca*) dengan Menggunakan Enzim Pektinase (Pektin Metil Esterase)**, FTP Institut Pertanian Bogor, Bogor
- [5] Nicole, M., Roy, M., Daniel, and Helen, H.P., 1995, **The Effect of Low Temperatures on Enzyme Activity**, Biochem. Journal. 305: 17-20
- [6] Kutateladze, Lali, N. Zakariashvili, Maya J., Tamar U., Rusudan K., Izolda K.,2009, **Selection of Microscopic Fungi - Pectinase Producers**, *Bulletin of The Georgian National Academy of Sciences*, No 1,Vol 3
- [7] Roosdiana. A., Arie S., Chanif M., dan Sasangka P., 2009, **Diseminasi Teknologi Industri Pertanian Berbasis Kelapa dan Susu Sapi**,*Laporan Penelitian*,Universitas Brawijaya
- [8] Bhardwaj, Vibha and Neelam Garg,2010,**Exploitation of Micro-Organisms for Isolation and Screening of Pectinase from Environment**, *Globelics 2010 8<sup>th</sup> International Conference*, India

- [9] Sajuthi D., Irma S., Yanti, dan Willy P.,2010, **Purifikasi dan Pencirian Enzim Protease Fibrinolitik dari Ekstrak Jamur Merang**, *Makara Sains*, No 2, Vol 14
- [10] Adejuwon,A.O., dan P.O. Olutiola,2007,**Pectin Lyase Activity in Culture of *Penicillium Species***,*Journal of Plant Sciences*,Vol 2,347-352
- [11] Prathyusha K. and V. Suneetha,2011, **Bacterial Pectinases and Their Potent Biotechnological Application in Fruit Processing/Juice Production Industry: A Review**, *Journal of Phytology* 2011, No 6, Vol 3,16-19
- [12] Palanivelu,P.,2006,**Polygalacturonases:Active Site Analyses and Mechanism of Action**, *Indian Journal of Biotechnology*,Vol 5,148-162
- [13] Fardiaz.. 2003, **Microbiologi Pangan**, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- [14] Akbalik, G., 2003, **Screening for Industrially Important Extracellular Enzymes from Alkalophilic *Bacillus genus***, *Thesis Master Of Science*, Izmir Institute of Technology, Turkey
- [15] Aslim, B., Necdet, S., dan Yavuz, B., 2000, **Determination of Some Properties of *Bacillus* Isolated from Soil**, *Turk J Biol*, Vol 26, 41-48
- [16] Haetami, K., Abun, dan Yuniar Mulyani, 2008, **Studi Pembuatan Probiotik (*Bacillus Licheniformis*, *Aspergillus niger*, dan *Saccharomyces cereviseae*) Sebagai Feed Suplement serta Implikasinya terhadap Pertumbuhan Ikan Nila Merah**, *Laporan Penelitian*,Universitas Padjadjaran
- [17] Dharani dan Aiyer, 2004, **Effect of C:N Ratio on Alpha Amylase Production by *Bacillus Licheniformis* SPT 27**, *African Journal of Biotechnology* ,No.10, Vol.3,519-522

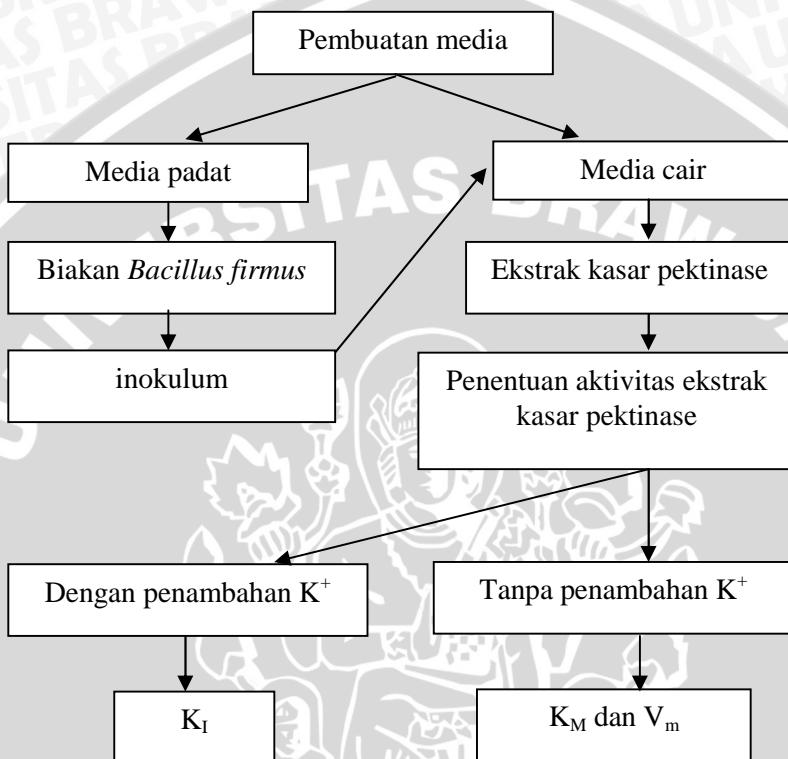
- [18] Winarno, F.G., 2002, **Enzim Pangan**, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- [19] Nelson, David L., Michael M.Cox, 2004, **Principle of Biochemistry 4<sup>th</sup> Edition**, W H Freeman, New York
- [20] Poedjiadi A., 1994, **Dasar – Dasar Biokimia**, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- [21] Santos, E.O., and M.L. Martin, 2003, **Effect of The Medium Composition on Formation of Amylase by *Bacillus* sp.** Brazilian Archives of Biology and Technology, No.46, 129–134
- [22] Namasivayam E, Ravindar JD, Mariappan K, jiji A, Kumar M, et al., 2011, **Production of Extracellular Pectinase by *Bacillus Cereus* Isolated from Market Solid Waste**, J Bioanal Biomed, Vol.3,070-075
- [23] Jayani R.S., Shivalika S., Reena G., 2005, **Microbial Pectinolytic Enzymes: A Review**, Process Biochemistry, No.40, 2931–2944
- [24] Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., and Rodwell, V.W., 2003, **Harper's Biochemistry 25<sup>th</sup> ed**, Appleton and Lange, America
- [25] Martin,Davi W.,Peter A. Mayes,Victor W. Rodwell,1984, **Biokimia (Review of Biochemistry)**,EGC,Jakarta
- [26] Chaplin, M., 2008, **Enzymes and Enzyme Technology** [www.lsbu.ac.uk/biology/enzyme/practical1.html](http://www.lsbu.ac.uk/biology/enzyme/practical1.html), tanggal akses : 20 Maret 2012
- [27] Lehninger, L. A., 1993, **Dasar-Dasar Biokimia**, Erlangga, Jakarta
- [28] Makky E.A., 2009, **Comparison of Osmotic Stress on Growth and Pectinase Production by *Aspegillus flavus* in**

**Liquid and Soli-State Cultures**,Asian J.Exp. Sci.,No.1,  
Vol.23,19-26

[29] Belitz, H.D., W. Grosch,1987,**Food Chemistry 2<sup>nd</sup> ed.**Springer-Verlag,Jerman



## Lampiran A. Diagram Alir Penelitian



## Lampiran B. Preparasi Larutan

### B.1 Pembuatan Reagen DNS

Sebanyak 1 gram NaOH; 18,2 gram Na-K Tartarat; 0,2 gram fenol dan 0,5 gram Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam beaker glass 100 mL. Lalu ditambahkan 1 gram asam dinitrosalisolat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan magnetik stirer. Setelah larut, dipindahkan dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas.

### B.2 Pembuatan Air Bebas Reduktor

Akuades ditambah dengan 5 tetes larutan KMnO<sub>4</sub> hingga larutan berwarna merah, kemudian didestilasi sehingga diperoleh air bebas reduktor.

### B.3 Pembuatan Larutan Stok Glukosa 5000 ppm

Ditimbang 0,5 g glukosa anhidrat kemudian dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia, kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

### B.4 Pembuatan Larutan Baku Glukosa

Larutan baku glukosa 5000 ppm dipipet berturut-turut 1, 2,3, 4, dan 5 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan gula pereduksi dengan konsentrasi 500, 1000, 1500, 2000, dan 2500 ppm.

### B.5 Pembuatan Larutan Asam sitrat 0,1 M

Larutan asam sitrat 0,1 M dibuat dalam 100 mL (BM C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> = 210,14 g/mol) dengan cara:

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

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

Jadi, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> yang harus ditimbang untuk membuat larutan C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 0,1 M adalah 2,1014 gram.

### B.6 Pembuatan larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M

Larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M dibuat dalam 100 mL (BM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 178$  g/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned}\text{Mol Na}_2\text{HPO}_4 &= [\text{Na}_2\text{HPO}_4] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Massa Na}_2\text{HPO}_4 &= \text{mol Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{BM Na}_2\text{HPO}_4 \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 178 \text{ g/mol} \\ &= 3,56 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  yang harus ditimbang untuk membuat larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M adalah 3,56 gram.

### B.7 Pembuatan Larutan Natrium Sitrat

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

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

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

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

### B.8 Pembuatan Larutan Substrat Pektin

Ditimbang 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; dan 0,8 gram *citrus pectin* kemudian masing-masing dilarutkan dengan akuades secukupnya dalam gelas kimia, selanjutnya larutan pektin tersebut dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditanda bataskan. Untuk membuat variasi konsentrasi substrat 0,1 %; 0,2 %; 0,3 %; 0,4 %; 0,5%; 0,6%; 0,7% dan 0,8 %.

### B.9 Pembuatan Larutan $\text{K}^+$

Kalium klorida (KCl) ditimbang sebanyak 0,745 gram (BM KCl = 74,5g/mol), dilarutkan dengan akuades dan diencerkan dalam labu ukur 100 mL (KCl 0,1M). Kemudian larutan KCl dipipet sebanyak 2, 4, 6, 8, dan 10 ml, dimasukkan dalam ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas lalu dikocok sehingga diperoleh larutan KCl 2, 4, 6, 8, dan 10 mM.

Contoh perhitungan pengenceran:

$$M_1 = 0,1 \text{ M}$$

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

KCl 2mM

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

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

KCl 4mM

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

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

KCl 6mM

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

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

KCl 8mM

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

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

KCl 10mM

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

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

## B.10 Buffer Sitrat fosfat pH 7

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

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

Sebagai contoh, untuk membuat larutan buffer sitrat fosfat pH 7, maka 50 mL larutan asam sitrat ditambah dengan 62,80 mL larutan Na-fosfat dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{pH} = 6,40 - \log \frac{(50,0 \text{ mL} \times 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})}{(v \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})}$$

$$7 = 6,40 - \log \frac{5}{v}$$

$$0,6 = \log \frac{5}{0,2v}$$

$$3,98 = \frac{5}{0,2v}$$

$$0,2v = 1,26$$

$$V = 6,3 \text{ mL}$$

### B.11 Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 6

Sebanyak 9,5 mL larutan asam sitrat 0,1 M dipipet kedalam beaker glass, kemudian ditambahkan 41,5 mL larutan natrium sitrat 0,1 M dan diaduk hingga homogen. Dipindahkan larutan campuran ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.



## Lampiran C. Perhitungan

### C.1 Aktivitas Pektinase

Aktivitas pektinase merupakan banyaknya gula pereduksi ( $\mu\text{g}$ ) yang dihasilkan oleh 1 mL pektinase dalam waktu 1 menit.

Pengukuran aktivitas pektinase dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$AE = \frac{[Gula \ pereduksi] (\mu\text{g/mL}) \times V \cdot fp}{p \cdot q}$$

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  $\lambda = 540 \text{ nm}$  dengan konsentrasi substrat pektin 0,8% adalah 0,6318. Sedangkan persamaan regresi linier pada kurva standart gula pereduksi adalah  $y = 0,0038x$ , sehingga dari persamaan tersebut dapat ditentukan konsentrasi gula pereduksi:

$$y = 0,0037x$$

$$0,6318 = 0,0037x$$

$$x = \frac{0,6318}{0,0037}$$

$$= 161,526 \mu\text{g/mL}$$

Dengan demikian dapat ditentukan aktivitas pektinase:

$$\begin{aligned} AE &= [Gula \ pereduksi] \times \frac{V \cdot fp}{p \cdot q} \\ &= 161,526 \mu\text{g/mL} \times \frac{10\text{mL} \times 1}{1\text{mL} \times 30\text{menit}} \\ &= 53,842 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1} \end{aligned}$$

## C.2 Nilai $V_m$ , $K_M$ , dan $K_i$

Nilai  $V_m$ ,  $K_M$ , dan  $K_i$  ditentukan dari persamaan garis pada kurva hubungan antara  $1/[S]$  dan  $1/V_0$ .

- Tanpa penambahan ion  $K^+$ 

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

$$\frac{1}{V_m} = 0,0124$$

$$V_m = 80,645 \mu\text{g.ml}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$$

$$\frac{K_M}{V_m} = \frac{K_M}{80,645} = 0,0039$$

$$K_M = 0,3156$$
- Dengan penambahan ion  $K^+$ 

$$y = 0,0078x + 0,0244$$

$$\frac{1}{V_m} = 0,0244$$

$$V_m = 40,984 \mu\text{g.ml}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$$

$$\frac{K_M}{V_m} = \frac{K_M}{40,984} = 0,0078$$

$$K_M = 0,3196$$
- Perhitungan nilai  $K_i$   
Penentuan nilai  $K_i$  dilakukan dengan membandingkan persamaan Lineweaver-Burk dengan tanpa penambahan ion  $K^+$  dengan persamaan:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_m} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (\text{tanpa inhibisi})$$

sedangkan persamaan dengan inhibisi non kompetitif:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_{Mapp}}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

dengan nilai  $K_M = K_{Mapp}$  dan  $1/V_{mapp} = 1/V_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$ , maka

$$1/V_{mapp} = 1/V_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

$$0,0244 = 0,0124 \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

$$1,96 = 1 + \frac{[6mM]}{K_i}$$

$$0,96 = \frac{[6mM]}{Ki}$$

$$Ki = \frac{6mM}{0,96}$$

$$Ki = 6,25$$

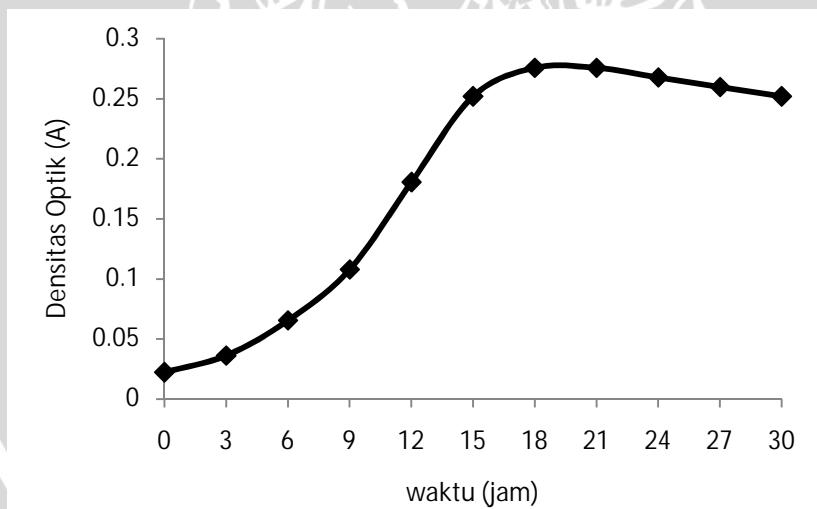


## Lampiran D. Data Hasil Penelitian

### D.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Bacillus firmus*

Tabel D.1 Data Pertumbuhan *Bacillus firmus*

Waktu (jam)	A1	A2	A3	A Rata-rata
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

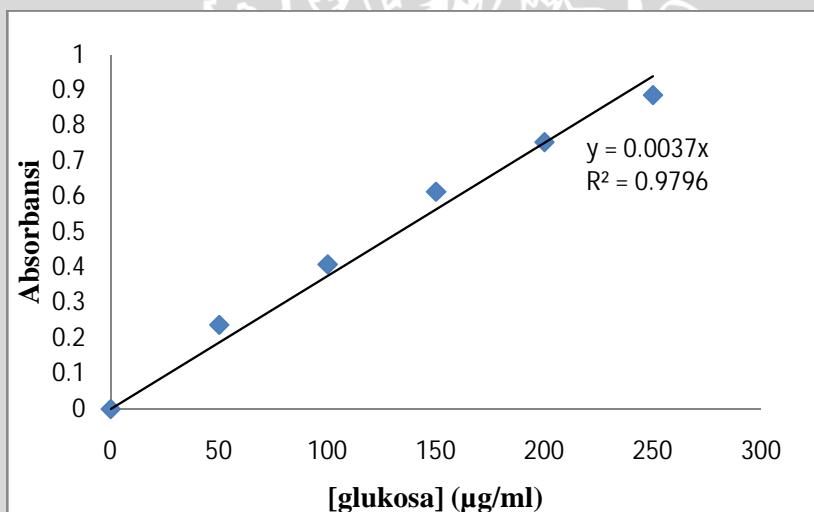


Gambar D.1 Kurva Pertumbuhan *Bacillus firmus*

## D.2 Pembuatan Kurva Baku Glukosa

Tabel D.2 Data Absorbansi Glukosa pada  $\lambda = 540 \text{ nm}$

[Gula Pereduksi] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>rata-rata</sub>
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.2 Kurva Standar Glukosa

### D.3 Aktivitas Pektinase

Tabel D.3.1 Data Absorbansi Aktivitas Pektinase pada  $\lambda = 540 \text{ nm}$

Ekstrak kasar enzim pektinase	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_{\text{rata-rata}}$
	0,6238	0,6237	0,6237	0,6237

Tabel D.3.2 Data Aktivitas Pektinase

Ekstrak kasar enzim pektinase	$A_{\text{rata-rata}}$	Konsentrasi gula pereduksi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas enzim ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ )
	0,6237	168,576	56,192

Contoh perhitungan

Data rata-rata absorbansi pektinase pada  $\lambda = 540 \text{ nm}$  dengan konsentrasi substrat pektin 0,7% adalah 0,6237. Sedangkan persamaan regresi linier pada kurva standart gula pereduksi adalah  $y = 0,0038x$ , sehingga dari persamaan tersebut dapat ditentukan konsentrasi gula pereduksi:

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

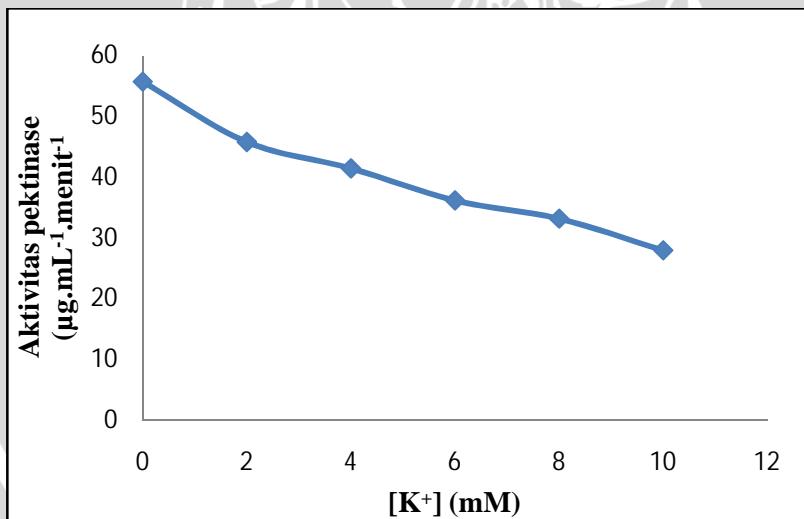
Dengan demikian dapat ditentukan aktivitas pektinase:

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

#### D.4 Aktivitas Pektinase dengan Penambahan K<sup>+</sup>

Tabel D.4 Data Absorbansi Pektinase dengan Variasi Konsentrasi K<sup>+</sup>

Konsentrasi K <sup>+</sup> (mM)	A <sub>rata-rata</sub>	Aktivitas pektinase ( $\mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ )
0	0.6187	55,736
2	0.5086	45,817
4	0.4603	41,471
6	0.4017	36,192
8	0.3684	33,192
10	0.3106	27,985



Gambar D.3 Kurva aktivitas pektinase pada variasi konsentrasi K<sup>+</sup>

## D.5 Penentuan Konstanta Kinetika $V_m$ , $K_M$ , dan $K_I$

**Tabel D.5.1** Data absorbansi pektinase dengan variasi konsentrasi substrat (tanpa  $K^+$ ) pada  $\lambda = 540$  nm

Konsentrasi pektin % (b/v)	Absorbansi			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	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	0,6110	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

**Tabel D.5.2** Data aktivitas pektinase dengan variasi konsentrasi substrat (tanpa  $K^+$ ) pada  $\lambda = 540$  nm

Konsentrasi substrat % (b/v)	Konsentrasi gula pereduksi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas pektinase ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$ )
0,1	59,243	19,748
0,2	87,865	29,288
0,3	110,459	36,820
0,4	140,351	46,784
0,5	157,324	52,441

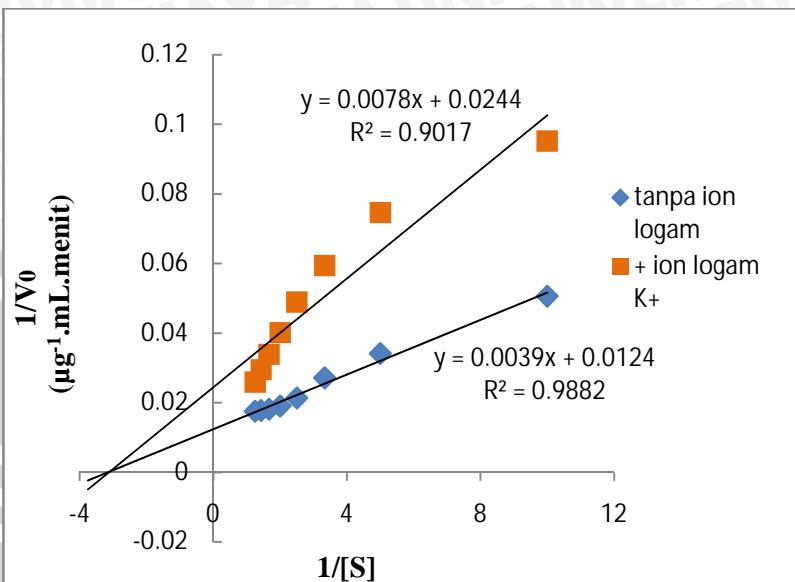
0,6	165,081	55,027
0,7	168,568	56,189
0,8	170,757	56,919

**Tabel D.5.3** Data absorbansi pektinase dengan variasi konsentrasi substrat (dengan  $K^+$ ) pada  $\lambda = 540$  nm

Konsentrasi pektin % (b/v)	Absorbansi			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A rata-rata
0,1	0.1161	0.1168	0.1167	0.1165
0,2	0.1488	0.1486	0.1485	0.1486
0,3	0.1868	0.1867	0.1867	0.1867
0,4	0.2269	0.2268	0.2265	0.2267
0,5	0.2764	0.2763	0.2764	0.2764
0,6	0.3276	0.3277	0.3275	0.3276
0,7	0.3768	0.3765	0.3766	0.3766
0,8	0.4283	0.4281	0.4282	0.4282

**Tabel D.5.4** Data aktivitas pektinase dengan variasi konsentrasi substrat (dengan  $K^+$ ) pada  $\lambda = 540 \text{ nm}$

Konsentrasi substrat % (b/v)	Konsentrasi gula pereduksi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas pektinase ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$ )	$1/[S]$	$1/V_0$
0,1	31.4955	10.4985	10	0.0953
0,2	40.1712	13.3904	5	0.0747
0,3	50.4685	16.8228	3.33	0.0594
0,4	61.2793	20.4264	2.5	0.0490
0,5	74.6937	24.8979	2	0.0402
0,6	88.5405	29.5135	1.67	0.0339
0,7	101.7928	33.9309	1.43	0.0295
0,8	115.7297	38.5766	1.25	0.0259



Gambar D.4 Kurva Lineweaver-Burk

## Lampiran E. Analisis Statistika

### E.1 Aktivitas Pektinase dengan Penambahan K<sup>+</sup>

Tabel E.1 Data statistika aktivitas ekstrak kasar pektinase dengan penambahan variasi konsentrasi K<sup>+</sup>

[K <sup>+</sup> ] mM	Aktivitas enzim ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ )			jumlah	Rata-rata
	1	2	3		
0	55,748	55,739	55,721	167,207	55,736±0,013
2	45,838	45,819	45,793	137,450	45,817±0,022
4	41,486	41,477	41,450	124,414	41,471±0,018
6	36,198	36,189	36,189	108,576	36,192±0,005
8	33,207	33,189	33,180	99,576	33,192±0,013
10	28,000	27,982	27,973	83,955	27,985±0,014

### E.2 Analisis Statistika Perhitungan BNT

Analisis data pengaruh konsentrasi ion K<sup>+</sup> terhadap aktivitas pektinase dianalisis menggunakan analisis ragam (uji F) pada Rancangan Acak Lengkap (RAL) dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil 5% (BNT). Langkah perhitungan analisa data adalah sebagai berikut:

- Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np}$$

$$FK = \frac{[721,1802]^2}{6 \times 3}$$

$$FK = 28894,492$$

- Menghitung jumlah kuadrat (JK)

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

$$JK \text{ total} = 30360,878 - 28894,492$$

$$JK \text{ total} = 1466,386$$

- b.  $JK_{\text{perlakuan}} (JK_p) = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_1} - FK$   
 $JK_{\text{perlakuan}} (JK_p) = \frac{[(721,1802)^2]}{3} - 28894,492$
- c.  $JK_{\text{perlakuan}} (JK_p) = 1466,383$   
 $JK_{\text{galat percobaan}} (JK_G) = JK_{\text{total}} - JK_{\text{perlakuan}}$   
 $JK_{\text{galat percobaan}} (JK_G) = 1466,386 - 1466,383$   
 $JK_{\text{galat percobaan}} (JK_G) = 0,003$
- Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber keragaman
    - a. Kuadrat Tengah  $_{\text{perlakuan}} (KT_p) = \frac{JK_p}{db_{\text{perlakuan}}}$   
 $Kuadrat Tengah _{\text{perlakuan}} (KT_p) = \frac{1466,383}{5}$   
 $Kuadrat Tengah _{\text{perlakuan}} (KT_p) = 293,277$
    - b. Kuadrat Tengah  $_{\text{galat percobaan}} (KT_G) = \frac{JK_G}{db_{\text{percobaan}}}$   
 $Kuadrat Tengah _{\text{galat percobaan}} (KT_G) = \frac{0,003}{12}$   
 $Kuadrat Tengah _{\text{galat percobaan}} (KT_G) = 0,00025$

• Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KT_p}{KT_G}$$

$$F_{\text{hitung}} = \frac{293,277}{0,00025}$$

$$F_{\text{hitung}} = 1204487$$

$$F_{\text{tabel } 1\%} = FINV(0,05;5;12) = 3,106$$

$F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel } 1\%}$ , maka tolak  $H_0$ , artinya ion K+ memiliki pengaruh terhadap aktivitas pektinase. Untuk mengetahui perlakuan mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas pektinase, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT):

- Menghitung nilai BNT dengan  $\alpha = 5\%$

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

$$BNT ( ) = 2,179 \sqrt{\frac{2 \times 0,00025}{3}}$$

$$BNT ( ) = 0,028$$

- Analisis ragam satu arah pengaruh ion K<sup>+</sup> terhadap aktivitas pektinase

**Tabel E.2** Analisis ragam satu arah pengaruh K<sup>+</sup> terhadap aktivitas pektinase

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F <sub>hitung</sub>	F <sub>tabel</sub>
<b>Perlakuan</b>	5	1466,383	293,277	1204487	3,106
<b>Galat Percobaan</b>	12	0,0029	0,00243		
<b>Total</b>	17	1466,386	86,258		

**Tabel E.3** Data uji BNT pengaruh ion K<sup>+</sup> terhadap aktivitas pektinase

Ion K <sup>+</sup>	ion K <sup>+</sup>	10	8	6	4	2	0
	Rata-rata	27.985	33.192	36.192	41.471	45.817	55.736
<b>10</b>	27.985	0 *					
<b>8</b>	33.192	5.207	0 *				
<b>6</b>	36.192	8.207	3.000	0 *			
<b>4</b>	41.471	13.486	8.279	5.279	0 *		
<b>2</b>	45.817	17.832	12.625	9.625	4.345	0 *	
<b>0</b>	55.736	27.751	22.544	19.544	14.264	9.919	0 *

Keterangan : \* =tidak beda nyata