

**Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap  
Kestabilan Aktivitas Enzim Xilanase Hasil Isolasi dari  
*Trichoderma viride* yang diamobilisasi Menggunakan  
Kitosan-Natrium Tripolifosfat**

**SKRIPSI**

**Oleh :**

**IMAROH MUFIDAH ISYA**

**105090200111039**



**JURUSAN KIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU**  
**PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**MALANG**  
**2014**

**Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap  
Kestabilan Aktivitas Enzim Xilanase Hasil Isolasi dari  
*Trichoderma viride* yang diamobilisasi Menggunakan  
Kitosan-Natrium Tripolifosfat**

**SKRIPSI**

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

Oleh :

**IMAROH MUFIDAH ISYA**  
**105090200111039**



**JURUSAN KIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN**  
**ALAM**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**MALANG**  
**2014**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Kestabilan Aktivitas Enzim Xilanase Hasil Isolasi dari *Trichoderma viride* yang diamobilisasi Menggunakan Kitosan-Natrium Tripolifosfat**

oleh :

**IMAROH MUFIDAH ISYA**

**105090200111039**

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**

NIP. 195807111992032002

**Drs. Sutrisno, M.Si**

NIP. 196203181990021001

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kimia

Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

**Dr. Edi Priyo Utomo, MS.**

NIP. 195712271986031003

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama

: Imaroh Mufidah Isya

NIM

: 105090200111039

Jurusan

: Kimia

Penulis skripsi berjudul

: Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Kestabilan Aktivitas Enzim Xilanase Hasil Isolasi dari *Trichoderma viride* yang diamobilisasi Menggunakan Kitosan-Natrium Tripolifosfat

Dengan ini menyatakan bahwa :

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,  
Yang menyatakan,

(Imaroh Mufidah Isya)  
NIM. 105090200111039

**Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Aktivitas Enzim Xilanase Hasil Isolasi dari *Trichoderma viride* yang diamobilisasi Menggunakan Kitosan-Natrium Tripolifosfat**

**ABSTRAK**

Xilanase merupakan kelompok enzim ekstraseluler yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi xirosa. Jenis mikroorganisme yang sudah umum menghasilkan xilanase ialah dari golongan kapang dan bakteri. *Trichoderma viride* merupakan salah satu jenis kapang yang dapat menghasilkan enzim xilanase. Kestabilan enzim dipengaruhi kondisi lingkungan. Enzim dikatakan stabil bila aktivitas enzim sisa lebih dari 50% dari aktivitas enzim awal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas enzim xilanase hasil isolasi dari *Trichoderma viride* yang diamobilisasi dalam kitosan-natrium tripolifosfat. Xilanase diamobilisasi dengan metode penjebakan menggunakan matriks kitosan-natrium tripolifosfat dan disimpan pada variasi suhu ( $30, 40, 50, 60, 70$ )  $^{\circ}\text{C}$  dan variasi lama penyimpanan (0,1,2,3,4,5,6,7) hari. Aktivitas enzim dapat ditentukan melalui banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis xilan oleh xilanase pada kondisi optimumnya. Gula pereduksi di analisis menggunakan reagen DNS secara spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan tingkat kestabilan tertinggi dari enzim xilanase berada pada suhu penyimpanan  $50^{\circ}\text{C}$ . Enzim xilanase amobil, stabil hingga hari ke-7 dengan aktivitas sisa 50,81 %. Semakin lama waktu penyimpanan maka aktivitas xilanase semakin menurun. Pada efisiensi xilanase amobil menggunakan matriks kitosan-natrium tripolifosfat dapat digunakan sebanyak lima kali pengulangan dengan aktivitas sebanyak 16,462 unit dan efisiensi sebesar 50,19%.

Kata kunci: *Aktivitas Xilanase, Amobil, Suhu, , Waktu Penyimpanan Xilan.*

# **Effect of Temperature and Storage Time on The Stability of *Trichoderma viride* Xylanase which is Immobilized in Chitosan-Sodium Tripolyphosphate**

## **ABSTRACT**

Xylanase is an extracellular enzymes group which enable to hydrolyzed xylan into xylose. The common types of xylanase producing microorganisms are fungi and bacteria class. *Trichoderma viride* is one of the mold types that can produce xylanase. The enzyme stability is affected by environmental condition. The enzyme is stable when the remained activity shows more than 50% from the initial enzyme activity. This study is to determine the effect of temperature and storage time the stability of xylanase activity. Immobilized xylanase in chitosan-sodium tripolyphosphate matrix stored at various temperature of (30, 40, 50, 60, 70) $^{\circ}$ C and storage time of (0,1,2,3,4,5,6,7) days. The enzyme activity can be determined by the amount of reducing sugar per g enzyme per minute ( $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{minutes}^{-1}$ ). The reducing sugar was determined by spectrophotometric method using DNS as reagent. The results showed that the highest level of xylanase stability at storage temperature of 50 $^{\circ}$ C. The immobilized xylanase remained stable up to 7 days with residual activity 50,815%. The longer of the storage time the xylanase activity decreased. The efficiency of immobilized xylanase in chitosan-sodium tripolyphosphate matrix can be used five times repetitions resulting in activity of 16.462 units and the efficiency 50.19%.

**Key words :** Immobilized, Storage Time of Xilan, Temperature, Xylanase Activity

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji syukur penyusun panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Aktivitas Enzim Xilanase Hasil Isolasi dari Trichoderma Viride yang diamobilisasi Menggunakan Kitosan-Natrium Tripolifosfat”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Penyusun menyadari bahwa selama pelaksanaan dan penyelesaian skripsi ini telah banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penyusun ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc selaku Dosen Pembimbing I, yang telah banyak memberikan saran dan bimbingan selama penyusunan proposal penelitian, pelaksanaan penelitian hingga penulisan.
2. Drs. Sutrisno, M.Si selaku Dosen pembimbing II yang telah memberikan saran dan arahan dalam pelaksanaan penelitian sampai penyusunan skripsi.
3. Dr. Edi Priyo Utomo, MS, selaku Ketua Jurusan kimia yang telah memberikan dukungan dalam proses penyelesaian skripsi.
4. Ir. Isya Ashari, MT dan Wilujeng Hartatik selaku kedua orang tua penulis, adik dan kakak serta keluarga besar yang selalu mendoakan, memberi dukungan baik spiritual maupun materil, dan motivasi kepada penulis.
5. Janatun Naimah, Alvi Salamah, Adyatama Ardian, Edi Sukmana selaku rekan satu tim penelitian dan Bpk. Mariono selaku Laboran Biokimia atas semua dukungan semangat dan berbagi ilmu yang terkait penelitian ini.
6. Hilman Nurmahdi beserta keluarga, Baiq Octaviana D.A, Ika Oktavia Wulandari, Cicilia Shinta, Christiana Adi, Iftakhul Mufarrika, Gilly Putri, Ilmimada Harfiya, M. Rizky Indra .P selaku sahabat dan kerabat yang selalu memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.

7. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga terselesaikan laporan ini.

Penyusun menyadari dalam laporan ini masih banyak terdapat kekurangan. Untuk itu, penyusun mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini. Penyusun berharap semoga laporan ini dapat bermanfaat khususnya bagi penyusun dan pembaca pada umumnya. Amin.

Malang, Agustus 2014

Penyusun



## DAFTAR ISI

<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> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Enzim .....	5
2.2 Xilan.....	5
2.3 Kulit Pisang .....	6
2.4 Enzim Xilanase .....	7
2.5 <i>Trichoderma viride</i> .....	8
2.6 Isolasi Enzim.....	9
2.7 Amobilisasi Enzim.....	10
2.8 Kitosan.....	13
2.9 Kestabilan Enzim .....	14
2.10 Penentuan Aktivitas Xilanase .....	15
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	16
3.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	16
3.2.1 Bahan Penelitian .....	16
3.2.2 Alat Penelitian .....	16
3.3 Tahapan Penelitian .....	17
3.4 Prosedur Kerja .....	17
3.4.1 Pembuatan Substrat Kulit Pisang .....	17
3.4.2 Pembuatan Media Padat .....	17
3.4.3 Peremajaan biakan <i>Trichoderma viride</i> ....	18

3.4.4 Pembuatan media cair .....	18
3.4.5 Pembuatan inokulum .....	18
3.4.6 Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase .....	19
3.4.7 Pembuatan kurva standar gula pereduksi .....	19
3.4.8 Penentuan panjang gelombang maksimum....	19
3.4.9 Uji Kadar protein awal.....	20
3.4.10 Uji aktivitas xilanase bebas.....	20
3.4.11 Preparasi matriks kitosan .....	21
3.4.12 Amobilisasi xilanase dengan kitosan- natrium tripolifosfat.....	21
3.4.13 Uji kadar protein sisa .....	21
3.4.14 Penentuan kestabilan aktivitas enzim amobil berdasarkan pengaruh suhu dan lama penyimpanan.....	21
3.4.15 Penentuan aktivitas enzim xilanase .....	22
3.4.16 Analisis data.....	22

## BAB IV PEMBAHASAN

4.1 Produksi dan Isolasi Enzim Xilanase dari <i>Trichoderma Viride</i> .....	23
4.2 Amobilisasi Xilanase menggunakan Kitosan- Natrium Tripolifosfat .....	24
4.3 Penentuan Aktivitas Xilanase .....	26
4.4 Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Xilanase Hasil Isolasi dari <i>Trichoderma</i> <i>viride</i> yang diamobilisasi menggunakan Kitosan- Natrium Tripolifosfat .....	28
4.5 Efisiensi Pemakaian Ulang Enzim Amobil .....	30

## BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan .....	33
5.2 Saran .....	33

## DAFTAR PUSTAKA .....

## LAMPIRAN .....

## DAFTAR TABEL

Halaman

<b>Tabel 2.1</b>	Komposisi kimiawi substrat kulit pisang .....	7
<b>Tabel 2.2</b>	Mikroorganisme penghasil enzim xilanase .....	8
<b>Tabel 4.1</b>	Perbandingan ekstrak kasar xilanase (enzim bebas) dan enzim amobil .....	23
<b>Tabel 4.2</b>	Efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil.....	31
<b>Tabel D.1</b>	Pengukuran panjang gelombang .....	46
<b>Tabel D.2</b>	Absorbansi gula pereduksi pada panjang gelombang 490 nm.....	47
<b>Tabel E.1.1</b>	Pengukuran aktivitas bebas enzim xilanase .....	49
<b>Tabel E.2.1</b>	Data Uji Kadar Protein Awal .....	50
<b>Tabel E.3.1</b>	Data absorbansi enzim amobil setelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan .....	50
<b>Tabel E.3.2</b>	Data konsentrasi gula pereduksi enzim amobil setelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan .....	50
<b>Tabel E.3.3</b>	Data aktivitas enzim amobil setelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan.....	51
<b>Tabel E.3.4</b>	Rata rata aktivitas enzim amobilsetelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama.....	51
<b>Tabel E.3.5</b>	Aktivitas sisa enzim xilanase amobil .....	50
<b>Tabel E.4.1</b>	Data Uji Kadar Protein Sisa .....	52
<b>Tabel F.1</b>	Data aktivitas enzim amobil .....	53
<b>Tabel F.1.1</b>	Tabel dua arah .....	54
<b>Tabel F.1.2</b>	Data BNT hari ke 0 .....	56
<b>Tabel F.1.3</b>	Data BNT hari ke 1 .....	56
<b>Tabel F.1.4</b>	Data BNT hari ke 2 .....	56
<b>Tabel F.1.5</b>	Data BNT hari ke 3 .....	56
<b>Tabel F.1.6</b>	Data BNT hari ke 4 .....	57
<b>Tabel F.1.7</b>	Data BNT hari ke 5 .....	57
<b>Tabel F.1.8</b>	Data BNT hari ke 6 .....	57
<b>Tabel F.1.9</b>	Data BNT hari ke 7 .....	57
<b>Tabel F.2.1</b>	Data aktivitas efisiensi xilanase .....	56
<b>Tabel F.2.2</b>	Data uji BNT efisiensi pemakaian ulang xilanase Amobil .....	60

## DAFTAR GAMBAR

Halaman

<b>Gambar 2.1</b>	Struktur molekul xilan.....	6
<b>Gambar 2.2</b>	Ikatan ionik antara enzim dan matriks .....	11
<b>Gambar 2.3</b>	Ikatan kovalen antara enzim dan matriks .....	11
<b>Gambar 2.4</b>	Metode amobilisasi enzim (a) carrier binding, (b) ikatan silang, (c) penjeratan tipe kisi dan (d) penjeratan tipe mikrokapsul .....	13
<b>Gambar 2.5</b>	Struktur kitosan .....	13
<b>Gambar 2.6</b>	Reaksi DNS dan xilosa.....	15
<b>Gambar 4.1</b>	Reaksi protonasi kitosan dalam asam asetat .....	25
<b>Gambar 4.2</b>	Reaksi disosiasi natrium tripolifosfat dalam air .....	25
<b>Gambar 4.3</b>	Ikatan silang antara kitosan dan natrium tripolifosfat ..	27
<b>Gambar 4.4</b>	Mekanisme reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa .....	27
<b>Gambar 4.5</b>	Grafik pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap aktivitas enzim xilanase .....	28
<b>Gambar 4.6</b>	Grafik % aktivitas enzim sisa xilanase amobil.....	30
<b>Gambar D.1</b>	Kurva penentuan panjang gelombang maksimum .....	47
<b>Gambar D.2</b>	Kurva baku gula pereduksi.....	48

## DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

<b>Lampiran</b>	<b>A</b>	Tahapan penelitian .....	40
<b>Lampiran</b>	<b>B</b>	Preparasi larutan .....	41
	<b>B.1</b>	Akuades steril.....	41
	<b>B.2</b>	Larutan asam asetat 0,2 M .....	41
	<b>B.3</b>	Larutan natrium asetat 0,2 M .....	41
	<b>B.4</b>	Buffer asetat pH 5 .....	41
	<b>B.5</b>	Larutan stok glukosa 1500 µg /mL .....	41
	<b>B.6</b>	Larutan baku gula pereduksi .....	41
	<b>B.7</b>	Reagen DNS.....	42
	<b>B.8</b>	Substrat xilam 1% .....	42
	<b>B.9</b>	Larutan NaOH 10 %.....	42
	<b>B.10</b>	Pereaksi Biuret .....	42
	<b>B.11</b>	Larutan asam asetat 3% .....	42
	<b>B.12</b>	Larutan Kitosan.....	42
	<b>B.13</b>	Larutan Natrium Tripolifosfat 3%.....	43
<b>Lampiran</b>	<b>C</b>	Hitungan Preparasi Larutan .....	44
	<b>C.1</b>	Larutan asam asetat 0,2 M .....	44
	<b>C.2</b>	Larutan natrium asetat 0,2 M .....	44
	<b>C.3</b>	Larutan Buffer asetat pH 5 .....	44
<b>Lampiran</b>	<b>D</b>	Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku Gula Pereduksi .....	46
	<b>D.1</b>	Pengukuran panjang gelombang maksimum .....	46
	<b>D.2</b>	Absor.....	47
<b>Lampiran</b>	<b>E</b>	Perhitungan Aktivitas Enzim dan Kadar Protein Xilanase .....	49
	<b>E.1</b>	Perhitungan Aktivitas Xilanase Bebas .....	49
	<b>E.2</b>	Perhitungan Kadar Protein Awal Xilanase Bebas .....	49
	<b>E.3</b>	Data Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Aktivitas Xilanase Hasil Isolasi Trichoderma viride yang Diamobilisasi Menggunakan Kitosan –Natrium Tripolifosfat ....	50
	<b>E.4</b>	Perhitungan Kadar Protein Sisa Xilanase Amobil.....	52
<b>Lampiran</b>	<b>F</b>	Analisa Statistika .....	53
	<b>F.1</b>	Analisa Statistika Data aktivitas enzim amobil ....	53

# UNIVERSITAS BRAWIJAYA

- F.2 Analisa Data Efisiensi Pemakaian Ulang Xilanase Amobil Analisa Statistika Data aktivitas enzim amobil ..... 57

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1. 1 Latar Belakang

Enzim berperan penting dalam metabolisme makhluk hidup. Enzim merupakan molekul protein alami yang memiliki kemampuan tinggi terutama dalam fungsinya sebagai katalis yaitu untuk proses biokimia yang terjadi di dalam sel maupun diluar sel dan dapat dikatakan sebagai katalis yang efisien karena dapat menurunkan energi aktivasi dari reaksi kimia. Suatu enzim bekerja secara khas terhadap suatu substrat tertentu atau dikatakan memiliki sifat yang spesifik [1,2]. Daya katalitik enzim yang tinggi dapat mempercepat reaksi kimia tanpa mengubah kesetimbangan reaksi yang dikatalisis [3]. Enzim diproduksi oleh semua organisme hidup, sehingga enzim bertanggung jawab untuk meningkatkan reaksi biokimia yang terjadi pada mikroorganisme, tanaman, hewan, dan manusia [1]. Dalam perkembangannya, enzim banyak dimanfaatkan dalam bidang industri. Salah satu contoh enzim adalah xilanase. Xilanase memiliki peranan penting dalam dunia industri, misalnya pada proses biobleaching pada industri pulp, pembuatan gula xilosa, produksi makanan dan minuman dan produksi makanan ternak[4].

Xilanase merupakan kelompok enzim ekstraseluler yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida [5]. Xilan adalah penyusun utama hemiselulosa di samping glukan dan manan. Xilanase dapat ditemui pada limbah tanaman seperti tongkol jagung, jerami padi, dan kulit pisang [6]. Jenis mikroorganisme yang menghasilkan xilanase ialah dari golongan kapang dan bakteri. Meskipun enzim yang dihasilkan oleh golongan bakteri memiliki ketahanan pada suhu yang lebih tinggi dibanding kapang, namun aktivitas xilanase dari golongan kapang jauh lebih tinggi daripada bakteri. Disamping itu, level produksi yang tinggi dan kemudahan dalam kultivasi membuat kapang lebih banyak digunakan dalam produksi enzim skala industri. *Trichoderma viride* merupakan salah satu jenis kapang yang dapat menghasilkan enzim xilanase [7]. Keunggulan *Trichoderma viride* dibandingkan kapang lainnya, yaitu dapat ditemukan di berbagai tempat, dapat tumbuh cepat di berbagai substrat, mampu berkembang biak pada

kondisi pH asam (2,1-2,5), tidak menimbulkan residu kimia berbahaya [4].

Pada proses dan analisa yang melibatkan enzim, umumnya enzim hanya digunakan sekali pakai, karena secara teknis sangat sulit untuk memisahkan enzim dan produk serta kesulitan mendapatkan kembali enzim yang aktif diakhir reaksi [8]. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengatasi hal ini adalah dengan amobilisasi enzim [9]. Amobilisasi enzim adalah suatu teknik dimana enzim ditempatkan pada suatu matriks sehingga dapat menahan aktivitas katalitik dari enzim tersebut [10]. Enzim dapat membentuk ikatan ionik, kovalen, ikatan silang atau terjebak pada bahan pendukung. Pada saat digunakan, enzim amobil dapat berfungsi sebagai katalis tanpa ikut terlarut dalam substrat [11]. Enzim yang telah diamobilkan mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan enzim bebasnya, seperti mengurangi biaya pemakaian enzim karena enzim dapat digunakan berkali-kali, memudahkan pemisahan enzim dari produk dan larutan dan dapat meningkatkan stabilitas enzim itu sendiri [12].

Kitosan dapat digunakan sebagai matriks karena mempunyai dua gugus aktif, yaitu gugus amino (-NH<sub>2</sub>) dan hidroksil (-OH) karena dengan adanya gugus aktif ini memungkinkan terjadi interaksi dengan enzim baik secara adsorpsi maupun penjebakan [13]. Penggunaannya paling luas dalam bidang medis dan biosensor, karena kemampuannya untuk berikatan secara adsorpsi fisik dengan enzim [14]. Kitosan sebagai media amobilisasi enzim dapat diubah strukturnya oleh adanya senyawa pengikat silang [13]. Salah satu agen pengikat silang adalah natrium tripolifosfat [15]. Dengan penambahan natrium tripolifosfat, ukuran pori dan porositas kitosan dapat berubah [16] sehingga akan mempengaruhi jumlah enzim yang tertahan pada matriks.

Pada penelitian sebelumnya, Enzim xilanase diisolasi dari *Trichoderma viride* yang dimurnikan dengan pengendapan bertingkat dan dialisis. Enzim xilanase hasil pemurnian disimpan pada suhu 30-70 °C selama 0-25 jam. Aktivitas enzim ditentukan dengan mereaksikan xilan 1% dengan enzim hasil pemurnian dan dianalisis menggunakan reagen DNS. Jumlah gula pereduksi yang dihasilkan dapat ditentukan dengan metode spektrofotometri. Hasil penelitian diperoleh xilanase masih stabil pada penyimpanan pada suhu 60° C dengan aktivitas enzim sisa pada penyimpanan 25 jam sebesar

59,02%. Semakin lama waktu penyimpanan maka aktivitas xilanase semakin menurun [17].

Pada penelitian ini dipelajari lebih lanjut mengenai Pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas xilanase hasil isolasi *Trichoderma viride* yang diamobilisasi pada kitosan-natrium tripolifosfat.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disampaikan maka dapat dirumuskan suatu perumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh suhu terhadap kestabilan aktivitas enzim xilanase hasil isolasi *Trichoderma viride* yang diamobilisasi dengan menggunakan kitosan natrium-tripolifosfat?
2. Bagaimana pengaruh lama penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas enzim xilanase hasil isolasi *Trichoderma viride* yang diamobilisasi dengan menggunakan kitosan natrium-tripolifosfat?
3. Berapakah efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil dengan kitosan-natrium tripolifosfat?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Substrat yang digunakan pada produksi xilanase dari *Trichoderma viride* adalah kulit pisang.
2. Enzim yang digunakan adalah ekstrak kasar xilanase hasil isolasi.

## 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh suhu terhadap kestabilan aktivitas enzim xilanase hasil isolasi *Trichoderma viride* yang diamobilisasi dengan menggunakan kitosan natrium-tripolifosfat.
2. Mengetahui pengaruh lama penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas enzim xilanase hasil isolasi *Trichoderma viride* yang diamobilkan dalam kitosan natrium-tripolifosfat.
3. Mengetahui efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil yang diamobilkan dalam kitosan-natrium tripolifosfat.

## 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah diketahuinya informasi tentang pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas enzim xilanase hasil isolasi dari *Trichoderma viride* yang diamobilisasi dengan menggunakan kitosan-natrium tripolifosfat sehingga diketahuinya suhu dan lama waktu penyimpanan terbaik dari xilanase, serta mengetahui efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil dengan kitosan-natrium tripolifosfat.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Enzim

Enzim merupakan molekul protein alami dengan kemampuan tinggi terutama dalam fungsinya sebagai katalis [1]. Kemampuan enzim dalam mengkatalisis reaksi kimia dipengaruhi kondisi lingkungan yang meliputi pH, suhu, waktu inkubasi, dan konsentrasi substrat [9]. Kerja enzim pada umumnya mempercepat reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasi [18]. Enzim merupakan protein yang memiliki sifat-sifat yang sangat khas seperti berat molekul, kondisi reaksi pada aktivitas optimum dan stabilitas enzim. [19].

Enzim bersifat spesifik terhadap substrat tertentu dan bekerja pada kisaran suhu tertentu . Setiap enzim memiliki suhu optimum, yaitu suhu dimana enzim memiliki aktivitas maksimal. Di bawah atau di atas suhu optimum maka aktivitasnya akan menurun. Suhu mendekati titik beku air tidak merusak enzim, tetapi enzim menjadi tidak aktif. Aktivitas enzim akan meningkat seiring dengan peningkatan suhu. Namun peningkatan suhu yang sangat besar akan menyebabkan enzim mengalami denaturasi [20]. Pada kondisi normal, struktur enzim aktif dijaga oleh keseimbangan gaya non-kovalen yang berlainan, yaitu ikatan hidrogen, hidrofobik, ionik, dan *Van der Walls*. Dengan naiknya suhu, semua gaya tersebut menurun dan molekul protein enzim akan terbuka [21]. Enzim xilanase yang dihasilkan dari *T. viride* stabil pada suhu <55°C, dan memiliki suhu optimum 50°C [22].

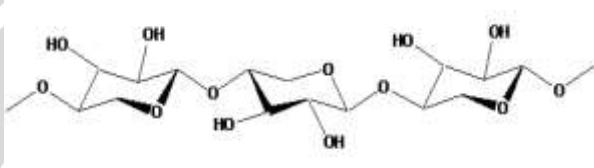
#### 2.2 Xilan

Xilan merupakan salah satu karbohidrat yang paling banyak di alam. Kandungan xilan dalam merang dan kulit pohon sebanyak 30 %, ampas tebu sebanyak 30 %, kayu konifera sebanyak 7-12% dan kayu pohon berdaun sebanyak 20-25 % [23].

Xilan atau bisa disebut sebagai hemiselulosa merupakan heteropolimer polisakarida yang keberadaannya terbanyak kedua setelah selulosa [24]. Hemiselulosa merupakan polimer xilosa dengan jumlah monomer 150-200 unit [4]. Hemiselulosa berfungsi

sebagai bahan pendukung dalam dinding sel. Hemiselulosa relatif mudah dihidrolisis oleh asam menjadi D-sylosa [25].

Xilan dapat berinteraksi baik secara kovalen atau non kovalen dengan lignin, selulosa, dan polimer lainnya [26]. Rantai xilan bercabang dan strukturnya tidak berbentuk kristal sehingga mudah dimasuki pelarut dibandingkan dengan selulosa [27]. Xilan cukup stabil hingga suhu 180°C. Struktur bangun xilan dapat dilihat pada Gambar 2.1 [23]:



Gambar 2.1. Struktur Molekul Xilan [23]

### 2.3 Kulit Pisang

Kulit pisang merupakan bahan buangan (limbah buah pisang) yang cukup banyak jumlahnya, yaitu kira-kira 1/3 dari buah pisang yang belum dikupas. Pada umumnya kulit pisang belum dimanfaatkan secara nyata, hanya dibuang sebagai sampah [28]. Kulit pisang mengandung serat yang cukup tinggi, vitamin C, B, kalsium, protein, dan karbohidrat. Kulit pisang dapat dijadikan sebagai media fermentasi mikroorganisme *Trichoderma viride* untuk menghasilkan enzim xilanase. Hal tersebut dikarenakan didalam kulit pisang mengandung substrat yang berupa xilan [23]. Macam-macam kulit pisang yang mudah ditemui yaitu varietas *Musca paradisiaca* var Sapientum (pisang raja), dan *Musca paradisiacal* var Typica (pisang nangka/kepok) [29]. Berikut analisis kimiawi dari kulit pisang yang ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Kandungan selulosa dan hemiselulosa dalam kulit pisang muda lebih tinggi dari kulit pisang yang telah tua. Hal ini dikarenakan kandungan selulosa dan hemiselulosa dalam kulit yang dalam proses penuaan diubah menjadi zat pati [30].

**Tabel 2.1 Komposisi kimiawi substrat kulit pisang [29]:**

Analisis	K.Pisang nangka (%)	K.Pisang Kepok (%)	K.Pisang raja (%)
Kadar air	11,07	11,09	11,46
Kadar abu	5,54	4,82	5,74
Kadar lemak	11,58	16,47	19,2
Kadar protein	9,87	5,92	7,29
Kadar serat kasar	14,61	20,96	19,49
Kadar NFE (karbohidrat)	47,33	40,74	36,82
	100	100	100
Kadar selulosa	17,36	14,04	13,53
Kadar Hemiselulosa	7,06	7,41	7,59
Kadar lignin	20,9	33,79	32,24

\*berdasarkan berat basah

## 2.4 Enzim Xilanase

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan menjadi xilosa [5]. Secara umum xilanase dikelompokkan menjadi tiga macam yaitu enzim  $\beta$ -xylosidase, eksoxilanase dan endoxilanase [31].

Berdasarkan pembentukannya, xilanase merupakan enzim induktif yaitu enzim yang dibentuk setelah ada substrat yang berfungsi sebagai induser [32]. Xilanase dapat diproduksi oleh beberapa organisme seperti bakteri, alga, jamur, ragi, protozoa, gastropoda dan artropoda [33]. Mikroorganisme penghasil enzim xilanase ditunjukkan pada Tabel 2.2 [4].

Setiap enzim memiliki suhu optimum, yaitu suhu dimana enzim memiliki aktivitas maksimal. Di bawah atau di atas suhu optimum maka aktivitasnya akan menurun. Suhu mendekati titik beku air tidak merusak enzim, tetapi enzim menjadi tidak aktif. Aktivitas enzim akan meningkat seiring dengan peningkatan suhu. Namun peningkatan suhu yang sangat besar akan menyebabkan enzim mengalami denaturasi [34]. Xilanase murni memiliki kondisi optimum pada pH 4,5 dan suhu 50°C [27]. Pada suhu 60°C dengan pH normal xilanase diketahui lebih stabil [26].

**Tabel 2.2 Mikroorganisme penghasil enzim xilanase[4]**

Mikroorganisme	Suhu tumbuh (°C)	Suhu optimum (°C)	pH	Berat molekul (kDa)
<b>Jamur</b>				
<i>Aspergillus sp.</i>	24-30	45-50	4,5-6	22-45,5
<i>Aureobasidium sp.</i>	28	45-54	4,5-4,8	20-25,0
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	28	70	5,5	30
<i>Cryptococcus flavus</i>	20	55	4,5	25
<i>Fusarium oxysporum</i>	26	50	5	80
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	22	80	4	39
<i>Humicola grisea</i>	40	70	5,5	25,5
<i>Myrothecium verrucaria</i>	30	45	5,5	15,9
<i>Neurospora crassa</i>	28	50	4,8	33
<i>Penicillium sp.</i>	25	40	6	35
<i>Trichoderma sp</i>	25-30	50-60	3,5-6,5	1,8-32
<b>Bakteri</b>				
<i>Aeromonas sp.</i>	30	30-55	5,0-7	22-58,0
<i>Bacillus sp.</i>	37-50	50-70	6,0-10,0	16-43
<i>Clostridium sp.</i>	37-65	50-75	5,5-7,0	29-72,0
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	37	39	7	53,7
<i>Streptomyces sp.</i>	36-50	50-72	4,5-8,0	21-50
<i>Thermoanaerobacterium</i>	60	80	6,2	24-350
<i>Thermomonospora curvata</i>	55	75	6,8-7,8	15-36,0
<i>Thermotoga sp.</i>	77-80	80-105	5,4-6,2	40-120

## 2.5 *Trichoderma Viride*

*Trichoderma viride* adalah salah satu kapang tanah dan banyak ditemukan pada kulit pohon, aktif dalam proses ammonifikasi dan dekomposisi selulosa dan hemiselulosa [34]. *Trichoderma viride* dapat tumbuh optimal pada suhu 32-35°C serta pH sekitar 4 [35].

Saat ini, *Trichoderma viride* merupakan salah satu mikroorganisme fungsional yang dikenal luas sebagai pupuk biologis tanah. Biakan murni dapat dibuat melalui isolasi dari perakaran tanaman, serta dapat diperbanyak dan diremajakan kembali pada media PDA (*Potatoes Dextrose Agar*) [36]. Dalam media agar, koloni *Trichoderma viride* mempunyai permukaan yang halus berwarna putih bening, kemudian koloni menjadi berkas-berkas yang rapat berwarna hijau atau putih [37].

Keunggulan *Trichoderma viride* yaitu mudah berkembang biak, tidak menimbulkan residu kimia berbahaya, mampu menghasilkan enzim [38]. Taksonomi *Trichoderma viride* [39]:

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Subdivision	: Pezizomycotina
Class	: Sordariomycetes
Subclass	: Hypocreomycetidae
Order	: Hypocreales
Family	: Hypocreaceae
Genus	: <i>Trichoderma</i>
Spesies	: <i>Trichoderma viride</i>

## 2.6 Isolasi Enzim

Pemisahan partikel dari larutan dengan metode sentrifugasi merupakan operasi utama dalam isolasi enzim. Hal ini termasuk pemisahan sel-sel dari medium biakan, pemisahan atau penghancuran sel dan pengumpulan presipitat, dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan enzim dari sisa sel yang telah hancur dengan tujuan untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim. Isolasi enzim dilakukan pada suhu rendah dan campuran ditambah larutan penyanga atau buffer untuk mempertahankan kestabilan pH enzim. Enzim akan berada pada lapisan air (supernatan) [40].

Pemisahan partikel dari larutan dengan cara sentrifugasi dilakukan pada suhu 4°C untuk mencegah kerusakan enzim. [41]. Pemisahan partikel dari larutan tidak hanya dengan metode sentrifugasi, dapat juga menggunakan metode lain seperti ekstraksi, presipitasi, koagulasi, filtrasi dan kromatografi. Enzim dapat diisolasi dari hewan, tanaman maupun mikroorganisme [37].

Isolasi xilanase dilakukan pada saat kapang *Trichoderma viride* mencapai awal fase stasioner [32], dimana fase stasioner adalah waktu optimum untuk produksi xilanase dari *Trichoderma viride*.

## 2.7 Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim adalah suatu metode dimana enzim tertahan secara fisik maupun kimia pada suatu fasa padat atau tergabung dalam suatu gel [42]. Enzim amobil memiliki sifat yang lebih stabil dan dapat digunakan berulang kali sehingga lebih sering diaplikasikan dalam suatu industri karena lebih ekonomis [43]. Enzim yang teramobilisasi didefinisikan sebagai enzim yang secara spesifik berada dalam suatu matriks namun tetap memiliki aktivitas katalitiknya serta dapat digunakan secara berulang atau terus-menerus [44].

Metode amobilisasi terbagi atas tiga kelompok yaitu metode pengikatan pada penyangga (*carrier binding*), metode pengikatan silang (*crosslinking*) dan metode penjeratan (*entrapping*) [45]:

### 1. Metode Pengikatan pada Penyangga (*carrier binding*).

Pada metode *carrier binding*, enzim diikat pada matriks yang tidak larut dalam air. Terdapat tiga jenis metode pengikatan pada penyangga (*carrier binding*) yaitu:

#### a. Adsorpsi fisik

Pada metode adsorpsi fisik ini, enzim diadsorpsi pada permukaan matriks. Metode ini mudah untuk dilakukan, ekonomis, dapat diregenerasi dan pada kondisi lunak aktivitas enzim tetap tinggi. Akan tetapi, kelemahan dari metode ini adalah kekuatan ikatan lemah, pH atau kekuatan ikatan ion dapat berubah dan enzim dapat dirusak oleh enzim proteolitik.

#### b. Ikatan ionik

Pada metode ini, terjadi ikatan ionik antara enzim dengan matriks yang tidak dapat larut dalam air dan mengandung residu penukar ion sehingga terjadi interaksi antara ion ammonium pada matriks yang bermuatan positif dengan gugus karboksil pada enzim yang bermuatan negatif.



**Gambar 2.2: Ikatan ionik antara enzim dan matriks**

c. Ikatan kovalen

Pada metode ini, terbentuk ikatan kovalen antara enzim dengan matriks yang tidak larut dalam air. Ikatan yang terbentuk merupakan ikatan yang kuat tetapi jika konformasi berubah maka akan menyebabkan hilangnya aktivitas enzim.



**Gambar 2.3: Ikatan kovalen antara enzim dan matriks**

2. Metode Pengikatan Silang (*crosslinking*)

Metode ini didasarkan atas pembentukan ikatan kimia, seperti pada metode ikatan kovalen, tetapi tidak menggunakan matriks yang tidak larut. Amobilisasi enzim terjadi melalui komponen bi- atau multifungsional. Sebagai komponen pengikat dapat digunakan glutaraldeida, turunan bis-isosianat, bis-diazobenzidin, dan lain-lain.

3. Metode Penjeratan (*entrapping*)

Metode penjeratan (*entrapping*) merupakan metode penjeratan enzim secara langsung ke dalam matriks polimer atau dibungkus dalam membran semipermeabel dengan erat sehingga enzim menjadi tidak bebas dan menjalankan fungsi katalitiknya di dalam kisi-kisi polimer tersebut. Pada metode ini, enzim diperangkap secara fisik bukan kimiawi sehingga penurunan aktivitas enzim lebih kecil dibandingkan pengikatan secara kimia. Sarana penempatan enzim dapat berbentuk gel, bentuk serabut kapiler atau suatu mikrokapsul. Metode penjeratan terbagi atas dua jenis, yaitu:

b. Kisi

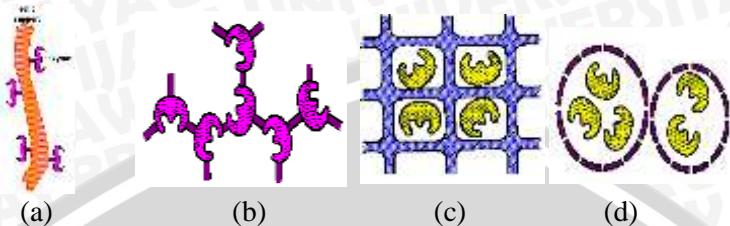
Pada tipe kisi, enzim dicampur dengan larutan polimer pada konsentrasi tertentu. Campuran diteteskan ke dalam larutan ion atau pelarut organik tergantung jenis polimernya. Tingkat porositas dan efektivitas metode amobilisasi tergantung pada konsentrasi polimer, ion logam penangkap dan konsentrasi enzim sendiri. Amobilisasi enzim dengan polianion berupa Na-Alginat paling banyak disukai karena murah dan mudah dilakukan amobilisasi pada suhu kamar dengan menggunakan larutan  $\text{CaCl}_2$  sebagai ion penetrant dan diperoleh xilanase amobil yang terperangkap dalam padatan Ca-Alginat. Komponen Ca penting dalam mempertahankan struktur padatan. Jika Ca terlarut oleh senyawa pengkelat atau digantikan oleh kation lain seperti  $\text{Mg}^{2+}$  atau  $\text{K}^+$ , struktur enzim amobil akan pecah atau rusak.

a. Mikrokapsul

Pada tipe mikrokapsul, enzim dibuat amobil dalam bentuk kapsul berukuran mikro yang dibuat dari polimer organik. Membran kapsul dibuat permiable terhadap substrat maupun produk terbatas pada enzim dengan substrat yang berukuran kecil. Polimer yang digunakan untuk membuat kapsul adalah nitroselulosa, polistiren dan polivinil asetat. Polimer dilarutkan di dalam pelarut organik kemudian diendapkan dengan pelarut lain yang tidak dapat bercampur dengan pelarut organik tersebut.

Enzim teramobilisasi memiliki banyak manfaat, diantaranya adalah [46]:

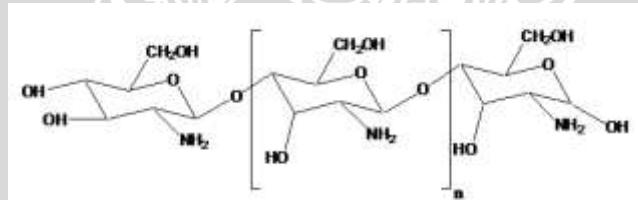
1. Dapat digunakan kembali selama enzim masih aktif
2. Dapat menjaga aktivitas enzim dari kondisi yang tidak baik
3. Pemisahan dan pembentukan kembali enzim mudah karena enzim terpisah dari produk
4. Aplikasi dari amobilisasi enzim dalam dunia industri dapat menurunkan biaya operasi



**Gambar 2.4:** Metode amobilisasi enzim (a) *carrier binding*, (b) ikatan silang, (c) penjeratan tipe kisi dan (d) penjeratan tipe mikrokapsul [45]

## 2.8 Kitosan

Kitosan merupakan biopolimer alami yang paling melimpah di alam setelah selulosa, diekstrak dari cangkang *crustacea* dengan cara deasetilasi gugusasetamida dengan menggunakan larutan alkali kuat [48,49]. Kitosan merupakan polisakarida linear, yang tersusun atas unit glukosamina dan N-asetil glukosamina yang dihubungkan melalui ikatan  $\beta(1\text{-}4)$  glikosidik seperti pada Gambar 2.5. Senyawa ini dihasilkan melalui proses deasetilasi kitin di bawah kondisi alkali [49].



**Gambar 2.5:** Struktur kitosan[49]

Kitosan telah banyak digunakan untuk berbagai bentuk seperti serbuk, membran, serat, dan materi berpori yang telah diuji untuk banyak aplikasi medis dan biologis [50]. Kitosan mempunyai dua gugus aktif, yaitu gugus amino ( $-\text{NH}_2$ ) dan hidroksil ( $-\text{OH}$ ) sehingga dengan adanya gugus aktif ini memungkinkan terjadi interaksi dengan enzim baik secara adsorpsi maupun penjebakan. Kitosan bersifat tidak beracun, sangat hidrofilik dan mempunyai kemampuan untuk membentuk film, senyawaini bersifat polar dan dapat larut dalam asam organik. Struktur kitosan dapat di modifikasi dengan mudah karena adanya gugus amino bebas [53,54]. Dalam larutan asam, gugus amino bebas pada molekul kitosan akan

terprotonasi dengan mudah menjadi  $\text{-NH}_3^+$  dan dapat berinteraksi membentuk suatu ikatan silang dengan molekul bermuatan negatif, misalnya glutaraldehid & natrium tripolifosfat [53]. Salah satu agen pengikat silang adalah natrium tripolifosfat [15]. Dengan penambahan natrium tripolifosfat, ukuran pori dan porositas kitosan dapat berubah [16] sehingga akan mempengaruhi jumlah enzim yang tertahan pada matriks.

## 2.9 Kestabilan Enzim

Kestabilan suatu enzim dapat dilihat dari grafik aktivitas sisa dengan waktu inkubasi, dimana enzim dinyatakan stabil bila masih mampu mempertahankan aktivitas sisanya sampai 50% dan tidak terjadi penurunan secara drastis selama masa inkubasi [54]. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti:

### 1. Pengaruh suhu

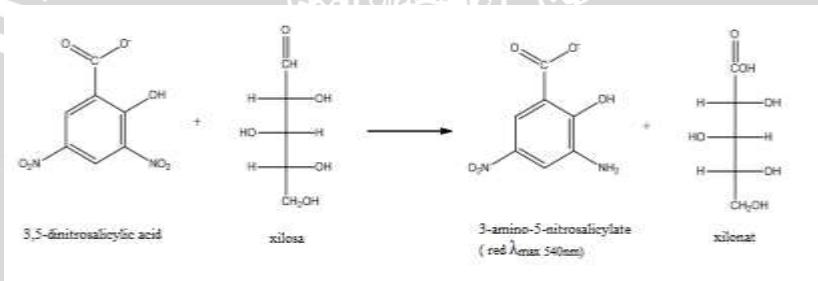
Enzim mempercepat terjadinya reaksi kimia pada suatu sel hidup. Dalam batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan naik bila suhunya naik. Reaksi paling cepat terjadi pada suhu optimum [55]. Oleh karena itu, penentuan suhu optimum aktivitas enzim sangat perlu karena apabila suhu terlalu rendah maka kestabilan enzim tinggi tetapi aktivitasnya rendah, sedangkan pada suhu tinggi aktivitas enzim tinggi tetapi kestabilannya rendah [56]. Namun, kecepatannya akan menurun drastis pada suhu yang lebih tinggi. Hilangnya aktivitas pada suhu tinggi karena terjadinya perubahan konformasi enzim (denaturasi) enzim. Kebanyakan enzim tidak aktif pada suhu sekitar 55-60°C [57]. Dalam beberapa keadaan, jika pemanaasan di hentikan dan enzim di dinginkan kembali aktivitasnya akan pulih. Hal ini disebabkan oleh karena proses denaturasi masih reversible.

### 2. Pengaruh pH

Enzim pada umumnya bersifat amfолитik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya, diperkirakan akan terjadi perubahan kereaktifan enzim akibat perubahan pH lingkungan. Enzim mempunyai aktivitas maksimum pada kisaran pH yang disebut pH optimum [58].

## 2.10 Penentuan Aktivitas Xilanase

Pengukuran aktivitas xilanase dianalisis menggunakan reagen DNS (asam 3,5 dinitrosalisilat) dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Prinsip pengukuran aktivitas enzim dengan metode spektrofotometri UV-Vis menggunakan reagen DNS. DNS adalah gula pereduksi hasil hidrolisis enzim akan mereduksi asam dinitrosalisilat dan membentuk kompleks warna merah kecoklatan sebagai kompleks warna dari asam-3-amino-5-nitrosalisilat dalam suasana basa sedangkan xilosa akan teroksidasi menjadi asam xilonat. 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 dapat dilihat pada Gambar 2.6 [59].



Gambar 2.6 : Reaksi DNS dan xilosa [60]

### BAB III

## METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang, bulan Februari - April 2014.

### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur murni kapang *Trichoderma viride* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang.

#### 3.2.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini memiliki derajat kemurnian pro analisa (pa) dan *for microbiology*. Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas *for microbiology* antara lain *bacto agar*, pepton (*Oxoide*), kasein, dan *yeast extract* (Difco). Bahan kimia lain yang digunakan memiliki kualitas pro analisis antara lain  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , DNS,  $\text{NaOH}$  10%,  $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  3%,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  100% (Bj : 1,05 g/Ml),  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (BM: 82,02 g/mol) dan  $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4)_n$  3%, serta bahan lainnya adalah kulit pisang dan akuades.

#### 3.2.3 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, jarum ose, pengaduk magnet, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), inkubator (Heraeus Type B 5042), pH meter (Inolab WTW), penangas air (Wemmert W 200), oven, kapas steril, autoklaf (All, American Model 20X), shaker (Edmund Buhler SM 25 24B), sentrifugase dingin (Juan MR 1889), pemanas listrik (Janke-Kunkel), dan Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu Model 160A double beam), *refrigerator*, aluminium foil, kertas saring *Whatman* No. 40, *syringe*.

### **3.3 Tahapan Penelitian**

Tahapan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan Substrat dari kulit pisang
2. Pembuatan media padat
3. Peremajaan biakan *Trichoderma viride*
4. Pembuatan media cair
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase
7. Pembuatan kurva baku gula pereduksi
8. Uji kadar protein awal
9. Uji aktivitas xilanase bebas
10. Preparasi matriks kitosan
11. Amobilisasi xilanase
12. Uji kadar protein sisa
13. Inkubasi xilanase amobil pada variasi suhu dan lama penyimpanan
14. Uji aktivitas xilanase amobil pada variasi suhu dan lama penyimpanan
15. Perhitungan aktivitas sisa setelah inkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan
16. Penentuan efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil
17. Analisa Data

### **3.4. Prosedur Kerja**

#### **3.4.1 Pembuatan Substrat Kulit Pisang**

Substrat xilan dibuat dari kulit pisang. Kulit pisang dipotong kecil-kecil, dicuci dan dikeringkan selama 3 hari. Setelah itu, kulit pisang kering diblender dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh. Kulit pisang yang lolos dari ayakan tersebut digunakan sebagai induser. Cari mekanisme induser dlm menginduksi biosintesis enzim.

#### **3.4.2. Pembuatan Media Padat**

Media padat yang digunakan untuk peremajaan bakteri *Trichoderma Viridae* adalah *Potatoes Dextrose Agar* (PDA). Pembuatan media padat PDA adalah 20 gram kentang dikupas, dicuci, dan diiris kecil-kecil. Kemudian, ditambahkan akuades hingga 100 mL dan dipanaskan hingga mendidih selama 1 jam. Selama dipanaskan, sesekali ditambahkan akuades agar volumenya

tetap 100 mL. Lalu, disaring menggunakan kertas saring dan sari kentang yang diperoleh ditambahkan 2 gram dextrosa, 1 mL buffer asetat pH 5, dan 1,5 gram tepung agar. Setelah itu, dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk. Kemudian, larutan PDA tersebut dipipet sebanyak 4 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas, dilapisi kertas coklat dan diikat dengan karet. Larutan PDA diautoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. PDA yang telah steril dikeluarkan dari autoklaf dan dinginkan pada suhu ruang dengan posisi miring.

#### **3.4.3. Peremajaan biakan *Trichoderma viride***

Biakan murni *Trichoderma viride* diremajakan dalam media padat agar miring dengan cara menggoreskan jarum ose yang mengandung *Trichoderma viride* dengan mendekatkan mulut tabung pada nyala api saat menggoreskan jarum agar tetap dalam keadaan steril. Tabung ditutup kembali dengan kapas steril dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 144 jam yang akan dihasilkan sub kultur biakan murni.

#### **3.4.4 Pembuatan media cair**

Media pertumbuhan *Trichoderma viride* untuk menghasilkan enzim xilanase adalah 0,25 g pepton; 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,15 g  $\text{CaCl}_2$ ; 0,5 mL asam oleat; 0,7 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,15 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan 2,5 g serbuk kulit pisang ditimbang menggunakan neraca analitik mettler. Kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL, ditambahkan akuades hingga 100 mL. Kemudian diatur pada pH 5 dengan penambahan buffer asetat pH 5. Campuran ini diaduk dan dipanaskan hingga mendidih, dimasukkan dalam erlenmeyer, lalu ditutup dengan kapas dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 15 psi.

#### **3.4.5 Pembuatan inokulum**

Pembuatan inokulum dilakukan dengan mengambil spora dari biakan murni *Trichoderma viride* yang telah berumur 6 hari, kemudian disuspensikan dalam 10 mL akuades steril. Hasil suspensi diambil sebanyak 2 mL dan ditanam dalam erlenmeyer yang berisi 13 mL media cair steril. Selanjutnya media tersebut diinkubasi dalam shaker hingga mencapai pertengahan fase logaritma (jam ke-36) dan

dilanjutkan dengan produksi enzim.

#### **3.4.6. Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase**

Erlenmeyer 250 mL yang telah berisi 100 mL media cair steril ditambahkan 10 mL larutan inokulum secara aseptis yang dilakukan di dalam laminar air flow dan diinkubasi pada suhu kamar selama 60 jam menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Selanjutnya, ditambahkan buffer asetat pH 5 sebanyak 30 mL. Kemudian media pertumbuhan ini disentrifugasi dingin dengan kecepatan putar 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim xilanase.

#### **3.4.7. Pembuatan kurva standar gula pereduksi**

Disediakan lima buah labu ukur 10 mL, masing-masing diisi dengan larutan stok glukosa 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak (2; 4; 6; 8; 8) mL, kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan (300, 600, 900, 1000, 1200)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Setiap konsentrasi larutan glukosa diambil 1 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5 dan ditambahkan 2 mL reagen DNS, kemudian dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit dan didinginkan dengan air mengalir. Larutan campuran dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan glukosa (12, 24, 36, 40, dan 48)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Kemudian larutan standar diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum glukosa dan kurva baku dibuat dengan memplotkan data konsentrasi glukosa (ppm) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

#### **3.4.8 Penentuan panjang gelombang maksimum**

Larutan standar glukosa 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 1 mL kedalam tabung reaksi, tambahkan 1 mL akuades, 1mL buffer asetat pH 5.Ditambahkan reagen DNS sebanyak 2 mL. Setelah itu dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit, didinginkan dengan air mengalir,Kemudian larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 480 - 550 nm dengan blanko yang berisi akuades dan reagen DNS.

### **3.4.9 Uji Kadar protein awal**

Penentuan kadar xilanase dilakukan dengan reagen Biuret. Sebanyak 2 mL larutan ekstrak kasar ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm dan 2 mL buffer asetat pH 5, kemudian dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50 °C. Didinginkan pada suhu ruang dan selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum kasein yaitu 540 nm sehingga kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein. Sebagai blanko dipipet 2 mL akuades, 8 mL reagen Biuret, 2 mL larutan kasein 5000 ppm dan 2 mL buffer asetat pH 5 selanjutnya diperlakukan sama seperti di atas.

### **3.4.10 Uji aktivitas xilanase bebas**

Penentuan aktivitas xilanase dilakukan dengan cara mengukur jumlah senyawa pereduksi yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis substrat xilan. Larutan uji terdiri dari 1 mL substrat xilan 1%, 1 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL ekstrak kasar xilanase serta 1 mL akuades. Campuran ini diinkubasi pada 60 °C selama 50 menit. Kemudian ditambahkan 2 mL reagen DNS yang selanjutnya dipanaskan selama 15 menit pada suhu 100 °C lalu didinginkan hingga suhu kamar. Larutan diencerkan dalam labu takar 25 mL. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 490 nm. Satu unit aktivitas enzim bebas (U) diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per menitnya tiap mL enzim.

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai abosrbansi yang diperoleh, pada persamaan kurva standar sehingga dapat diketahui berapa konsentrasi gula pereduksi yang diperoleh dari hasil hidrolisis xilan yang dikatalis enzim xilanase. Untuk melihat besarnya satu unit aktivitas enzim tersebut digunakan rumus:

$$\Delta E = \frac{x.V.fp}{p.q} \times \frac{Mr.Xilos\alpha}{Mr.Glukosa}$$

dimana :

- |            |                                                                       |
|------------|-----------------------------------------------------------------------|
| $\Delta E$ | = Aktivitas enzim (unit ( $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{menit}$ )) |
| V          | = Volume sampel tiap tabung (mL)                                      |
| p          | = Jumlah enzim (mL)                                                   |
| q          | = Waktu reaksi (menit)                                                |
| fp         | = Faktor pengenceran                                                  |

### **3.4.11 Preparasi matriks kitosan**

Sebanyak 2 g bubuk kitosan ditimbang dan dilarutkan di dalam 80 mL larutan asam asetat 3% (w/v), kemudian diaduk dengan pengaduk magnetik hingga homogen (berbentuk larutan) pada suhu kamar.

### **3.4.12 Amobilisasi xilanase dengan kitosan-natrium tripolifosfat**

Amobilisasi enzim dilakukan dengan cara mencampurkan 20 ml ekstrak kasar xilanase dengan 80 mL kitosan yang telah dipreparasi. Larutan campuran masing-masing dimasukkan ke dalam syringe dan ditekan sehingga campuran menetes ke dalam wadah berisi 100-200 mL larutan natrium tripolifosfat 3%. Manik-manik yang terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan natrium tripolifosfat 3% selama 75 menit. Enzim amobil dengan larutan dipisahkan melalui penyaringan menggunakan kertas saring *Whatman* No. 40. Filtrat yang didapat diuji kadar protein sisanya dan xilanase amobil yang didapat diuji aktivitasnya dan dilanjutkan untuk penentuan kestabilan aktivitas enzim amobil berdasarkan pengaruh suhu dan lama penyimpanan.

### **3.4.13 Uji kadar protein sisa**

Kadar xilanase yang tidak terjebak ditentukan dengan cara 2 mL filtrat dari enzim yang tidak teramobilkan ditambah dengan 2 mL larutan kasein 5000 ppm dan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer asetat 0,2 M pH 5, kemudian dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50 °C. Didinginkan pada suhu ruang dan setelah itu larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum kasein yaitu 554 nm sehingga kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein.

### **3.4.14 Penentuan kestabilan aktivitas enzim amobil berdasarkan pengaruh suhu dan lama penyimpanan**

Xilanase hasil amobil ditimbang sebanyak 0,3 g dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi ukuran 5 mL dan tutup tabung di tutup dengan alumunium foil. Kemudian tabung raksi diinkubasi di dalam oven dengan variasi suhu reffrigerator, 30, 40, 50, 60, dan 70 °C. Pada lama penyimpanan 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 7 hari, enzim di

uji aktivitasnya dengan menambahkan substrat xilan sebanyak 1 mL, buffer asetat pH 5 sebanyak 5 mL, akuades 1 mL, diinkubasi pada suhu 60 °C selama 50 menit, kemudian Ditambahkan 2 mL reagen DNS, dimasukkan kedalam penangas air mendidih selama 15 menit didinginkan dan dipindahkan kedalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Sampel dapat diukur kadar gula pereduksinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

### **3.4.15 Penentuan Aktivitas Enzim Sisa Xilanase**

Aktivitas enzim sisa xilanase ditentukan dengan cara mencari persentase hasil bagi aktivitas enzim setelah perlakuan dan sebelum perlakuan, yaitu sebagai berikut :

$$\% \text{ Aktivitas Sisa} = \frac{\text{Aktivitas Enzim setelah Penyimpanan}}{\text{Aktivitas Enzim sebelum Penyimpanan}} \times 100\%$$

### **3.4.16 Penentuan efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil**

Efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil pada kondisi optimum yaitu 50 °C, dilakukan pada pH 5, suhu 60 °C dan lama waktu inkubasi 50 menit. Xilanase amobil dimasukkan ke dalam larutan uji pertama kemudian dipisahkan dengan cara disaring dan langsung dimasukkan ke dalam larutan uji yang baru untuk diproses berikutnya dengan kondisi yang sama. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan air mendidih selama 15 menit. Larutan didinginkan pada suhu kamar kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Perlakuan ini diulangi sebanyak lima kali dan dihitung aktivitas enzim pada setiap pengulangan.

### **3.4.17 Analisa Data**

Data yang diperoleh dari perlakuan diatas yang berupa variasi pH dan suhu dianalisis dengan menggunakan metoda analisa rancangan acak lengkap (RAL). Jika terdapat perbedaan diantara perlakuan maka akan diuji lebih lanjut dengan uji beda nyata terkecil (BNT).

## BAB IV

### PEMBAHASAN

#### 4.1 Produksi dan Isolasi Enzim Xilanase dari *Trichoderma Viride*

Enzim xilanase bersifat induktif, sehingga untuk memperoleh produk yang maksimal, dibutuhkan suatu induser sebagai pemicu produksi enzim xilanase. Induser yang digunakan pada penelitian ini adalah substrat dari kulit pisang. Proses produksi xilanase dilakukan dengan menambahkan inokulum *Trichoderma viride* sebanyak 15 mL ke dalam media cair yang sudah ditambahkan induser dan diinkubasi selama 60 jam ( awal fase stasioner). Penambahan inokulum ke dalam media cair dilakukan secara aseptis, yaitu dilakukan di dalam laminar air flow. Kemudian ditambahkan buffer asetat 0,2 M pH 5 yang berfungsi untuk melarutkan enzim. Isolasi xilanase dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan enzim xilanase dari protein-protein lain. Enzim xilanase merupakan enzim ekstraseluler sehingga untuk memisahkan dari sel dapat dilakukan dengan proses sentrifugasi suhu rendah. Proses sentrifugasi dilakukan pada suhu 4°C dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan ekstrak kasar xilanase (supernatan) dan endapan. Prinsip sentrifugasi berdasarkan adanya gaya centrifugal pada partikel, dimana berat molekul yang lebih besar akan mengendap terlebih dahulu. Endapan merupakan sisa komponen-komponen media dan debris sel, sedangkan supernatan merupakan enzim ekstrak kasar yang terdiri dari protein enzim dan protein non enzim. Sentrifugasi dilakukan pada suhu yang rendah untuk mencegah denaturasi[61]. Hasil ekstrak kasar xilanase dapat dilihat dari Tabel 4.1

Enzim amobil mempunyai kadar protein yang lebih rendah daripada ekstrak kasar xilanase setelah dilakukan metode penjebakan dengan menggunakan matriks kitosan-natrium tripolifosfat. Menurunnya kadar protein tersebut dikarenakan banyaknya protein yang terjebak pada matriks. Sama halnya dengan kadar protein aktivitas dari enzim amobil lebih rendah daripada ekstrak kasar xilanase.

**Tabel 4.1 Perbandingan ekstrak kasar xilanase (enzim bebas) dan enzim amobil**

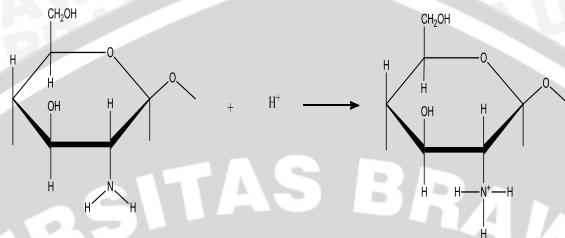
Xilanase	Kadar Protein (ppm)	Aktivitas Enzim ( $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{menit}$ )
Ekstrak Kasar (enzim bebas)	17.833	9.591
Enzim amobil	1.092	5.568

Menurunnya aktivitas tersebut di karenakan enzim amobil membutuhkan waktu inkubasi yang lebih untuk mencapai aktivitas maksimumnya dibanding enzim bebasnya. Pada enzim amobil terdapat efek tahanan difusi yang diakibatkan oleh adanya bahan pendukung, sehingga bertemuannya substrat dengan enzim memerlukan waktu yang lebih lama, karena substrat terlebih dahulu harus berdifusi masuk ke bagian dalam partikel enzim amobil, untuk kemudian membentuk produk [62]. Efek dari pembatasan difusi memberikan pengaruh yang besar terhadap kerja enzim dalam berikatan dengan substrat. Dalam amobilisasi enzim, enzim terjebak dalam matriks sehingga pori-pori dari matriks akan mempengaruhi substrat berdifusi ke dalam matriks untuk berikatan dengan enzim

## 4.2 Amobilisasi Xilanase menggunakan Kitosan-Natrium Tripolifosfat

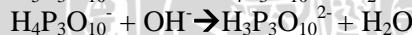
Pada penelitian ini, enzim xilanase diamobilkan dengan metode penjebakan dalam manik kitosan yang berikatan silang dengan natrium tripolifosfat. Pada metode ini, enzim amobil dibuat dengan cara mencampurkan enzim dengan kitosan yang telah di larutkan dalam asam asetat dan diteteskan ke dalam larutan natrium tripolifosfat 3% dengan menggunakan syringe. Pencampuran kitosan dengan enzim ini bertujuan agar kedua larutan tercampur secara homogen sedangkan penetesan larutan campuran menggunakan syringe bertujuan agar terbentuk manik – manik dengan ukuran yang kecil. Manik-manik yang terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan natrium tripolifosfat 3% selama 75 menit agar manik-manik mengeras. Kitosan bersifat kationik dalam lingkungan asam. Hal tersebut disebabkan kitosan memiliki gugus amino akan mengalami protonasi menjadi  $-\text{NH}_3^+$  (Gambar 4.1). Sifat kationik dari kitosan dapat berinteraksi dengan anion membentuk suatu ikatan silang

ionik. Natrium tripolifosfat merupakan polianion yang dapat membentuk ikatan silang dengan molekul kitosan melalui interaksi ionik.



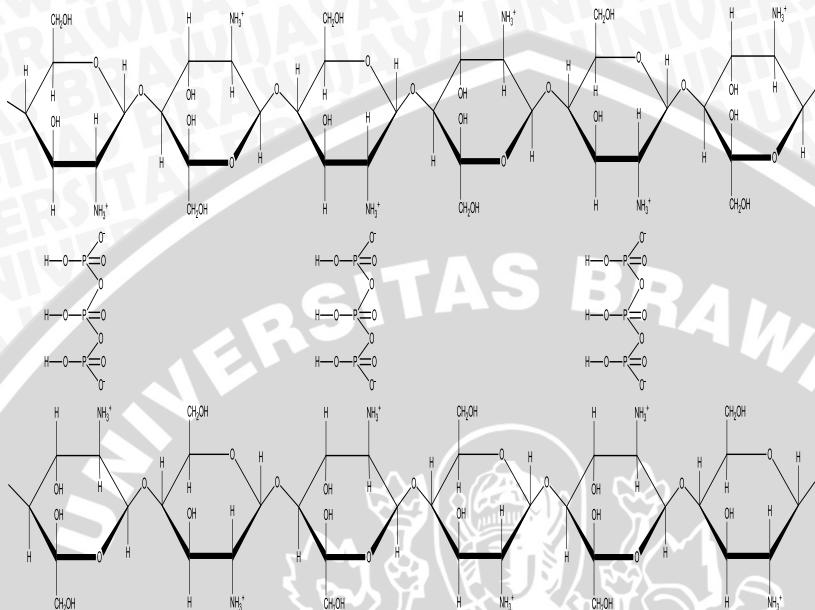
**Gambar 4.1: Reaksi protonasi kitosan dalam asam asetat**

Natrium tripolifosfat yang dilarutkan dalam akuades akan mengalami disosiasi menjadi H<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>2-</sup> (Gambar 4.2). Sehingga ikatan silang ini terbentuk karena adanya reaksi antara muatan positif pada kitosan -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> dengan muatan negatif pada natrium tripolifosfat (H<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>2-</sup>) (Gambar 4.3). Natrium tripolifosfat cukup aman digunakan sebagai agen pengikat silang pada proses modifikasi kitosan karena senyawa ini memiliki toksisitas yang rendah, tidak bersifat mutagenik maupun karsinogenik.



**Gambar 4.2: Reaksi disosiasi natrium tripolifosfat dalam air**

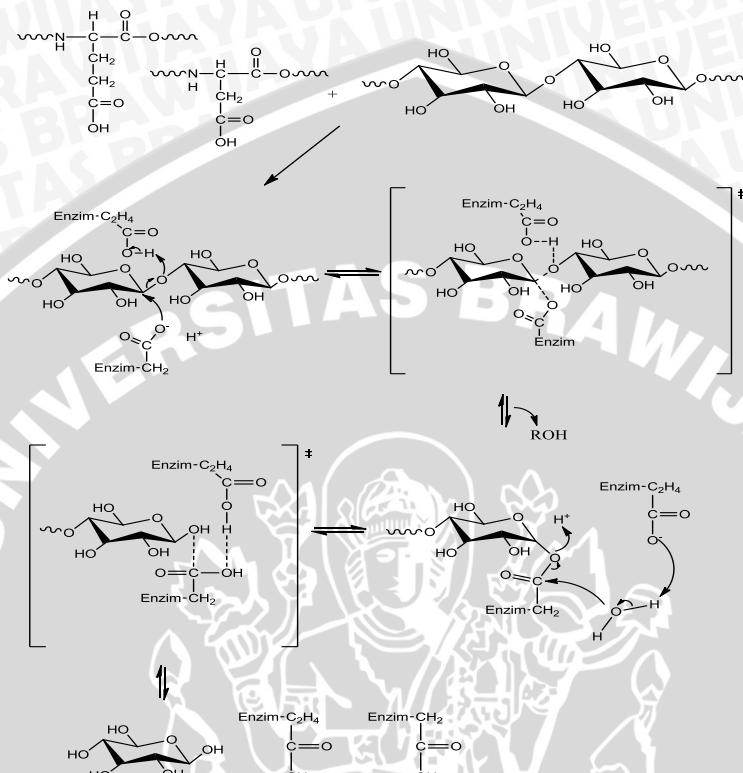
Keuntungan dari metode penjebakan adalah konformasi enzim yang tidak berubah karena tidak terjadi ikatan kimia antara enzim dengan gel, namun enzim yang tertahan masih dapat lolos akibat adanya difusi. Dalam metode ini masih terjadi kebocoran dan masalah difusi, sehingga aktivitas enzim yang diamobilisasi menjadi berkurang. Namun masalah tersebut dapat diatasi dengan cara mengurangi ukuran partikel, meningkatkan porositas dan mengoptimalkan distribusi enzim dalam *bead* [51].



**Gambar 4.3: Ikatan silang antara kitosan dan natrium tripolifosfat [63]**

#### 4.3 Penentuan Aktivitas Xilanase

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler, enzim ini dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa yang merupakan gula pereduksi. Aktivitas xilanase di definisikan sebagai jumlah gula pereduksi (xilosa) yang dihasilkan oleh xilanase permenit. Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit atau  $\mu\text{g}/\text{mL}$  menit. Aktivitas xilanase dapat ditentukan melalui gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis xilan oleh xilanase pada kondisi optimumnya. Gula pereduksi dianalisis menggunakan reagen DNS secara spektrofotometri. Gula pereduksi ini akan mereduksi asam dinitrosalisilat dan membentuk kompleks warna merah kecoklatan sebagai kompleks warna dari asam-3-amino-5-nitrosalisilat. Kompleks warna inilah yang kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Mekanisme reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa ditampilkan pada Gambar 4.4.



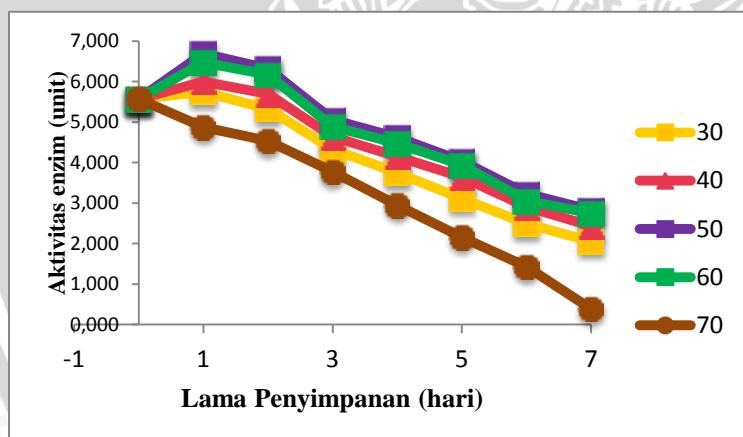
**Gambar 4.4 Mekanisme reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa[17]**

Mekanisme pembentukan gula pereduksi terjadi melalui pembentukan intermediet kompleks enzim-substrat (ES) yang terbentuk karena gugus fungsi  $-COOH$  dari rantai samping asam aspartat terionisasi lebih awal daripada asam glutamat. Ion karboksilat dari asam aspartat tersebut menyerang ikatan glikosidik yakni atom C<sub>1</sub> yang mengikat atom O pada polimer xilan. Adanya H<sup>+</sup> pada gugus  $-COOH$  dari rantai samping asam glutamat pada xilanase akan mempermudah penyerangan tersebut karena H<sup>+</sup> akan menerima pasangan elektron bebas atom O. Kemudian kompleks enzim-substrat (ES) dihidrolisis oleh H<sub>2</sub>O sehingga ikatannya terputus dan terbentuk produk yaitu gula pereduksi (xilosa). Dari

nilai konsentrasi gula pereduksi aktivitas enzim dapat ditentukan. Nilai aktivitas xilanase ditampilkan pada Lampiran E.3.3.

#### 4.4 Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Xilanase yang diamobilisasi menggunakan Kitosan-Natrium Tripolifosfat

Keuntungan metode amobilisasi yaitu bersifat stabil karena dapat digunakan berulang kali, serta dapat meningkatkan stabilitas. Kestabilan xilanase dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya pengaruh pH, waktu inkubasi, pengaruh suhu dan enzim protease. Pada penelitian ini dilakukan uji untuk mengetahui pengaruh suhu dan lama penyimpanan enzim terhadap kestabilan enzim xilanase hasil isolasi *Trichoderma viride* yang diamobilisasi menggunakan kitosan-natrium tripolifosfat dengan cara menyimpan ekstrak kasar yang telah diamobil menggunakan kitosan-natrium tripolifosfat pada variasi suhu 30, 40, 50, 60, dan 70°C. Pada waktu penyimpanan 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 7 hari xilanase ditentukan aktivitas enzimnya. Dari pecobaan diperoleh hasil seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Grafik pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap aktivitas enzim xilanase

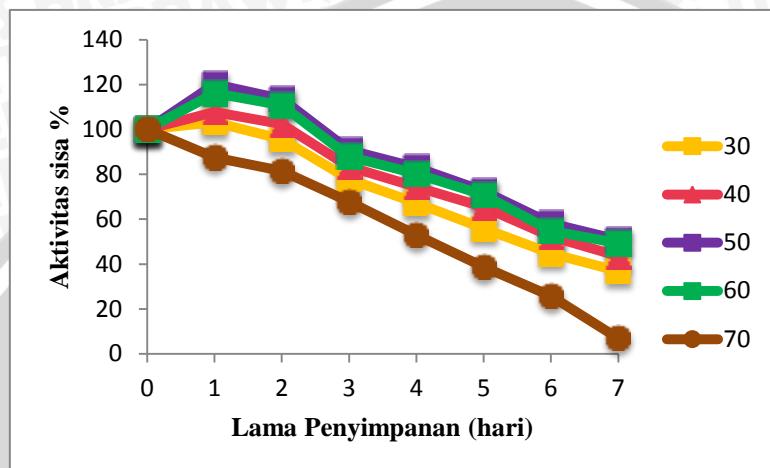
Dari Gambar 4.5 pada penyimpanan 1 hari terlihat bahwa aktivitas xilanase amobil pada suhu 30, 40, 50, dan 60°C naik, kemudian turun seiring dengan bertambahnya lama penyimpanan.

Sedangkan pada suhu 70°C aktivitas xilanase amobil mengalami penurunan dengan bertambahnya lama penyimpanan. Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama waktu penyimpanan, semakin banyak xilanase yang mengalami kerusakan atau perubahan konformasi enzim, akibat suhu, dan kemungkinan adanya kerja dari protease yang dihasilkan enzim xilanase dari *Trichoderma viride*. Protease merupakan enzim yang bekerja sebagai katalis dalam reaksi pemecahan molekul protein dengan cara hidrolisis, disebut juga enzim proteolitik. Mengingat enzim xilanase yang juga merupakan suatu protein, maka enzim xilanase akan terdegradasi oleh protease sehingga semakin aktif protease maka enzim xilanase mudah rusak dan mempengaruhi aktivitas enzim xilanase. Rusaknya enzim xilanase dapat disebabkan adanya pengaruh lingkungan seperti masih terdapatnya enzim protease yang dapat memecah protein. Aktivitas protease dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu, suhu, kosentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH, dan pengaruh inhibitor. Maka dapat disimpulkan dari penjelasan diatas dengan bertambahnya lama waktu penyimpanan enzim akan menyebabkan kerusakan atau perubahan konformasi dari enzim xilanase sehingga akan menyebabkan penurunan aktivitas karena enzim xilanase yang juga merupakan suatu protein yang terdegradasi oleh protease. Namun pada lama penyimpanan 1 hari pada suhu 30, 40, 50, 60°C terjadi kenaikan aktivitas enzim amobil dikarenakan pada penelitian ini menggunakan metode amobilisasi, dimana metode ini memiliki kelebihan salah satunya yaitu dapat menaikkan aktivitas enzim.

Pada pengaruh suhu, aktivitas enzim pada penyimpanan 50°C mempunyai aktivitas yang paling tinggi, dikarenakan pada suhu 50°C enzim xilanase tidak terdegradasi oleh protease. Protease yang dihasilkan oleh genus *Trichoderma* memiliki suhu optimum berkisar 35-40°C dan pada suhu diatas 50°C memiliki aktivitas protease yang rendah [64]. Pada suhu 70°C xilanase memiliki aktivitas enzim yang paling rendah dikarenakan pada suhu 70°C xilanase sudah mengalami denaturasi. Denaturasi tersebut dapat menyebabkan perubahan konformasi dari enzim sehingga jumlah substrat yang dapat diikat oleh sisi aktif dari enzim akan semakin berkurang sehingga aktivitas enzimnya akan menurun.

Kestabilan enzim xilanase dapat dilihat dari aktivitas enzim sisa dimana enzim dikatakan stabil bila aktivitas enzim sisanya lebih

dari 50% dari aktivitas awal enzim. Pada penelitian diperoleh aktivitas enzim sisa yang ditunjukkan pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Grafik % aktivitas enzim sisa xilanase amobil

Lama penyimpanan berpengaruh terhadap kestabilan xilanase. Semakin lama waktu penyimpanan maka aktivitas xilanase semakin menurun. Pada suhu 50°C enzim xilanase amobil stabil sampai hari ke-7 dengan aktivitas sisa 50,81%. Pada suhu 70°C stabil sampai hari ke-4 dengan aktivitas enzim sisa 57,22% dan 53,00%. Pada suhu 30°C xilanase amobil stabil sampai hari ke-5 dengan aktivitas enzim sisa 52,26%, sedangkan pada suhu 40 dan 60°C xilanase amobil stabil sampai hari ke-6 dengan aktivitas enzim sisa berturut-turut 58,10; dan 54,89%.

Berdasarkan hasil uji statistik diperoleh nilai F hitung  $(475,2) > F$  table  $(1,692)$ , sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan nyata dari perlakuan dengan suhu dan lama penyimpanan. Untuk uji BNT 5% juga menunjukkan adanya perbedaan yang nyata.

#### 4.5 Efisiensi pemakaian ulang Enzim Amobil

Salah satu kelebihan xilanase amobil yaitu dapat dipakai berulang, namun semakin sering xilanase amobil digunakan maka akan menurunkan aktivitasnya. Pemakaian xilanase amobil dapat diketahui dengan mengukur aktivitas. Pada penelitian ini, xilanase

diamobilkan pada kondisi optimum, yaitu pada suhu 50<sup>0</sup>C, dengan pemakaian berulang sebanyak lima kali. Hasil pemakaian berulang xilanase amobil terhadap nilai aktivitasnya dapat dilihat pada Tabel 4.2.

**Tabel 4.2: Efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil**

Pemakaian ke-	Aktivitas Rata-rata (unit)	Efisiensi (%)
1	32,801	100
2	29,997	91,45
3	23,534	71,75
4	19,501	59,48
5	16,462	50,19

Aktivitas xilanase pada pemakaian pertama yaitu 32,801 unit dan diasumsikan memiliki efisiensi sebesar 100%. Aktivitas xilanase terus mengalami penurunan pada pemakaian ke dua hingga ke lima (Tabel 4.3). Pemakaian ulang xilanase amobil berpengaruh nyata terhadap efisiensi aktivitas xilanase amobil, hal ini didukung hasil nilai Fhitung>Ftabel (taraf nyata  $\alpha = 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa pemakaian berulang xilanase amobil berpengaruh terhadap efisiensi aktivitas xilanase amobil. Penurunan aktivitas xilanase amobil ini dimungkinkan karena rusaknya pori yang terbentuk akibat pemakaian berulang-ulang. Rusaknya pori ini menyebabkan xilanase yang awalnya terjebak dapat terlepas sehingga xilanase yang masih ada semakin sedikit untuk berikatan dengan substrat. Dari hasil efisiensi penggunaan xilanase amobil didapatkan bahwa aktivitas setelah lima kali pengulangan sebesar 50,19% dengan aktivitas enzim sebanyak 16,462 unit, sehingga xilanase dapat digunakan sebanyak lima kali pengulangan karena aktivitas masih di atas 50%, karena suatu enzim amobil masih efektif untuk digunakan kembali apabila efisiensinya di atas 50%. Efisiensi xilanase amobil

berpengaruh terhadap aktivitas xilanase amobil, hal ini diperkuat pada perhitungan uji F dimana  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{table}}$  ( $6,632 > 3,137$ ).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Suhu berpengaruh terhadap kestabilan xilanase. Xilanase paling stabil pada penyimpanan suhu  $50^{\circ}\text{C}$  dengan aktivitas enzim sisa pada penyimpanan 7 hari sebesar 50,81 %.
2. Lama penyimpanan berpengaruh terhadap kestabilan xilanase. Semakin lama waktu penyimpanan maka aktivitas xilanase semakin menurun. Pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  enzim xilanase amobil stabil sampai hari ke-7 dengan aktivitas sisa 50,81 %. Pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  stabil sampai hari ke-4 dengan aktivitas enzim sisa 53,00%. Pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  xilanase amobil stabil sampai hari ke-5 dengan aktivitas enzim sisa 52,26%, sedangkan pada suhu 40 dan  $60^{\circ}\text{C}$  xilanase amobil stabil sampai hari ke-6 dengan aktivitas enzim sisa berturut-turut 58,10; dan 54,89%.
3. Enzim xilanase yang diamobilisasi menggunakan kitosan-natrium tripolifosfat dapat digunakan hingga lima kali pemakaian ulang dengan aktivitas sebanyak 16,462 unit dan efisiensi sebesar 50,19%.

### 5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya, sebaiknya dilakukan penelitian analisis protease yang dihasilkan bersama-sama biosintesis xilanase oleh *Trichoderma viride* untuk melihat karakterisasi dari protease.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1]Avanue, M., 2001, **Enzymes: A Primer on Use and Benefits Today and Tomorrow**, N.W. Second Floor, Washington, DC.
- [2]Poedjiadi A., Supriyanti, 2006, **Dasar-Dasar Biokimia**, UI-Press, Jakarta.
- [3]Sawhney, S. K. dan Singh R., 2008, **Introduction Practical Biochemistry**, 2nd Edition, Narosa Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- [4]Richana, N., 2002, **Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia**, Buletin Agrobio 5 (1) 29-35.
- [5]Haryati, T., P. A. Marbun, dan T. Purwadaria, 2010, **Preservasi Xilanase *Bacillus pumilus* PU4-2 dengan Teknik Imobilisasi pada Pollard dan Penambahan Kation**, JTtv Vol.15 No. 1 Th. 2010: 63-71.
- [6]Subramaniyan, S. dan Prema, P., (2002), “**Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology**”, Molecular biology, and Application, Critical Reviews in Biotechnology, 22 (1), 33-64.
- [7]Budiman, A., dan Setiawan S., 2010, **Pengaruh Konsentrasi Substrat, Lama Inkubasi dan pH dalam Proses Isolasi Enzim Xilanase dengan Menggunakan Media Jerami Padi**, <http://www.undip.ac.id/journal/albar-substrat.pdf>, diakses tanggal 25 september 2013
- [8]Sarah, A., 2001, **Immobilization and Stabilization of Papain on Chelating Sepharose**, Electronic Journal Biotechnology, Catolica de Velparaaiso Chile.
- [9]Chibata, I., 1978, **Immobilized Enzyme, Research and Development**. John Wiley and Sons Inc, New York.
- [10]Esawy, M. A., Mahmoud D. A. R. dan Fattah A. F. A., 2008, **Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a Levansucrase and Some Studies on Its Properties**, Brazilian Journal of Chemical Engineering, No. 2, Vol. 25, 237-246.

- [11]Darwis a.A, & Sukara,E.,1990, **Teknologi Mikrobial**, Depdikbud Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi,Pusat Antar Universitas Bioteknologi,IPB
- [12]Meryadini, A., Sunarti T. C., Mutia F., Gusmawati N. F. dan Lestari Y., 2009, **Penggunaan Xilanase *Streptomyces sp.* 45 I-3 Amobil untuk Hidrolisis Xilan Tongkol Jagung**, *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, No. 1, Vol. 20, 9-16.
- [13]Krajewska, B., 2004, **Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilizations : A Review**, *Enzyme and Microbial Technology* , Vol. 35 ,126-139.
- [14]Minter, S., dan Tamara, K., 2006, **Nanopore Engineering of Chitosan Polymer for Enzyme Immobilization and Stabilization**, <http://www.Aiche.org.pdf>, hal. 1-2
- [15]Aral, C. dan Akugba J., 1998, **Alternative Approach to The Preparation of Chitosan Beads**, *International of Journal Pharmaceutics*, Vol. 168, 9-15.
- [16]Fwu, L. M., Shin S. S., Chin T. C., dan Juin Y. L., 2002, **Adsorption of Indomethacin onto Chemically Modified Chitosan**, *Polymer*, Vol. 43, 757-765.
- [17]Edi Sukmana, M., 2013, **Pengaruh Suhu Dan Lama Penyimpanan Terhadap Kestabilan Enzim Xilanase Dari *Trichoderma Viride***, Skripsi, FMIPA, Universitas Brawijaya.
- [18]Lehnninger A. L., 1993, **Dasar-dasar Biokimia Jilid I**, Erlangga, Jakarta, hal 235-241
- [19]Miller G.L. 1959. **Use of Dinitrosalic Asid Regent for Determination Of Reducing Sugar**. *Anal. Chem.* 31 :426-428.
- [20]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), hal 519-522
- [21]Yu EK, Tan LUL, Gahan MHK. 1987. **Production of Thermostable Xylanase by Thermophilic Fungus Thermoascus Aurantiacus. Enzyme**. *Microbiol. Technol.* 9:16-24.

- [22]Megazyme, 2009,***endo-1,4- $\beta$ -xylanase M1 (from Trichoderma viride)(20502)***,[http://secure.megazyme.com/files/BOOKLET/EXYTR1\\_020502\\_DATA.pdf](http://secure.megazyme.com/files/BOOKLET/EXYTR1_020502_DATA.pdf), diakses 15 Januari 2014
- [23]Schlegel, H.G. dan K. Schmidt, 1994, **Mikrobiologi Umum Ed.6** Alih Bahasa: R.M.Tedjo Baskoro, UGM Press, Yogyakarta
- [24]Yusra, Fauzi dan Hendy Firmanto, 2011, **Pembuatan Etanol dari Xilan dalam Jerami Padi melalui Degradasi Enzimatik Diikuti Proses Fermentasi menggunakan Pichia stipitis**, Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS, Surabaya
- [25]Noviana, E., 2008, **Hubungan Lamanya Penimbunan Kayu Eucalyptus sp Dilogpond Dengan Perubahan Kandungan Pentosan Pada PT. Toba Pulp Lestari**, Sekolah Pascasarjana, Universitas Sumatra Utara, Medan.
- [26]Subramaniyan, S., dan Prema, P., 2002, **Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application**, *Critical Reviews in Biotechnology*, No. 1, Vol. 22, Hal. 33-46, Department of Botany Government Sanskrit College, Pattambi.
- [27]Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001, **Microbial Xylanase and Their Industrial Applications : A Review**, *Appl Microbiol Biotechnol*, No. 56, Hal. 326-327, Department of Microbiology, University of Delhi South Campus, New Delhi.
- [28] Munadjim. 1983. **Teknologi pengolahan pisang**. PT Gramedia. Jakarta.
- [29]Adnan, M., 1981, **Dalam: Daftar Komposisi Bahan Makanan**. Bhratara Karya Aksara, Jakarta.
- [30] Simmonds, N. W. 1996. **Banana**. 2nd Ed. Longman. London.
- [31]Cho. Goo, Suh S, Choi YI. 1996. Over production, Purification dan Characterization of *Bacillus Stearothermophilus* Endo-Xylanase A (Xyn A). J.Microbiology and Biotecnology 6: 79 – 85.
- [32]Widyasari, S., 2008, **Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Xilanase dari Trichoderma viride**, Skripsi, FMIPA, Universitas Brawijaya.

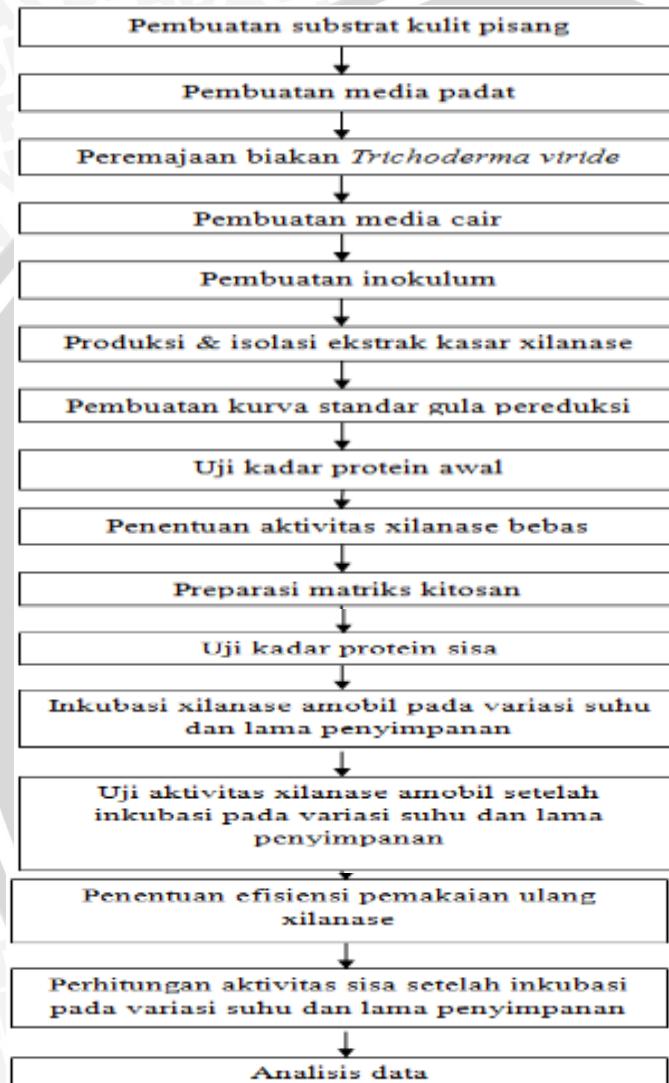
- [33]Septiningrum, K., dan Moeis, M.R., 2009, **Isolasi dan Karakterisasi Xilanase dari *Bacillus circulans***, BS, No. 1, Vol. 44, Hal. 31-40, Balai Besar Pulp dan Kertas, Bandung.
- [34]Pelezar, M.J, and R. D. Reid, 1965, **Microbiology**, Mc. Graw Hill, Inc, USA.
- [35]Sebastian, P.A., 2011, **Pengaruh Lama Penyimpanan terhadap Kualitas Inokulum *Trichoderma viride* dan *Rhizopus oryzae* untuk Hidrolisis Tongkol Jagung**, Skripsi, Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, Bogor
- [36]Ramada,A., 2010, **Pupuk Biologis *Trichoderma***, <http://organicindonesianvanila.com/2008/01/pupuk-biologis-trichoderma.html>, tanggal akses 19 Januari 2014
- [37]Rifai, M. A., 1969, **A Revision of the Genus *Trichoderma***, Mycological Papers No. 116, Commonwealth Mycological Institute, England
- [38]Soewoto, H., dkk, 2001, **Biokimia Eksperimen Laboratorium**, Widya Medika, Jakarta.
- [39]Clipson, N,2004, ***Trichoderma persoon ex Gray***, [http:// www.marinespecies.org/aphia.php?taxdetails&id=100248](http://www.marinespecies.org/aphia.php?taxdetails&id=100248), diakses tanggal 19 Januari 2014.
- [40]Cooper, P.D., 1986, **The Enzim**, Academic Press Inc., New York.
- [41]Naiola, E., dan Widhyastuti, N., 2007, **Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus sp.***, Berk. Penel. Hayati, Vol.13, Hal. 51-56, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor.
- [42]Wook, K. S., 2004, **Development of Enzyme Immobilization Technique**,<http://www.cheric.org/ippage/e/ipdata/2004/02/file/e200402-1001.pdf>, diakses tanggal 18 Januari 2014.
- [43]Su'i, M., Harijono, Yunianta dan Aulani'am, 2008, **Perubahan Aktivitas Enzim Amobil Lipase dari Kentos Kelapa**, Laporan Penelitian, Universitas Brawijaya, Malang.
- [44]Hiratsuka, A., Fujisawa K., dan Muguruma H., 2008, **Amperometric Biosensor Based on Glucose**

- Dehydrogenase and Plasma-polymerized Thin Films,**  
*Journal Analytical Sciences*, Vol. 24, hal. 483–486.
- [45]Rai University, 2005, **Immobilization of Enzymes**, industrial biotechnology/lecture-notes/lecture-21.pdf, diakses 25 Juni 2012.
- [46]Bayramol, G., Akgol S., Bulut A., Denizli A., dan Yakup A. M., 2003, **Covalent Immobilization of Invertase Into a Reactive Film Composed of 2-hydroxyethyl Methacrylate and Glycidyl Methacrylate**, *Journal Biochemical Engineering*. Vol. 14, hal. 117-126.
- [47]Saha, T.K, dkk, 2010, **Adsorption of Methyl orange from Aqueous Solution**, *J. Water Resource and Protection*, vol. 2, hal: 898-906.
- [48]Sakaew, S. dan Umpuch, C., 2011, **Removal Azo Dyes from Aqueous Solution by Using Chitosan-coated-Montmorillonite Clay**, TICChE International Conference,Songkhla, 10-11 November.
- [49]Alves, N.M. and J.F. Mano, 2008, **Chitosan Derivatives Obtained by Chemical Modifications for Biomedical and Environmental Applications**. International
- [50]Tan, S. H., Ahmad A. L., Nawawi M. G. M. dan Hasan H., 2002, **Performance of Chitosan Membranes Crosslinked with Glutaraldehyde in Pervaporation Separation**, ASEAN Journal for Science and Technology Development, No. 2, Vol. 19, 69-83.
- [51]Chen, A.H., Liu, S.C., Chen, C.Y., dan Chen, C.Y., 2008, **Comparative Adsorption of Cu(II), Zn(II), and Pb(II) ions in Aqueous Solution on the Crosslinked Chitosan with Epichlorohydrin**, *Journal of Hazardous Material*, Vol.154, hal: 184-191
- [52]Nwe, N., Furuike,T. and Tamura,H., 2009, **The Mechanical and Biological Properties of Chitosan Scaffolds for Tissue Regeneration Templates are Significantly Enhanced by Chitosan from Gongronella Butleri**, *J. Materials*. Vol.2,hal: 374-398.

- [53]Muawanah, A., 2006, **Produksi Enzim Xilanase Termostabil *Thermomyces lanuginosus* IFO 150 pada Bagasse Tebu**, Tesis IPB, Bogor
- [54]Rodwell, V.W. 1987. **Harper's Review of Biochemistry**.Edisi 20. Jakarta: EGC Kedokteran.
- [55]Muchtadi,D.,N.S Palupi., dan M. Astwan.1992 .**Teknologi Pemasakan Ekstrusi.PAU Pangan dan Gizi** , IPB, Bogor.
- [56]Rabyt, JF and B.J white. 1987.**Biochemical Techniques : Theory And Practice**.Brooks/cole California: Publishing company
- [57]Winarno, F.G. 1986. **Enzim Pangan**. Jakarta: Gramedia.
- [58]Tranggono dan Sutardi. 1990. **Biokimia dan Teknologi Pasca Panen. PAU Pangan dan Gizi**. Yogyakarta: UGM Press.
- [59] Ekunsauri, T., 2010, **Laboratory Production and Assay of Amylase by Fungi and Bacteria**, <http://www.biolink.org/sharing/day/fungalAmylase.pdf>, tanggal akses : 20 Januari 2014.
- [60]Fitriani, Emy., 2003, **Aktivitas Enzim Karboksimetil Selulase *Bacillus pumilus* Galur 55 pada Berbagai Suhu Inkubasi**, Skripsi, Program Studi Kimia, Institut Pertanian Bogor.
- [61]Simkovic, M., A. Kurucova., M. Hunova., L. Varecka,2008, **Induction of Secretion of Extracellular Proteases from *Trichoderma viride***,Acta Chimica Slovaca, Vol.1: 250 – 264
- [62]Judoamidjojo, R . M ..Said, E.G dan Hartoto.L. 1989. Biokonveksi. Depdikbud. Dirjen Dikti PAU dan Gizi IPB Bogor.
- [63]Rachmani Tantowidjojo, V., 2013,**Optimasi Amobilisasi Pektinase dari *Bacillus subtilis* Menggunakan Kitosan-Natrium Tripolifosfat**, Skripsi, FMIPA, Universitas Brawijaya.
- [64]Dondin Sajuthi, Irma Suparto, Yanti, dan Willy Praira, 2010, **Purifikasi dan Pencirian Enzim Protease Fibrinolitik dari Ekstrak Jamur Merang**. Makara Sains, Vol. 14: 145-150.

## LAMPIRAN

### Lampiran A. Tahapan penelitian



## **Lampiran B. Preparasi larutan**

### **B.1 Akuades steril**

Akuades dipersiapkan sebanyak 250 mL yang selanjutnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup dengan kapas lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, 15 psi selama 15 menit.

### **B.2 Larutan asam asetat 0,2 M**

Asam asetat glasial 100% (Bj : 1,05 g/mL; BM: 60 g/mol; konsentrasi 17,5 M) dipipet 1,15 mL dengan pipet ukur 5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang telah berisi akuades 25 mL kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

### **B.3 Larutan natrium asetat 0,2 M**

Natrium asetat (BM: 82,02 g/mol) sebanyak 1,64 gram dilarutkan dengan akuades secukupnya dan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

### **B.4 Buffer asetat pH 5**

Larutan asam asetat 0,2 M sebanyak 14,8 mL dipipet ke dalam beaker glass, ditambahkan 34,2 mL larutan natrium asetat 0,2 M dan diaduk hingga homogen. Dipindahkan larutan campuran ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Kemudian diukur dengan menggunakan pH meter.

### **B.5 Larutan stok glukosa 1500 µg/mL**

Glukosa anhidrat sebanyak 0,15 gram dilarutkan dengan akuades dalam beaker glass, kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas.

### **B.6 Larutan baku gula pereduksi**

Larutan stok glukosa 1500 µg/mL dipipet (2; 4; 6; 6,8 dan 8) mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan gula konsentrasi 300, 600, 900, 1000, dan 1200 µg/mL.

## B.7 Reagen DNS

NaOH 1 gram; NaKC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>H<sub>4</sub> 18,2 gram; kristal fenol 0,2 gram; dan Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0,5 gram dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam beaker glass 100 mL. Ditambahkan 1 gram asam dinitrosalisolat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan magnetik stirer. Setelah larut dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

## B.8 Substrat xilan 1%

Sebanyak 1 gram xilan dimasukkan ke dalam beaker glass 100 mL dan dilarutkan dengan buffer asetat pH 5 secukupnya, lalu dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan buffer asetat pH 5 hingga tanda batas.

## B.9 Larutan NaOH 10%

Ditimbang 1,00 g NaOH, dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia 100 mL, dipindah secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

## B.10 Pereaksi Biuret

Ditimbang 0,15 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dan ditimbang 0,6 g NaKC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, dilarutkan dengan akuades sebanyak 30 mL dalam gelas kimia 100 mL. Larutan NaOH 10% ditambahkan sebanyak 30 mL sambil diaduk dengan pengaduk. Larutan campuran dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

## B.11 Larutan asam asetat 3%

Larutan asam asetat glasial dipipet sebanyak 3 mL, selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL serta diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

## B.12 Larutan Kitosan

Kitosan ditimbang sebanyak 2,0 g bubuk kitosan dan dilarutkan dalam 80 mL asam asetat 3% pada gelas kimia. Larutan selanjutnya diaduk menggunakan pengaduk magnetik hingga homogen.

### B.13 Larutan Natrium Tripolifosfat 3%

Natrium Tripolifosfat ditimbang sebanyak tiga gram, dilarutkan dengan akuades dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL serta diencerkan hingga tanda batas.



## Lampiran C. Perhitungan Preparasi Larutan

### C.1 Larutan asam asetat 0,2 M

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

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

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

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

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

### C.2 Larutan natrium asetat 0,2 M

Larutan natrium asetat 0,2 M dibuat sebanyak 100 mL (BM CH<sub>3</sub>COONa = 82,02 g/mol) :

$$\begin{aligned}\text{Mol CH}_3\text{COONa} &= [\text{CH}_3\text{COONa}] \times V \text{ larutan} \\&= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\&= 0,02 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Berat CH}_3\text{COONa} &= \text{mol CH}_3\text{COONa} \times \text{BM CH}_3\text{COONa} \\&= 0,02 \text{ mol} \times 80,02 \text{ g/mol} \\&= 1,6 \text{ gram}\end{aligned}$$

### C.3 Larutan buffer asetat pH 5

Larutan buffer asetat pH 5 dibuat dengan mencampurkan larutan asam asetat dengan larutan natrium asetat berdasarkan persamaan di bawah ini :

$$\text{pH} = \text{pKa} - \log \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}$$

Untuk membuat larutan buffer asetat pH 5 maka 50 mL larutan asam asetat ditambah dengan 90,99 mL larutan natrium asetat dengan perhitungan sebagai berikut

$$\text{pKa asam asetat} = 4,74$$

$$5 = 4,74 - \log \frac{(50 \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})/(50+V)\text{mL}}{V \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}/(50+V)\text{mL}}$$
$$5 = 4,74 - \log \frac{50}{V}$$
$$V = 90,99 \text{ mL}$$

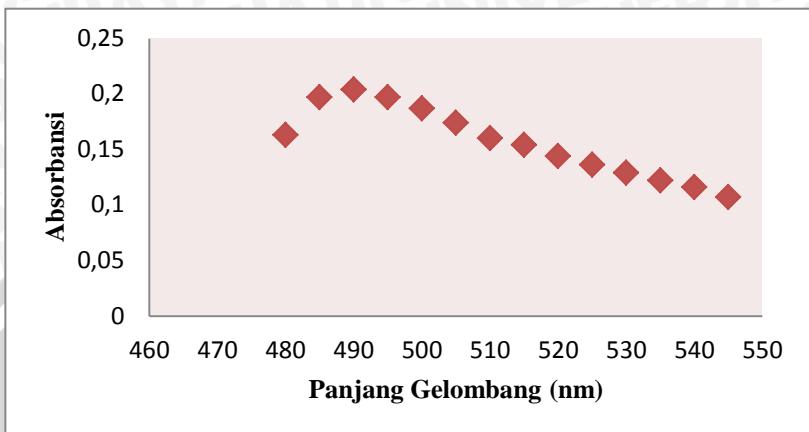
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## Lampiran D. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku Gula Pereduksi

Tabel D.1 Pengukuran panjang gelombang maksimum

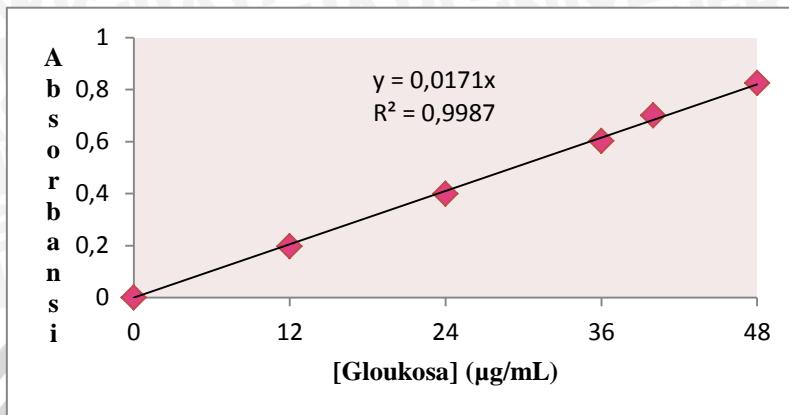
Panjang Gelombang	A
480	0,163
485	0,197
490	0,204
495	0,197
500	0,187
505	0,174
510	0,16
515	0,154
520	0,144
525	0,136
530	0,129
535	0,122
540	0,116
545	0,107
550	0,102



Gambar D.1 Kurva penentuan panjang gelombang maksimum

Tabel D.2 Absorbansi gula pereduksi pada panjang gelombang 490 nm

Konsentrasi	Pengulangan			Rata Rata
	A1	A2	A3	
0	0	0	0	0
12	0,23	0,178	0,181	0,196
24	0,425	0,349	0,422	0,398
36	0,642	0,598	0,566	0,602
40	0,695	0,702	0,702	0,699
48	0,807	0,858	0,806	0,824



Gambar D.2 Kurva baku gula pereduksi

## Lampiran E. Perhitungan Aktivitas Enzim dan Kadar Protein Xilanase

### E.1 Perhitungan Aktivitas Xilanase Bebas

Aktivitas enzim xilanase adalah banyaknya gula pereduksi ( $\mu\text{g/mL}$ ) yang dihasilkan oleh 1 mL enzim dalam waktu 1 menit. Pengukuran aktivitas xilanase dihitung dengan persamaan :

$$AE = \frac{x \cdot V}{p \cdot q} \times \frac{M_{Rxilosa}}{M_{Rglukosa}}$$

dimana :

$AE$  = Aktivitas enzim (unit ( $\mu\text{g/mL} \cdot \text{menit}$ ))

$X$  = Konsentrasi gula pereduksi ( $\mu\text{g/mL}$ )

Persamaan kurva baku ;  $y = 0,0171x$

$y$  = nilai absorbansi

$V$  = 25 mL

$p$  = 1 mL

$q$  = 50 menit

Tabel E.1.1 Pengukuran aktivitas bebas enzim xilanase

Perlakuan	Pengulangan			Total	Rata-rata
	A1	A2	A3		
Nilai absorbansi	0,397	0,390	0,393	1,180	0,939
Konsentrasi enzim	23,216	22,807	22,982	69,005	23,002
Aktivitas enzim	9,681	9,510	9,584	28,775	9,591

### E.2 Perhitungan Kadar Protein Awal Xilanase Bebas

Kadar protein xilanase bebas ditentukan dengan konversi nilai absorbansi pada kurva baku kasein. Persamaan regresi linearnya:

$$Y = 0,00004X$$

Konsentrasi total = Konsentrasi Protein Enzim + Kasein 5000 ppm  
Contoh : perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,912 adalah:

$$y = 0,00004x$$

$$0,912 = 0,00004x$$

$$x = 22800 \text{ ppm}$$

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi protein total - konsentrasi kasein yang ditambahkan  
 = 22800 ppm - 5000 ppm  
 = 17800 ppm  
 = 17,800 mg/mL

**Tabel E.2.1 Data Uji Kadar Protein Awal**

Absorbansi			Rata-rata	[Xilanase] (mg/mL)			Rata-rata
0.911	0.917	0.909	0.912	17.8	17.9	17.8	17.833

### E.3 Data Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Aktivitas Xilanase Hasil Isolasi *Trichoderma viride* yang Diamobilisasi Menggunakan Kitosan –Natrium Tripolifosfat

**Tabel E.3.1 Data absorbansi enzim amobil setelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan**

No	Lama Penyimpanan (hari)	Suhu (°C)									
		30		40		50		60		70	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
1	0	0.340				0.345					
2	1	0.358	0.349	0.370	0.368	0.406	0.417	0.397	0.399	0.339	0.261
3	2	0.335	0.320	0.351	0.350	0.390	0.388	0.379	0.380	0.280	0.278
4	3	0.260	0.273	0.299	0.272	0.308	0.314	0.303	0.299	0.235	0.230
5	4	0.229	0.232	0.251	0.259	0.289	0.280	0.273	0.277	0.183	0.180
6	5	0.189	0.194	0.219	0.229	0.247	0.250	0.245	0.240	0.133	0.132
7	6	0.159	0.147	0.178	0.180	0.201	0.197	0.188	0.188	0.089	0.087
8	7	0.129	0.124	0.148	0.151	0.173	0.175	0.168	0.170	0.028	0.020

**Tabel E.3.2 Data konsentrasi gula pereduksi enzim amobil setelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan**

No	Lama Penyimpanan (hari)	Suhu (°C)													
		30		40		50		60		70					
		Konsentrasi Gula Pereduksi													
1	0	19.883				20.175									
2	1	26.936	20.409	21.657	23.520	23.743	24.386	23.216	23.333	19.825	15.263				
3	2	19.391	18.713	24.526	20.468	22.807	21.690	22.164	22.222	16.374	16.257				
4	3	15.205	15.365	17.485	15.906	18.012	18.363	17.719	17.485	13.743	13.470				
5	4	13.392	13.567	14.678	15.146	16.901	16.374	15.965	16.199	10.782	10.526				
6	5	11.053	11.145	12.807	13.392	14.444	14.620	14.327	14.635	7.778	7.719				
7	6	9.298	8.596	10.409	10.526	11.754	11.520	10.994	10.994	5.205	5.088				
8	7	7.544	7.251	8.655	8.830	10.117	10.234	9.825	9.942	1.637	1.170				

**Tabel E.3.3 Data aktivitas enzim amobil setelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan**

No	Lama Penyimpanan (hari)	Suhu (°C)				
		30	40	50	60	70
Aktivitas Enzim Xilanase						
1	0	5.527			5.609	
2	1	5.820	5.674	6.015	5.983	6.600
3	2	5.446	5.202	5.706	5.690	6.340
4	3	4.227	4.438	4.861	4.422	5.007
5	4	3.723	3.772	4.081	4.211	4.698
6	5	3.873	3.154	3.560	3.723	4.016
7	6	2.585	2.390	2.894	2.926	3.268
8	7	2.097	2.016	2.406	2.455	2.813
					2.845	2.731
					2.764	0.455
						0.325

**Tabel E.3.4 Rata rata aktivitas enzim amobil setelah diinkubasi pada variasi suhu dan lama penyimpanan**

No	Lama Penyimpanan (hari)	Suhu (°C)				
		30	40	50	60	70
Aktivitas enzim ( $\mu\text{g.g}^{-1}\text{menit}^{-1}$ )						
1	0	5.568	5.568	5.568	5.568	5.568
2	1	5.747	5.999	6.690	6.470	4.877
3	2	5.324	5.698	6.324	6.170	4.536
4	3	4.333	4.641	5.056	4.893	3.780
5	4	3.747	4.146	4.625	4.471	2.951
6	5	3.113	3.642	4.040	3.942	2.154
7	6	2.487	2.910	3.235	3.056	1.431
8	7	2.057	2.430	2.829	2.747	0.390

**Tabel E.3.5 Aktivitas sisa enzim xilanase amobil**

Lama Penyimpanan	Suhu (°C)				
	30	40	50	60	70
0	100	100	100	100	100
1	103.21	107.74	120.15	116.20	87.59
2	95.62	102.33	113.58	110.81	81.47
3	77.82	83.35	90.80	87.88	67.89
4	67.30	74.46	83.06	80.30	53.00
5	55.91	65.41	72.56	70.80	38.69
6	44.67	52.26	58.10	54.89	25.70
7	36.94	43.64	50.81	49.34	7.00

#### E.4 Perhitungan Kadar Protein Sisa Xilanase Amobil

Kadar protein xilanase bebas ditentukan dengan konversi nilai absorbansi pada kurva baku kasein. Persamaan regresi linearanya:

$$Y = 0,00004X$$

Konsentrasi total = Konsentrasi Protein Enzim + Kasein 5000 ppm

Contoh : perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,244 adalah:

$$y = 0,00004x$$

$$0,244 = 0,00004x$$

$$x = 6100 \text{ ppm}$$

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi protein total - konsentrasi kasein yang ditambahkan

$$= 6.100 \text{ ppm} - 5000 \text{ ppm}$$

$$= 1100 \text{ ppm}$$

$$= 1.100 \text{ mg/mL}$$

Tabel E.4.1 Data Uji Kadar Protein Sisa

Absorbansi	Rata-rata	[Xilanase] (mg/mL)	Rata-rata
0,241	0.244	0.246	0.244

## Lampiran F. Analisa Statistika.

### F.1 Analisa Statistika Data aktivitas enzim amobil

Tabel F.1 Data aktivitas enzim amobil

Perlakuan	ULANGAN		Total	Rerata
	I	II		
A1B1	5.527	5.609	11.1358	5.568
A1B2	5.527	5.609	11.1358	5.568
A1B3	5.527	5.609	11.1358	5.568
A1B4	5.527	5.609	11.1358	5.568
A1B5	5.527	5.609	11.1358	5.568
A2B1	5.820	5.674	11.4940	5.747
A2B2	6.015	5.983	11.9980	5.999
A2B3	6.600	6.779	13.3790	6.690
A2B4	6.454	6.487	12.9410	6.471
A2B5	5.511	4.243	9.7540	4.877
A3B1	5.446	5.202	10.6480	5.324
A3B2	5.706	5.690	11.3960	5.698
A3B3	6.340	6.308	12.6480	6.324
A3B4	6.162	6.178	12.3400	6.170
A3B5	4.552	4.52	9.0720	4.536
A4B1	4.227	4.438	8.6650	4.333
A4B2	4.861	4.422	9.2830	4.642
A4B3	5.007	5.105	10.1120	5.056
A4B4	4.926	4.861	9.7870	4.894
A4B5	3.82	3.739	7.5590	3.780
A5B1	3.723	3.772	7.495	3.748
A5B2	4.081	4.211	8.292	4.146
A5B3	4.698	4.552	9.250	4.625
A5B4	4.438	4.503	8.941	4.471
A5B5	2.975	2.926	5.901	2.951
A6B1	3.560	3.723	7.283	3.642
A6B2	4.016	4.064	8.080	4.040
A6B3	3.983	3.902	7.885	3.943
A6B4	2.162	2.146	4.308	2.154
A7B1	2.585	2.390	4.975	2.488
A7B2	2.894	2.926	5.820	2.910
A7B3	3.268	3.203	6.471	3.236
A7B4	3.056	3.056	6.112	3.056
A7B5	1.447	1.414	2.861	1.431
A8B1	2.097	2.016	4.113	2.057
A8B2	2.406	2.455	4.861	2.431
A8B3	2.813	2.845	5.658	2.829
A8B4	2.731	2.764	5.495	2.748
A8B5	0.455	0.325	0.780	0.390
Total	169.54	168.02	337.56	168.78

**Tabel F.1.1 Tabel dua arah**

Perlakuan	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	total	Rata-rata
<b>0 hari</b>	5.568	5.568	5.568	5.568	5.568	27.840	5.568
<b>1 hari</b>	5.747	5.999	6.690	6.471	4.877	29.784	5.957
<b>2 hari</b>	5.324	5.698	6.324	6.170	4.536	28.052	5.610
<b>3 hari</b>	4.333	4.642	5.056	4.894	3.780	22.705	4.541
<b>4 hari</b>	3.748	4.146	4.625	4.471	2.951	19.941	3.988
<b>5 hari</b>	3.114	3.642	4.040	3.942	2.154	16.892	3.378
<b>6 hari</b>	2.488	2.910	3.236	3.056	1.431	13.121	2.624
<b>7 hari</b>	2.057	2.431	2.829	2.748	0.390	10.455	2.091
<b>total</b>	32.379	35.036	38.368	37.320	25.687	168.790	
<b>Rata-rata</b>	4.047	4.380	4.796	4.665	3.211		

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

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n.p} = \frac{1139,78}{42.2} = 1356,533$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

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

$$= 1603,303 - 1356,533 = 246,770$$

- b. JK Perlakuan (JKP)

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

$$= 1602,214 - 1356,533 = 245,681$$

- c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 246,770 - 245,681 = 1,089$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{a. KT Perlakuan} = \frac{JKP}{\text{db perlakuan}} = \frac{245,68}{41} = 5,992$$

$$\text{b. KT Galat percobaan} = \frac{JKG}{\text{db percobaan}} = \frac{1,089}{42} = 0,026$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{5,992}{0,026} = 231,072$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 47, 48) = 1,692$$

SK	db	JK	KT	F hitung	Notasi	F tabel 0.05
Perlakuan	41	245.681	5.992	231.072	nyata	1.693
Galat	42	1.089	0.026			
Total	83	246.770				

Karena  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya suhu dan lama penyimpanan berpengaruh terhadap kestabilan enzim xilanase, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .

$$\begin{aligned} \text{BNT}_{5\%} &= t_{(\alpha/2; \text{db})} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= 2,021 \times (2 \times 0,026/2)^{0,5} \\ &= 0,325 \end{aligned}$$

**Tabel F.1.2 Data BNT hari ke 0**

Perlakuan	rataan	A1B3	A1B4	A1B2	A1B1	A1B5	Keterangan
A1B3	5.568	5.568	5.568	5.568	5.568	5.568	A
A1B4	5.568	0.000					A
A1B2	5.568	0.000	0.000				A
A1B1	5.568	0.000	0.000	0.000			A
A1B5	5.568	0.000	0.000	0.000	0.000		A

A ,B ,C ,D ,E = Berbeda Nyata

**Tabel F.1.3 Data BNT hari ke 1**

Perlakuan	rataan	A2B3	A2B4	A2B2	A2B1	A2B5	Keterangan
A2B3	6.690	6.690					A
A3B4	6.471	0.219					B
A2B2	5.999	0.691	0.472				C
A2B1	5.747	0.943	0.724	0.252			C
A2B5	4.877	1.813	1.594	1.122	0.870		D

**Tabel F.1.4 Data BNT hari ke 2**

Perlakuan	rataan	A3B3	A3B4	A3B2	A3B1	A3B5	Keterangan
A3B3	6.324	6.324					A
A3B4	6.170	0.626					B
A3B2	5.698	0.626	0.472				B
A3B1	5.324	1.000	0.846	0.374			B
A3B5	4.536	1.788	1.634	1.162	0.788		C

**Tabel F.1.5 Data BNT hari ke 3**

Perlakuan	rataan	A4B3	A4B4	A4B2	A4B1	A4B5	Keterangan
A4B3	5.056	5.056	4.894	4.642	4.333	3.780	
A4B4	4.894	0.162					A
A4B2	4.642	0.414	0.252				A
A4B1	4.333	0.723	0.561	0.309			A
A4B5	3.780	1.276	1.114	0.862	0.553		B

**Tabel F.1.6 Data BNT hari ke 4**

Perlakuan	rataan	A5B3	A5B4	A5B2	A5B1	A5B5	Keterangan
		4.625	4.471	4.146	3.748	2.951	
A5B3	4.625						A
A5B4	4.471	0.154					A
A5B2	4.146	0.479	0.325				A
A5B1	3.748	0.877	0.723	0.398			B
A5B5	2.951	1.674	1.520	1.195	0.797		C

**Tabel F.1.7 Data BNT hari ke 5**

Perlakuan	rataan	A6B3	A6B4	A6B2	A6B1	A6B5	Keterangan
		4.040	3.943	3.642	3.114	2.154	
A6B3	4.040						A
A6B4	3.943	0.097					A
A6B2	3.642	0.398	0.301				A
A6B1	3.114	0.926	0.829	0.528			B
A6B5	2.154	1.886	1.789	1.488	0.960		C

**Tabel F.1.8 Data BNT hari ke 6**

Perlakuan	rataan	A7B3	A7B4	A7B2	A7B1	A7B5	Keterangan
		3.236	3.056	2.910	2.488	1.431	
A7B3	3.236						A
A7B4	3.056	0.180					A
A7B2	2.910	0.326	0.146				A
A7B1	2.488	0.748	0.568	0.422			B
A7B5	1.431	1.805	1.625	1.479	1.057		C

**Tabel F.1.9 Data BNT hari ke 7**

Perlakuan	rataan	A8B3	A8B4	A8B2	A8B1	A8B5	Keterangan
		2.829	2.748	2.431	2.057	0.390	
A8B3	2.829						A
A8B4	2.748	0.081					A
A8B2	2.431	0.398	0.317				A
A8B1	2.057	0.772	0.691	0.374			B
A8B5	0.390	2.439	2.358	2.041	1.667		C

## F.2 Analisa Data Efisiensi Pemakaian Ulang Xilanase Amobil

Untuk mengetahui aktivitas pada efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil maka dilakukan analisis menggunakan pola RAL sebagai berikut:

**Tabel F.2.1 : Data aktivitas efisiensi xilanase**

Pemakaian ke-	Aktivitas Enzim (unit)	Rata-rata (unit)	TOTAL
1	32.517	33.086	32.801
2	29.915	30.078	29.997
3	23.493	23.575	23.534
4	18.778	20.242	19.510
5	16.665	16.258	16.462
			32.923

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

2. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right]^2}{n.p} = \frac{59832,839}{10.2} = 2991,64$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. JK Total (JKT)

$$JKT = \left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 \right] - FK \\ = 6363,748 - 2991,64 = 3372,106$$

b. JK Perlakuan (JKP)

$$JKP = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n} - FK \\ = 3181,874 - 2991,64$$

$$= 190,232$$

c. JK Galat percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 3372,106 - 190,232 = 3181,874$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. KT Perlakuan =  $\frac{JKP}{dB \text{ perlakuan}} = \frac{190,232}{9} = 21,137$

b. KT Galat percobaan =  $\frac{JKG}{dB \text{ percobaan}} = \frac{31,874}{10} = 3,187$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{21,137}{3,187} = 6,632$$

$$F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05; 10, 9) = 3,137$$

Karena  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil berpengaruh terhadap aktivitas xilanase pada kitosan. Untuk mengetahui efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas xilanase pada kitosan, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$ .

$$\begin{aligned} BNT_{5\%} &= t_{(\alpha/2; dB)} \times (2KTG/n)^{0,5} \\ &= 2,262 \times (2 \times 0,024/2)^{0,5} \\ &= 4,038 \end{aligned}$$

Tabel F 2.2 : Data uji BNT efisiensi pemakaian ulang xilanase amobil

Pemakaian ke	Pemakaian ke	5	4	3	2	1	Keterangan
	Rataan	16.462	19.51	23.534	29.997	32.801	
5	16.462						A
4	19.51	3.048					A
3	23.534	7.072	4.042				B
2	29.997	13.535	10.487	6.463			C
1	32.801	16.336	13.291	9.267	2.804		C

A, B, C, D, E = Berbeda Nyata

