repository.ub.ac.id

Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Bentonit Ca-alginat

SKRIPSI

oleh **:**
MOCHAMMAD HAFID BRAMANTYO
145090200111029

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Bentonit Ca-alginat

SKRIPSI
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di bidang Kimia

oleh **:**
MOCHAMMAD HAFID BRAMANTYO
145090200111029

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Bentonit Ca-alginat

oleh:
MOCHAMMAD HAFID BRAMANTYO
145090200111029

Setelah diseminarkan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 16 JUL 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang kimia

Pembimbing I	Pembimbing II
Drs. Sutrisno, M.Si	Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP.196203181990021001	NIP.196304041987011001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia Fakultas
MIPA Universitas Brawijaya

Masruri, S.Si.,M.Si.,Ph.D
NIP. 197310202002121001

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Mochammad Hafid Bramantyo
NIM : 145090200111029
Jurusan : Kimia
Penulis skripsi berjudul:

Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Bentonit Ca-alginat

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.

2. Apabila 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, 16 JUL 2018
Yang menyatakan,

(Mochammad Hafid Bramantyo)
NIM.145090200111029

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Bentonit Ca-alginat

ABSTRAK

Xilanase tergolong enzim ektrasesluler yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Enzim Xilanase dapat digunakan secara efisien dan berulang, apabila telah diamobilkan. Metode amobilisasi yang digunakan adalah metode adsorbsi fisik menggunakan bentonit dilanjutkan metode *entrapment* Ca-alginat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi kerja optimum xilanase yang diamobilkan pada matriks bentonit Ca-alginat meliputi pH, temperatur, dan waktu inkubasi. Kondisi optimum ini ditentukan dari pengukuran aktivitas xilanase pada variasi pH (3, 4, 5, 6, 7), temperatur (40, 50, 60, 70, 80) °C, dan waktu inkubasi (40, 45, 50, 55, 60, 65) menit. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan SPSS 22.0 melalui uji ANOVA *one-way* dan dilanjutkan dengan uji BNJ (α = 5%). Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas optimum xilanase amobil pada matriks Bentonit Ca-alginat yaitu pada pH 4; temperatur optimum pada 50 °C; dan waktu inkubasi optimum pada 45 menit dengan nilai aktivitas sebesar 17,840 µg/mg.menit.

Kata Kunci : *Trichoderma viride*, Enzim Xilanase, Amobil, Bentonit, Ca-alginat

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Determination of Optimum Conditions of Xylanase from *Trichoderma viride* Immobilized to Ca-alginate Bentonit Matrix

ABSTRACT

Xylanase is an extracellular enzyme that capable to hydrolyze xylan to xylose. Xylanase needs to be immobilize to improve it's efficiency so that can be used in multiple times. The method used are physical adsorption in an activated bentonite, then continued Ca-alginate entrapment. This study aims to determine the optimum conditions of immobilized xylanase in bentonite coated by Ca-alginate including pH, temperature, and incubation time The optimum condition was determined by measuring xylanase activity on pH (3, 4, 5, 6, 7), temperature (40, 50, 60, 70, 80) °C, and incubation time (40, 45, 50, 55, 60, 65) minutesThe data obtained were analyded statistically using SPSS 22.0 through ANOVA *one-way* test and continued with BNJ test ($\alpha = 5\%$). The results of this study showed that the optimum condition of immobilized xylanase are at pH of 4; with temperature at 50 ºC and incubation time at 45 minutes with activity value 17,840 µg/mg.minute.

Keywords: Immobilized Xylanase, Xylanase, *Trichoderma viride*, Bentonite, Ca-alginate, Ca-alginate Coated Bentonite

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis panjatkan ke hadirat Allah S.W.T atas limpahan rahmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Penentuan pH, Temperatur, dan Waktu Inkubasi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Bentonit Ca-alginat**" sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di bidang Kimia, di fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Sholawat serta salam selalu tercurahkan kepada junjungan Nabi besar Muhammad SAW beserta umatnya.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, serta dukungan dari berbagai pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Drs. Sutrisno, M.Si selaku pembimbing I yang telah banyak memberikan bimbingan selama penyusunan proposal penelitian, pelaksanaan penelitian, hingga penulisan.
2. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan saran dan arahan dalam pelaksanaan penelitian sampai penyusunan skripsi.
3. Masruri, S.Si.,M.Si.,Ph.D, selaku Ketua Jurusan Kimia yang telah memberikan dukungan selama proses penyelesaian skripsi.
4. Dr. Diah Mardiana, MS selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan saran dan masukkan selama menempuh pendidikan sarjana di Jurusan Kimia.
5. Edy Suprapto dan Rini Susiani selaku orang tua penulis, kakak Amalia Rindy Sofia, dan adik Chusnul Rizal Wicaksono yang selalu memberikan dukungan baik secara spiritual maupun material.
6. Ridha Dini Rahmawati dan Shofiatul Hanani selaku rekan satu tim penelitian dan Bapak Maryono selaku Laboran

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Biokimia atas semua dukungan semangat dan berbagi ilmu yang terkait penelitan ini.

7. Nikita Amalia VGA, Adisa Betari, Yetty Miranti, Yuniar Gita Pratiwi, Azhar Faizal Farazi, Grandiest Yogaswara Aulia Akbar, Maestro Abraham, Siti Sumadyah Nur'adya, Istoria Rosyada, Pretty Septiana, Ningrum Arrochmah, Zulfatul Muzayyana, Resti Rachmawanti, Cindy Alvionita, Fidela Azaria, Della Afriyana, dan Teman-teman KKN desa Poncokusumo selaku sahabat yang selalu memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
8. Teman-teman kimia angkatan 2014 khususnya kelas kimia B 2014 yang telah memberikan dukungan kepada penulis.
9. Semua pihak yang telah membantu terselesaikannya dan tersusunnya tugas akhir ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi pembaca pada umumnya dan penulis sendiri pada khususnya.

Malang, Juli 2018

Penulis

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL ii
HALAMAN PENGESAHAN iii
HALAMAN PERNYATAAN iv
ABSTRAK v
ABSTRACT vi
KATA PENGANTAR vii
DAFTAR ISI ix
DAFTAR GAMBAR xi
DAFTAR TABEL xii
DAFTAR LAMPIRAN xiii
DAFTAR PERSAMAAN xiv
BAB I. PENDAHULUAN
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Perumusan Masalah 3
1.3 Batasan Masalah 3
1.4 Tujuan Masalah 4
1.5 Manfaat penelitian 4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA
2.1 Klobot Jagung 5
2.2 *Trichoderma viride* 6
2.3 Enzim 6
2.4 Xilan 8
2.5 Isolasi Enzim 9
2.6 Amobilisasi Enzim 10
2.7 Penentuan Aktivitas Enzim 13
2.8 Hipotesis 14
BAB III. METODE PENELITIAN
3.1 Tempat dan Waktu penelitian 15
3.2 Alat dan Bahan Penelitian 15
3.3 Tahapan Penelitian 15
3.4 Prosedur Kerja 16
3.4.1 Pembuatan Tepung Klobot Jangung 16
3.4.2 Pembuatan Media Padat 17
3.4.3 Peremajaan Biakan Murni *Trichoderma viride* 17
3.4.4 Pembuatan Media Cair 17
3.4.5 Pembuatan Inokulum 18

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

3.4.6 Produksi dan Isolasi Enzim 18
3.4.7 Penentuan Kurva Baku Standar 18
3.4.8 Penentuan Kadar Protein Awal 20
3.4.9 Amobilisasi Xilanase pada Matriks Bentonit Ca-alginat 21
3.4.10 Uji Kadar Protein Sisa 22
3.4.11 Penentuan Aktivitas Xilanase Amobil 23
3.4.12 Uji Pengaruh pH, Temperatur dan Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Amobil 23
3.4.13 Analisis Data 24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN
4.1 Produksi dan Isolasi Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride* 25
4.2 Amobilisasi Enzim Xilanase pada Matriks BentonitCa-alginat 26
4.3 Penentuan Kondisi Optimum Xilanase Bebas dan Amobil 28
4.3.1 Penentuan pH Optimum 28
4.3.2 Penentuan Temperatur Optimum 30
4.3.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum 31
BAB V. PENUTUP
5.1 Kesimpulan 35
5.2 Saran 35
DAFTAR PUSTAKA 37
LAMPIRAN 43

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 :	Struktur Molekul Xilan	8
Gambar 2.2 :	Struktur Molekul Montmorillonite	11
Gambar 2.3 :	Struktur Molekul Ca-alginat	12
Gambar 2.4 :	Reaksi Xilosa dengan Reagen DNS	13
Gambar 4.1 :	Mekanisme Reaksi Xilan menjadi Xilosa	27
Gambar 4.2 :	Enzim Xilanase Terjebak pada Matriks Bentonit Ca-alginat	28
Gambar 4.3 :	Kurva Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Amobil	29
Gambar 4.4 :	Kurva Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Amobil	31
Gambar 4.5 :	Kurva Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Xilanase Bebas dan Amobil	32
Gambar D.2 :	Kurva Baku Gula Pereduksi	48
Gambar E.2 :	Kurva Baku Kasein	49

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 :	Klasifikasi Tanaman Jagung	5
Tabel 2.2 :	Komponen Kimia Pada Jagung	5
Tabel 2.3 :	Taksonomi *Trichoderma viride*	6
Tabel D.1 :	Data Absorbansi Panjang Gelombang Maksimum Gula Pereduksi	47
Tabel D.2 :	Data Absorbansi Gula Pereduksi	47
Tabel E.1 :	Data Absorbansi Panjang Gelombang Maksimum Kasein	48
Tabel E.2	Data Absorbansi Kasein	49
Tabel F.1 :	Konsentrasi Protein Awal	50
Tabel H.1 :	Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Variasi pH	52
Tabel H.2 :	Aktivitas Xilanase Bebas pada Variasi pH	52
Tabel H.3 :	Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variasi pH	53
Tabel H.4 :	Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi pH	53
Tabel H.5 :	Data Analisis Statistika pada Variasi pH	54
Tabel I.1 :	Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Variasi Temperatur	56
Tabel I.2	Aktivitas Xilanase Bebas pada Variasi Temperatur	56
Tabel I.3 :	Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variasi Temepratur	57
Tabel I.4 :	Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi Temperatur	57
Tabel I.5 :	Data Analisis Statistika pada Variasi Temperatur	58
Tabel J.1 :	Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Variasi Waktu Inkubasi	60
Tabel J.2 :	Aktivitas Xilanase Bebas pada Waktu Inkubasi	60
Tabel J.3 :	Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variais Waktu Inkubasi	61
Tabel J.4 :	Data Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi Waktu Inkubasi	61
Tabel J.5 :	Data Analisis Statistika pada Variasi Waktu Inkubasi	62

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A.	Tahapan Penelitian	43
Lampiran B.	Preparasi Larutan	44
Lampiran C.	Perhitungan Preparasi Larutan	45
Lampiran D. :	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku Xilosa	47
Lampiran E.	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Kurva Baku Kasein	48
Lampiran F.	Pennetuan Kadar Protein Awal	50
Lampiran G.	Penentuan Kadar Protein Akhir	50
Lampiran H	Penentuan Aktivitas Enzim pada Variasi pH	51
Lampiran I.	Penentuan Aktivitas Enzim pada Variasi Temperatur	55
Lampiran J.	Penentuan Aktivitas Enzim pada Variasi Waktu Inkubasi	59

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 3.1	Perhitungan Aktivitas Enzim	21
Persamaan C.1	Perhitungan Konsentrasi Larutan	45
Persamaan C.2	Perhitungan Pengenceran Larutan	46
Persamaan C.3	Perhitungan mol Larutan	46
Persamaan C.4	Perhitunggan Massa Senyawa	46
Persamaan C.5	Perhitungan pH Buffer	56
Persamaan C.6	Perhitungan Konsentrasi Larutan	57

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Xilan adalah komponen utama dari hemiselulosa dengan kandungan 15 hingga 30% dari berat kering tumbuan angiosperma dan 7 hingga 12% dari berat kering tumbuhan gymnosperma [1] kandungan lain dari hemiselulosa adalah mannan, glukan, arabinan, dan galaktan [2]. Xilan adalah heteropolisakarida kompleks. Tersusun atas ikatan kovalen dengan lignin dan ikatan non-kovalen dengan selulosa dan mempertahankan integritas struktur dari dinding sel tumbuhan [3]. Struktur dari xilan adalah rantai ikatan endo-Beta-1, 4-xylopiranosil, 4-O-metil-D-glukoronopiranosil, alpha-L-arabinofuranosil, asetil, feruloil dan p-coumaroil [4].

Xilanase adalah enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis ikatan dalam hemiselulosa, mengubah xilan menjadi xilosa [5]. Xilanase dapat diproduksi dari beberapa mikroorganisme diantaranya *Aspergillus* sp. ; *Aureobasidium* sp. ; *Bipolaris sorokinana* ; *Myrothecium verrucaria* ; *Neurospora crassa* ; *Penicillium* sp. ; *Aeromonas* sp. ; dan *Trichoderma* sp [6]. pada umumnya mikroorganisme yang banyak dipublikasikan sebagai penghasil xilanase adalah dari golongan *Aspergillus* dan *Trichoderma*. *Trichoderma viride* mempunyai keunggulan dalam memproduksi xilanase dibandingkan mikroorganisme lain, yaitu pertumbuhannya yang lebih cepat, produksi spora yang melimpah dan mampu memproduksi endoglukanase dan eksoglukanase hingga 80%. Xilanase yang dihasilkan dari golongan bakteri memiliki ketahanan temperatur yang lebih tinggi dibanding dari golongan kapang, akan tetapi aktivitas enzim xilanase dari golongan kapang jauh lebih efektif[7]

Enzim bebas adalah enzim hasil produksi dari suatu organisme yang bersifat tidak stabil terhadap lingkungan dan hanya dapat digunakan untuk satu kali reaksi. Sehingga diperlukan peningkatan efisiensi dari enzim tersebut agar dapat digunakan berulang kali. Peningkatan efisiensi tersebut dapat dilakukan dengan amobilisasi enzim. Amobilisasi enzim adalah proses pengikatan atau penjebakan enzim pada sebuah media pendukung, dengan cara menempatkan secara fisika atau kimia suatu sel, organel, enzim atau protein lainnya dalam suatu penyangga yang berupa bahan padat, matriks, atau membran. Amobilisasi bermaksud untuk

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

meningkatkan stabilitas dan membuat enzim dapat digunakan secara terus menerus.

Pada umumnya, metode amobilisasi yang digunakan adalah metode adsorbsi fisik. Metode ini didasarkan pada adsorbsi enzim oleh molekul karier yang sukar larut dalam air. Adsorbsi terjadi karena adanya interaksi fisik antara protein enzim dan permukaan dari matriksnya, yang dihasilkan dari pencampuran larutan pekat enzim dengan padatan matriks yang telah teraktivasi. Matriks yang akan digunakan dalam percobaan ini adalah bentonit yang berupa serbuk halus dan dijebak dalam Ca-Alginat.

Bentonit merupakan mineral yang mempunyai sifat plastis dan koloidal yang tinggi. Pada umumnya dikenal dua jenis bentonit yaitu Bentonit Ca dan Bentonit Na. Bentonit Ca biasa digunakan sebagai bahan penyerap. Contoh penggunaan bentonit Ca dalam bidang industri adalah sebagai pemutih minyak goreng, perekat pasir cetak dalam proses pengecoran baja, dan sebagai katalisator. Bentonit Na dapat digunakan sebagai lumpur pembilas dalam pengeboran minyak, bahan penyumbat kebocoran bendungan dan sebagainya.

Bentonit mempunyai luas permukaan spesifik 700-800m^2/gram. Cukup luas karena bentonit memiliki permukaan aktif luar dan antar lapisnya, yg merupakan 90% dari luas permukaan total. Oleh karena luas permukaannya yang besar, bentonit merupakan adsorben yang baik. Bentonit dapat membantu menarik atom H yang berikatan pada atom O didalam gugus hidroksil pada substrat. Oleh karena itu bentonit sangat menguntungkan apabila substrat yang digunakan adalah gula pereduksi. Karena gula pereduksi memiliki banyak gugus hidroksil (-OH) [37].

Metode penjebakan adalah teknik amobilisasi enzim yang paling sederhana. Bahan yang paling digunakan adalah Na-Alginat yang banyak terdapat pada beberapa rumput laut. Na-alhinat akan membentuk gel kalsium alginat apabila dicampur dengan kalsium klorida, dan terdapat enzim yang terperangkat didalammnya. Teknik penjebakan enzim dapat dilakukan dalam gel atau serat polimer.

Cara penjebakan memiliki keuntungan karena secara relatif struktur alami enzim tidak mengalami perubahan fisik, yang disebabkan oleh enzim yang tidak berikatan dengan bahan sehingga tidak terjadi perubahan konformasi enzim atau inaktivasi enzim. Akan tetapi kemungkinan untuk membentuk kompleks antara enzim dengan substrat sangat kecilm karena enzim tidak berada pada permukaan bahan pendukung.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Teknik penjebakan enzim dalam mikro kapsul berupa membran polimer semipermeabel mempunyai keuntungan daerah permukaan reaksi antara enzim-substrat cukup luas. Namun ada pula kerugiannya yaitu terjadi inaktivasi enzim selama pembuatan mikrokapsul dan dibutuhkan konsentrasi enzim yang besar, serta adanya kemungkinan enzim akan bergabung dengan dinding membran [38].

Enzim amobil didefinisikan sebagai enzim yang secara fisik dikurung atau dijebak dalam ruang tertentu dengan retensi dari aktivitas katalitiknya, sehingga dapat digunakan berulang dan secara kontinyu. Secara harfiah, enzim dimodifikasi menjadi bentuk yg tidak larut dalam air dengan teknik tertentu. [39] Sifat dari enzim amobil berbeda dengan enzim bebas dan tergantung dari metode amobilisasi dan carier alami yang tidak terlarut.

Xilanase amobil yang telah behasil dilakukan oleh penelitian sebelumnya, yaitu pada kondisi optimum amobilisasi waktu pengocokan 3 jam, jumlah xilanase teradsorbsi 0,378 mg / 0,1 g bentonit. Sedangkan aktivitas enzim ekstrak kasar pada pH 5 sebesar 8,449 unit, karena kondisi kerja optimum xilanase amobil kemungkinan akan terjadi pergeseran dari enzim bebasnya, maka perlu dilakukan penentuan kondisi optimum xilanase amobil pada substrat xilan yang meliputi variasi pH, temperatur dan waktu inkubasi. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian tentang penentuan kondisi optimum xilanase yang diamobilkan pada matriks bentonit Ca-alginat.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, rumusan masalah pada penelitian ini adalah, bagaimana kondisi optimum xilanase yang diamobilkan pada matriks bentonit Ca-alginat.

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah diatas, batasan masalah pada peneitian ini adalah :

1. Enzim xilanase yang digunakan adalah ekstrak kasar hasil isolasi dari *Trichoderma viride* dengan induser tepung klobot jagung.
2. Enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks bentonit Ca-alginat merupakan manik-manik gel.
3. Variasi pH (3; 4; 5; 6; 7), variasi temperatur (40; 50; 60; 70; 80)˚C dan variasi waktu inkubasi (40; 45; 50; 55; 60; 65) menit.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4. Kadar bentonit yang digunakan sebesar 0,1 g dalam temperatur kamar dan kecepatan pengocokan sebesar 100 rpm dalam waktu 3 jam
5. Konsentrasi xilanae sebesar 3,5 mg/mL dan alginat 3% (w/v).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui nilai aktivitas optimum dari enzim xilanase bebas dan enzim xilanase amobil pada matriks bentonit Ca-Alginat pada variasi pH, temperatur dan waktu inkubasi

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi mengenai aktivitas optimum dari enzim xilanase bebas dan enzim xilanase amobil pada matriks bentonit Ca-alginat pada variasi pH, temperatur, dan waktu inkubasi.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klobot jagung

Jagung adalah tanaman monokotil yang tergolong dalam tumbuhan biji tertutup. Jagung mempunyai siklus hidup 80-150 hari. Dalam siklus hidupnya, separuh waktu pertama adalah pertumbuhan secara vegetatif dan separuh waktu kedua adalah pertumbuhan secara generatif [8]. Tanaman jagung merupakan tanaman tingkat tinggi dengan klasifikasi sebagai berikut [8]

Kingdom	Plantae
Divisio	Spermatophyta
Sub Divisio	Angiospermae
Classis	Monocotyledone
Ordo	Graminae
Familia	Graminaceae
Genus	Zea
Species	*Zea mays L.*

Tabel 2.1 Klasifikasi Tanaman Jagung

Klobot jagung merupakan salah satu sumber xilan karena memiliki kandungan hemiselulosa yang cukup tinggi sekitar 32% [9]. Klobot jagung mampu menjadi suatu induser dalam media pertumbuhan untuk menginduksi biosintesis enzim dari mikroorganism. Komponen kimia pada klobot jagung diantaranya ialah [9] :

Komponen	**Jumlah** (%)
Serat Kasar	38
Abu	4,47
Protein Kasar	6,41
Selulosa	6,41
Lignin	6,3
Hemiselulosa	32

Tabel 2.2 Komponen Kimia pada Jagung

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2.2 Trichoderma viride

Salah satu kapang yang sering digunakan dalam menghasilkan xilanase adalah *Trichoderma viride* melalui fermentasi. Organisme ini memiliki keunggulan dari kapang lainnya yaitu pertumbuhannya yang cepat, ketahanannya pada pH asam (3,5-6,5) [10], dan dapat tumbuh maksimum pada temperatur 50-60°C [11]. Kemampuan *Trichoderma viride* dalam degradasi komponen polisakarida menjadi gula dibantu dengan enzim seperti enzim xilanase [12].

Berikut merupakan taksonomi *Trichoderma viride*:

Kingdom	Fungi
Divisio	Amastigomycota
Subdivisio	Deuteromycota
Kelas	Deuteromycetes
Ordo	Moniliales
Famili	Moniliaceae
Genus	*Trichoderma*
Spesies	*Trichoderma viride*

Tabel 2.3 Taksonomi *Trichoderma viride*

Trichoderma viride juga mampu menghasilkan enzim endo-1,4-beta-xilanase yang dapat mendegradasi xilan. Berat molekul xilanase yang dihasilkan berkisar 22 kDa [13]. Koloninya dapat diamati berrwarna putih, kekuningan, dan menjadi hijau seiring lamanya inkubasi. Pertumbuhannya cepat pada media sederhana dan tidak membutuhkan nutrisi tambahan pada prosesnya [14]

2.3 Enzim

Enzim adalah senyawa yang mampu mempercepat reaksi kimia, dan mempercepat reaksi biologis. Enzim adalah protein yang bekerja dengan cara mengikat substrat pada sisi aktif untuk mengubah substrat menjadi produk baru [15].

Enzim mampu mempercepat suatu reaksi hinga 10^{8}-10^{11} tanpa mengubah keseimbangan reaksi. Definisi dari aktivitas enzim adalah jumlah enzim yang dapat menyebabkan adanya perubahan 1 μg substrat

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

per menit pada keadaan optimum [16]. Berikut adalah beberapa faktor yang mempengaruhi kestabilan dan aktivitas enzim:

a. Aktivator dan Inhibitor

Aktivator merupakan ion yang terdiri dari koenzim, gugus prostetik dan logam yang mampu mempercepat reaksi enzimatis [17]. Sedangkan inhibitor merupakan ion yang menghambat reaksi enzimatis.

b. Derajat Keasaman (pH)

Nilai pH sangat mempengaruhi kinerja enzim. Apabila bernilai jauh dari kondisi optimum dapat menyebabkan menurunnya aktivitas dan stabilitas enzim yang dapat berakibat pada perubahan struktur enzim.

c. Konsentrasi Enzim

Apabila konsentrasi enzim bertambah maka kecepatan suatu reaksi akan meningkat. Namun hasil hidrolisis substrat akan tetap konstan meskipun konsentrasi enzim naik, hal ini disebabkan ketidak efektifan dari penambahan enzim [18].

d. Konsentrasi Substrat

Secara umum apabila konsentrasi substrat ditambah maka kecepatan reaksi akan bertambah pula, namun pada batas konsentrasi tertentu kecepatan reaksi tidak mengalami kenaikan walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Hal ini disebabkan telah terikatnya semua sisi aktif enzim sehingga hasil reaksi tidak bertambah besar meski konsentras substrat terus ditambah [18].

e. Temperatur

Temperatur rendah membuat aktivitas enzim rendah namun kestabilan strukturnya tinggi dan sebaliknya ketika temperatur tinggi aktivitas enzim tinggi namun kestabilan rendah. Apabila aktivitas enzim sisa lebih dari 50% dari enzim awal maka enzim tersebut dikatakan stabil [19]. Enzim memiliki temperatur optimum yang menyebabkan terjadinya denaturasi protein enzim apabila temperatur kerja enzim jauh diatas temperatur optimum [20]

2.3.1 Xilanase

Enzim xilanase merupakan enzim yang memiliki sifat induktif. Hal ini menyebabkan enzim xilanase membutuhkan substrat sebagai induser

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

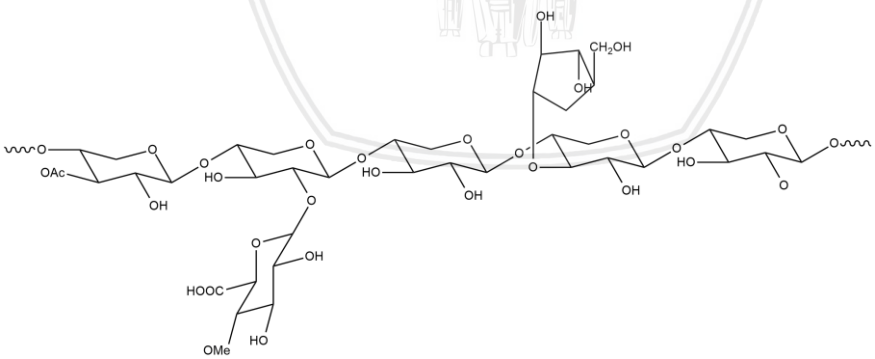
dalam media pertumbuhan. Kandungan xilan yang tinggi menjadi syarat subtrat yang digunakan dalam produksi xilanase [21].

Xilanase hasil isolasi dari bakteri diketahui aktif pada temperatur 55˚C dengan pH 9. *Trichoderma viride* merupakan mikroorganisme yang mampu menghasilkan xilanase pada temperatur tumbuh 25-30˚C, temperatur optimum 50-60˚C, pH berkisar 3.5-6.5 dan berat molekul sebesar 1.8-32.0 kDa [22].

Xilanase dari mikroorganisme jamur memiliki sifat ekstraseluler, sehingga proses ekstraksinya lebih mudah. Melalui proses fermentasi fase padat xilanase dapat diproduksi. Keuntungan dari proses yaitu biaya operasi yang lebih rendah, limbah yang dihasilkan sedikit, prosesnya sederhana, wadah yang diperlukan dalam jumlah kecil, media produski dapat menggunakan residu agroindustri dan konsentrasi produk enzim tinggi [23].

2.4 Xilan

Xilan adalah salah satu komponen terbesar dalam susunan hemiselulosa sel tumbuhan dan termasuk polisakarida paling berlimpah, karena didalam sel tanaman terdapat 20-30% xilan sebagai komponen penyusunnya. [24]. Xilan memiliki struktur yang berbeda-beda pada setiap tanaman. Pada dasarnya tersusun dari gula pereduksi dengan lima atom karbon (1,4-D-xilopiranosil) dengan rantai samping tersubstitusi dengan gugus asetil 4-O-metil-D-glukoronosil dan alpha-arabinofuranosil [25]



Gambar 2.1 Struktur Xilan [26]

2.5 Isolasi Enzim

Isolasi enzim adalah proses pengambilan enzim dari suatu sel secara fisik atau kimia dengan cara menghancurkan dinding sel [27]. Isolasi enzim dapat dilakukan secara intraseluler maupun ekstraseluler. Isolasi enzim intraseluler harus memecah dinding sel terlebih dahulu, sedangkan isolasi enzim ekstraseluler hanya menempatkan mikroorganisme penghasil enzim pada media cair yang kemudian dipisahkan dengan metode sentrifugasi atau filtrasi [28].

Metode isolasi enzim yang sering digunakan adalah ekstraksi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi, dan kromatografi.

a. Ekstraksi

Metode ekstraksi enzim ditentukan oleh jenis sumbernya. Enzim yang terdapat pada tepung biji-bijian diekstraksi dengan cara mencampur pada media cair kemudian diaduk, enzim dari bagian tanaman yang bersifat lunak diekstraksi dengan dipotong kecil-kecil, dipres kemudian disaring dengan kain, sedangkan untuk mengekstrak enzim dari daun dan biji-bijian dengan cara digiling, dihomogenasi dalam media cair atau langsung diblender dalam media cair. Dalam ekstraksi enzim dari tanaman digunakan bufer untuk mempertahankan harga pH. Beberapa pH yang dapat digunakan misal: bufer tris-hidroksimetil amino metan, bufer glisin dan bufer fosfat.

b. Filtrasi

Dasar pemisahan adalah ukuran partikel. Efisiensinya dibatasi oleh:

- Bentuk partikel
- Kemampuan partikel menahan tekanan
- Kekentalan fasa cair

c. Sentrifugasi

Metode sentrifugasi merupakan cara pemisahan enzim dari partikel-partikel lain yang tidak dikehendaki. Semakin kecil partikel, kecepatan sentrifugasi yang diperlukan semakin besar. Pemisahan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatant merupakan cairan yang berisi enzim. Dasar pemisahan secara sentrifuge yaitu:

- Perbedaan antara fasa cair dan padat
- Ukuran partikel

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

- Berat jenis partikel
- Berat jenis larutan
- Jari-jari sentrifuge.

2.6 Amobilisasi enzim

Amobilisasi enzim adalah proses pengikatan atau penjebakan enzim pada sebuah media pendukung. Amobilisasi dalam bioteknologi didefinisikan sebagai suatu cara yang digunakan untuk menempatkan secara fisika atau kimia suatu sel, organel, enzim atau protein lainnya ke dalam suatu penyangga berupa bahan padat, matriks, atau membran. Amobilisasi dilakukan dengan maksud untuk meningkatkan stabilitas dan membuat enzim dapat digunakan secara terus menerus [29].

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *Carrier binding.* Metode ini didasarkan atas pengikatan enzim langsung pada zat pembawa yang tidak larut dalam air. Metode ini dapat dibedakan menjadi 3 macam yaitu [30]:

1). Metode adsorbsi fisik

Berdasarkan pada adsorbsi fisik dari protein enzim pada permukaan pembawa yang tidak larut dalam air. Metode ini menjelaskan adanya interaksi fisik antara protein enzim dan matriks permukaan, cara menghasilkannya yaitu dengan mencampur larutan pekat enzim dengan padatan tersebut. Metode ini memiliki kekurangan yaitu enzim yang diserap dapat bocor dari pembawa selama pemanfaatan karena gaya ikat antara protein dan pembawa lemah.

2) Metode pengikatan ionik

Berdasarkan pada pengikatan ionik dari protein enzim pada pembawa yang tidak larut dalam air yang mengandung residu penukar ion. Kebocoran enzim dari pembawa dapat terjadi dalam larutan substrat dengan kekuatan ionik yang tinggi atau pada variasi pH.

3) Metode pengikatan kovalen

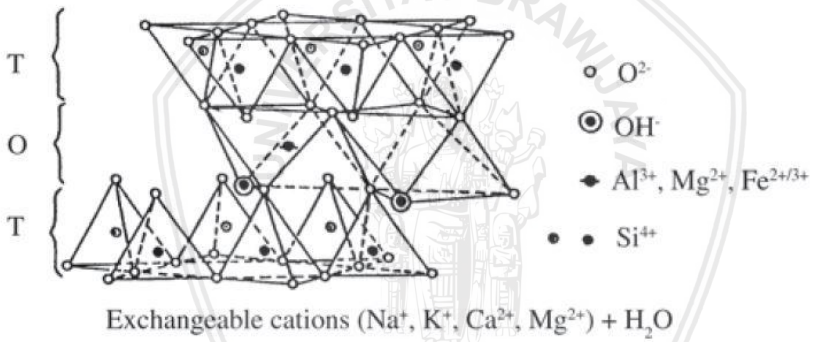
Berdasarkan pada pengikatan enzim dan pembawa yang tidak larut dalam air dengan ikatan kovalen. Metode ini memerlukan kondisi reaksi yang sulit dan biasanya tidak dalam keadaan suhu ruang. Pada beberapa keadaan, ikatan kovalen mengubah bentuk konformasi dan pusat

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

aktif enzim yang mengakibatkan kehilangan aktivitas atau perubahan spesifitas aktivitas.

2.6.1 Matriks pengamobil (bentonit Ca-Alginat).

Pada penelitian ini dilakukan amobilisasi endim dengan menggunakan matriks bentonit dan Ca-Alginat sebagai adsorben. Kandungan dalam bentonit ialah montmorillonit sebesar 71% dan mineral lainnya seperti kaolonit, klorit, illite dan kuarsa [31]. Bentonit adalah mineral lempung yang banyak mengandung montmorillonit dengan rumus kimia ($AL_2O_3.4SiO_2$ x H_2O). Montmorillonit tersusun atas tiga lapisan yaitu satu lapisan alumina oktahedral (AlO_6) dan dua lapisan silika tetrahedral (SiO_4). Diantara lapisan oktahedral dan tetrahedral terdapat kation dengan valensi 1atau2, seperti Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Al^{2+}, Fe^{2+}, dan Si^{4+} [32].



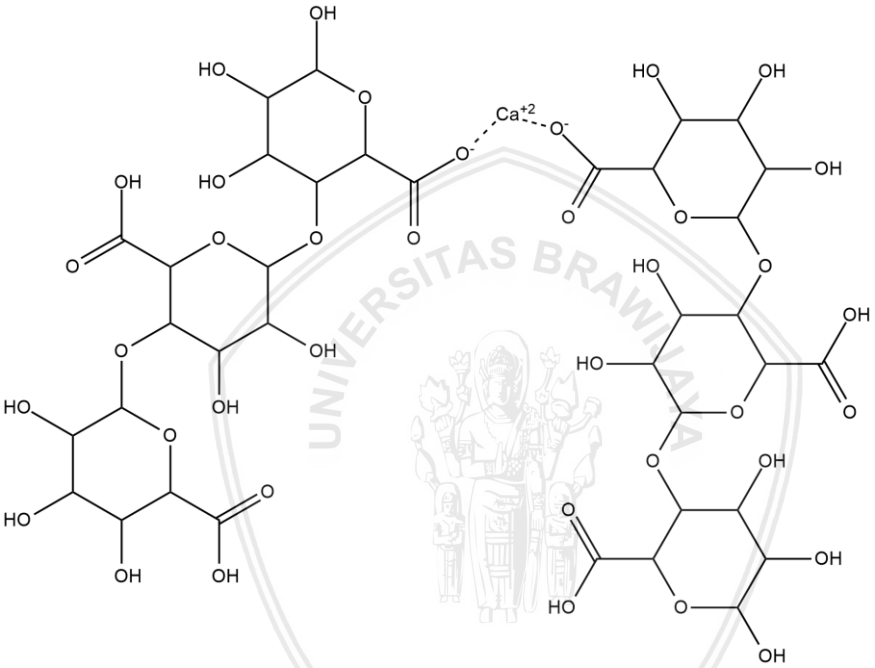
Gambar 2.2 Struktur montmorillonite [33].

Bentonit banyak digunakan dalam reaksi katalis, proses adsorbsi, dan sebagai resin penukar ion karena dianggap sangat efektif sebagai adsorben dengan kapasitas yang sangat besar dalam adsorbsi yang dimilikinya. Karakteristik dari bentonit adalah mampu mengikat ion positif secara selektif dalam larutan polar sehingga dalam waktu yang sama mineral ini dapat menukar ion. Bentonit mampu menarik ion-ion H^+ dari lingkungannya. Sehingga dapat membantu mempercepat reaksi [34].

Matriks kedua yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Ca-Alginat. Matriks ini memiliki sifat pembentukan gel yang kokoh, dan tidak beracun. Namun karena enzim masih bisa terdifusi keluar dari

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

matriks melalui pori yang terbentuk dari gel alginat dengan ion kalsium, penggunaannya dapat dilapisi dengan larutan bentonit dan diikat silang dengan natrium tripolifosfat untuk meminimalisisir proses difusi yang dapat terjadi. Matriks Ca-Alginat yang terlapisi bentonit merupakan metode mikroenkapsulasi yang bertujuan untuk meminimalisir proses difusi. Berikut adalah struktur dari gel Ca-alginat.



Gambar 2.3 Struktur Ca-alginat

Enzim amobil adalah enzim yang secara fisik dibatasi geraknya atau ditempatkan pada suhu ruan guntuk mempertahankan katalitiknya dan dapat digunakan secara berulang[39]. Teknik amobilisasi enzim adalah teknik yang digunakan agar enzim tidak bergerak, baik melalui pengikatan pada padatan pendukung maupun penjebakan pada matriks.

Sifat dari enzim amobil berbeda dengan enzim bebas dan tergantung dari metode amobilisasi dan carier alami yang tidak terlarut. Penurunan aktivitas spesifik muncul saat enzim diamobilisasi, sebagian proses kimia dilibatkan saat kondisi yang mungkin menyebabkan

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

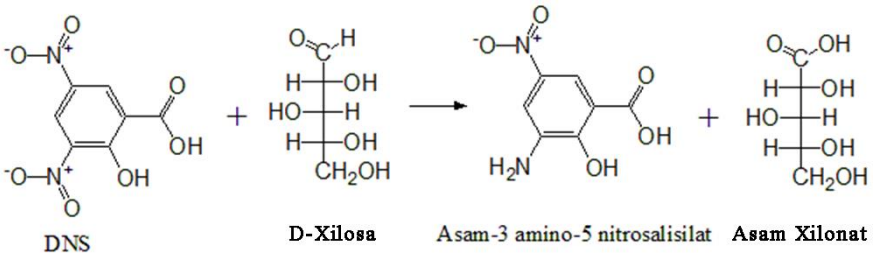
denaturasi. Carier akan membentuk lingkungan mikro baru bagi enzim dan hal tersebut dapat mempengaruhi aktivitas dalam langkah yang berbeda. Karakteristik enzim dapat berubah apabila sisi aktif enzim mengalami perubahan konformasi sebagai hasil interaksi antara enzim dan carier. Carier dapat mempengaruhi karakteristik enzim dengan membentuk rintangan sterik dengan pencegahan difusi bebas dari substrat ke semua molekul enzim atau dengan membentuk interaksi elektrostatik dengan molekul substrat atau produk. [40]

Sedangkan menurut Pommersheim [41], enzim yang diamobilkan akan mengalami perubahan komposisi yang dimungkinkan mengakibatkan berkurangnya katalitik enzim tersebut.

Stabilitas enzim pada pemanasan atau pengimpanan dapat meningkat, menurun atau tetap sama saat diamobilisasi tergantung bagaimana lingkunagan mikro baru mempengaruhi kecenderungan perubahan sifat [40].

2.7 Penentuan Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan unit. Satu unit aktivitas enzim adalah jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mengubah 1 µmol substrat menjadi sebuah produk dalam waktu satu menit pada temperatur dan pH ptimum [35]. Penentuan unit aktivitas xilanase dilakukan dengan mengamati kadar gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat enzim [19]. Reagen DNS (asam dinitrosalisilat) dapat digunakan untuk penentuan gula pereduksi secara sepktrofotometri. Reagen DNS digunakan karena lebih mudah, cepat dan memiliki sensitivitas yang tinggi. Ketika xilanase menghidrolisis substrat xilan menjadi xilosa, xilosa akan mereduksi DNS yang menghasilkan senyawa asam-3-amino-5-nitrosalisilat yang berwarna merah kecoklatan. Sedangkan xilosa akan teroksidasi menjadi asam xilonat.



Gambar 2.4 Reaksi Xilosa dengan Reagen DNS

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Produk xilosa dapat dihitung secara spektrofotometri dengan reagen DNS. Kompleks warna yang terbentuk nilai absorbansinya bisa dibaca pada instrumen spektrofotometri Uv-Vis. Pembacaan dilakukan pada panjang gelombang 480-550 nm, setelah itu absorbansi yang diperoleh diplotkan terhadap kurva standar xilosa untuk mengetahui besarnya unit aktivitas yang terdapat pada ekstrak kasar [36]

2.8 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah kondisi optimum xilanase yang teramobilkan pada matrik bentonit Ca-alginat tidak selalu sama dengan enzim bebasnya.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari hingga Mei 2018.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu beberapa alat gelas kaca seperti tabung reaksi, gelas arloji, corong, spatula, thermometer, kuvet spektrofotometer, pipet tetes, pipet mikro 0,5 dan 1,0 µL, pipet ukur 10 mL, labu ukur berukuran 10 mL, 25 mL, 100 mL, Elenmeyer 250 mL, gelas kimia 100 mL, 250 mL, 500L. Serta peralatan non-kaca seperti blender, grinder, gunting, statif, magnet stirer, botol semprot, aluminium foil, kertas coklat, jarum ose, oven, neraca analitik, kertas saring Whatman no. 40, pemanas, autoklaf, Laminar air flow, inkubator, kapas, kasa steril, bunsen, saringan 120 mesh dan 150 mesh, kulkas, pemanas air, *sentrifuge*, *shaker*, pH meter, Spektronik 20 dan instrumen FT-IR, dan *shaker*.

3.2.2 Bahan Penelitian

Pada penelitian ini, digunakan bahan yang memiliki kualitas pro analis (p.a). Bahan-bahan tersebut meliputi CH3COONa, KH2PO4, NaOH, NaKC4O6H4 (NaK-tartrat), CuCl2, ZnCl2, MnCl2.4H2O, MgSO4.7H2O, FeSO4.7H2O, (NH4)2SO4, CaCl2, asam asetat glacial, urea, glukosa anhidrat, DNS (asam dinitrosalisilat), reagen biuret, fenol, dextrose, Ca-alginat, dan Bentonit.

Bahan-bahan lain yaitu biakan murni Trichoderma viride, pepton, kasein, tepung agar, tween-80, alkohol 70%, alkohol 96%, aquadest, spirtus, dan klobot jagung.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan tepung klobot jagung
2. Pembuatan media padat
3. Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4. Pembuatan media cair
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi dan isolasi enzim
7. Penentuan kurva baku standar
    - Penentuan panjang gelombang maksimum gula pereduksi
    - Pembuatan kurva baku gula pereduksi
    - Penentuan panjang gelombang maksimum larutan kasein
    - Penentuan kurva baku larutan kasein
8. Penentuan aktivitas xilanase bebas dan kadar protein awal
    - Uji aktivitas xilanase bebas
    - Pengukuran aktivitas xilanase bebas
    - Penentuan kadar protein awal
9. Amobilisasi xilanase pada matriks bentonit Ca-Alginat
10. Uji kadar protein sisa
11. Penentuan aktivitas xilanase amobil
12. Uji pengaruh pH, temperatur dan waktu inkubasi pada aktivitas enzim xilanase bebas dan amobil
    - Penentuan pengaruh pH terhadap aktivitas xilanase bebas dan amobil
    - Penentuan pengaruh temperatur terhadap aktivitas xilanase bebas dan amobil
    - Penentuan pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas xilanase bebas dan amobil
13. Analisis data

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Pembuatan Tepung Klobot jagung

Klobot jagung yang segar dijemur terlebih dahulu hingga kering, kemudian dicuci dengan aquades dan dikering anginkan kembali. Klobot jagung dikeringkan dengan oven pada temperatur 100˚C. Setelah kering, klobot jagung dipotong menjadi ukuran lebih kecil menggunakan *grinder* kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk kasar. Serbuk kasar tersebut kamudian di ayak menggunakan ayakan 150 mesh untuk mendapatkan tekstur yang lebih halus. Serbuk halus yang lolos dalam proses penyaringan akan disimpan dan digunakan sebagai induser.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

3.4.2 Pembuatan Media Padat

Media padat yang digunakan adalah *Potatoes Dextrose Agar* (PDA). Kentang segar dicuci, dikupas dan ditimbang sebanyak 20 g, kemudian kentang dipotong hingga kecil dan dicuci dengan aquades. Kentang yang sudah berukuran kecil dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL, ditambahkan aquades hingga volumenya mencapai 100 mL, setelah itu dipanaskan selama ± 1 jam dan dijaga agar volumenya tetap 100 mL hingga sari kentang terbentuk.

Sari kentang lalu disaring menggunakan kertas saring ke gelas kimia berukuran 100 mL, lalu ditambahkan 2g dextrose, 1 mL buffer asetat (0.2 M) pH 5, kemudian dipanaskan hingga larutan mendidih dan ditambahkan 1.5 g tepung agar, dan dijaga agar volumenya tetap 100 mL hingga PDA terbentuk.

Larutan PDA dimasukkan kedalam beberapa tabung reaksi masing-masing sebanyak ± 3 mL dan ditutup dengan kapas steril yang ditutup kertas coklat. Kemudian, larutan PDA disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121˚C dengan tekanan 15 psi. Larutan PDA steril didinginkan pada temperatur ruang dengan posisi miring selama 24 jam, kemudian disimpan di dalam lemari pendingin.

3.4.3 Peremajaan Biakan Murni *Trichoderma viride*

Peremajaan dilakukan di dalam *laminar air flow* yang telah steril dengan cara dipanaskannya mulut tabung reaksi biakan *Trichoderma viride* dan mulut tabung media padat dengan nyala api bunsen agar steril. Kemudian spora *Trichoderma viride* diambil dengan jarum ose steril sebanyak satu mata ose dan dipindahkan ke dalam media padat PDA steril secara aseptis, lalu tabung reaksi segera ditutup kembali dengan kapas steril yang dilapisi kertas coklat dan diinkubasi selama 6 hari (144jam) di dalam *inkubator* pada temperatur 30˚C.

3.4.4 Pembuatan Media Cair

Media cair dapat dibuat dengan ditimbang terlebih dahulu bahan-bahan yang digunakan diantaranya 0,036 g KH_2PO_4, 0,054 g urea, 0,09 g pepton, 0,054 g $CaCl_2$, 0,252 g $(NH_4)SO_4$, 0,036 g tween-80, 0,054 g $MgSO_4.7H_2O$, dan 0,9 g tepung klobot jagung. Bahan tersebut dimasukkan kedalam gelas kimia 250 mL dan ditambahkan 0,18 mL unsur renik, serta ditambah aquades hingga volumenya 180 mL. Selanjutnya campuran ditambahkan 1 mL buffer asetat (0,2 M) pH 5,

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Kemudian ditutup dengan kapas steril dan dilapisi kertas coklat. Campuran disterilkan di dalam autoklaf dengan temperatur 121˚C dan tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.4.5 Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan di dalam *laminar air flow* agar tidak terjadi kontaminasi mikroorganisme lain. Spora dari biakan murni *Trichoderma viride* yang berumur 6 hari ditambahkan 1mL *aquadest* steril,kemudian spora dilarutkan dalam *aquadest* dengan bantuan jarum ose, dan dipindahkan secara aseptis ke dalam media cair steril 25 mL. Selanjutnya diinkubasi dengan menggunakan *shaker* selama 36 jam (setengah fase log) dengan kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang hingga inokulum pertama siap digunakan.

Kemudian inokulum kedua dibuat dengan pengambilan sebanyak 5 mL dari inokulum pertama yang dihasilkan dan dipindahkan secara aseptis ke media cair steril sebanyak 50 mL pada 4 elenmeyer berbeda. Tahap terakhir yaitu dilakukan inkubasi kembali di temperatur ruang selama 36 jam dengan menggunakan *shaker* pada kecepatan 100 rpm.

3.4.6 Produksi dan Isolasi Enzim

Erlenmeyer 250 mL sebanyak 8 buah masing-masing diisi media cair steril sebanyak 180 mL, lalu 18 mL inokulum ditambahkan secara aseptis ke dalam setiap erlemeyer. Selanjutnya diinkubasi selama 60 jam (awal fase stasioner) dengan *shaker* kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang dan digunakan metode sentrifugasi untuk mengisolasi enzim. Setiap media produksi yang telah diinkubasi ditambah larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 sebanyak 15 mL kemudian disentrifugasi dingin selama 30 menit dengan kecepatan 3.000 rpm pada temperatur 4˚C. Ekstrak kasar enzim xilanase merupakan hasil dari supernatan yang diperoleh.

3.4.7 Penentuan kurva baku standar

a) Penentuan panjang gelombang maksimum gula pereduksi

Tabung reaksi diisi dengan larutan xilosa 300 µg/mL sebanyak 1 mL, ditambahkan buffer asetat (0,2M) pH 5 sebanyak 1 mL, dan ditambahkan reagen DNS sebanyak 2 mL. Kemudian larutan dipanaskan selama 5 menit dalam penangas air mendidih dan didinginkan dengan air mengalir. Larutan dipindah ke dalam labu ukur 25 mL lalu ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan blanko yang

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

digunakan ialah aquades, buffer asetat dan reagen DNS dengan diberikan perlakuan yang sama seperti sampel. Absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Geneys 20* pada kisaran panjang gelombang 480-530 nm. Hasil yang diperoleh dicatat dan nilai absorbansi paling besar digunakan sebagai panjang gelombang maksimum (λ_{maks}).

b) Pembuatan kurva baku gula pereduksi

Padatan serbuk xilosa ditimbang sebanyak 0,15 g, kemudian dimasukan ke dalam gelas kimia 100 mL, digunakan pelarut aquades secukupnya untuk melarutkan padatan, lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas, dihomogenkan dan diperoleh larutan stok xilosa 1500 µg/mL.

Larutan xilosa sebanyak (2; 2,67; 3; 3,33; 3,67; 4; 4,33; 5; 6; 6,8; 8) mL dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas, dihomogenkan dan diperoleh larutan xilosa (300, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 750, 900, 1000, 1200) µg/mL. Selanjutnya larutan xilosa masing-masing dipipet sebanyak 1 mL, dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berbeda, ditambahkan larutan buffer asetat (0,2M) pH 5 sebanyak 2 mL dan reagen DNS sebanyak 2 mL. Kemudian dipanaskan selama 5 menit di dalam penangas air mendidih dan didinginkan pada air yang mengalir. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dihomogenkan. Absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Geneys 20* pada panjang gelombang (λ_{maks}). Hasil yang diperoleh dibuat kurva baku gula pereduksi sebagai hubungan antara konsentrasi larutan xilosa (µg/mL) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

c) Penentuan panjang gelombang maksimum larutan kasein

Larutan kasein 5000 µg/mL dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 sebanyak 2 mL dan reagen biuret sebanyak 8 mL, diinkubasi selama 30 menit di dalam penangas air pada temperatur 50 ˚C. Absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Geneys 20* pada panjang gelombang sekitar 460-640 nm dan hasil yang diperoleh dicatat. Dipilih panjang gelombang yang menghasilkan nilai absorbansi tertinggi kemudian digunakan sebagai panjang gelombang pengukuran selanjutnya.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

d) Pembuatan kurva baku larutan kasein

Padatan kasein ditimbang sebanyak 1 g, dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 mL di dalam gelas kimia 100 mL, diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dan ditambahkan larutan NaOH 0,1 M beberapa tetes hingga seluruh padatan larut. Selanjutnya larutan dipindah ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah aquades hingga tanda batas, dihomogenkan dan diperoleh larutan stok kasein 10000 µg/mL.

Larutan stok dipipet dengan volume sebanyak (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) mL**,** dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambah aquades hingga tanda batas, dihomogenkan, dan diperoleh larutan kasein (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000) µg/mL. Setiap masing-masing konsentrasi larutan kasein dipipet dengan volume sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 sebanyak 5 mL dan reagen biuret sebanyak 8 mL. Selanjutnya dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit di dalam penangas air pada temperatur 50˚C dan didinginkan dengan dibiarkan pada temperatur ruang. Absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Geneys 20* pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) dan hasil yang diperoleh lalu digunakan untuk membuat kurva baku kasein sebagai hubungan antara konsentrasi kasein (µg/mL) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y

3.4.8 Penentuan Kadar Protein Awal

a) . Uji aktivitas xilanase bebas

Pengukuran jumlah senyawa pereduksi yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis substrat xilan digunakan dalam penentuan aktivitas xilanase. Sebanyak 1 mL substrat xilan 1% (b/v) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dipanaskan ke dalam penangas air dengan temperatur 60˚C selama 15 menit. Kemudian ditambahkan enzim xilanase hasil pemurniaan sebanyak 1 mL, larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 sebanyak 1 mL, dan air bebas reduktor sebanyak 1 mL. Setelah itu, diinkubasi selama 55 menit ke dalam penangas air pada temperatur 60˚C. Selanjutnya ditambahkan reagen DNS sebanyak 2 mL dan dipanasan kembali selama 5 menit di dalam penangas air dan didinginkan dengan air mengalir. Tahap akhir yaitu larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambah aquades hingga tanda batas, dan dihomogenkan. Absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Geneys 20* pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) dan hasil yang diperoleh dicatat.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

b) Pengukuran aktivitas xilanase bebas

Enzim bebas didalamnya memiliki aktivitas yang dinyatakan dalam satuan unit. Setiap satu unit aktivitas merupakan satu µg xilosa yang dihasilkan per menit oleh setiap mg enzim tersebut. Aktivitas xilanase dapat diukur dengan memplotkan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva baku gula pereduksi sehingga akan diperoleh konsentrasi gula pereduksi dari hasil hidrolisis substrat xilan oleh enzim xilanase. Persamaan yang digunakan untuk menentukan satu unit aktivitas enzim adalah sebagai berikut:

$$AE = \frac{x \times v \times fp}{p \times q} \qquad \text{..... (\textbf{Persamaan 3.1})}$$

Keterangan:

AE = aktivitas enzim (µg. mL^{-1}.$menit^{-1}$)
x = konsentrasi gula pereduksi (µg. mL-1)
v = volume total sampel (mL)
fp = faktor pengenceran
p = volume ekstrak kasar enzim xilanase (mL)
q = waktu reaksi (menit)

c) Uji Kadar Protein awal

Tabung reaksi diisi dengan ekstrak kasar enzim xilanase sebanyak 2 mL, ditambahkan larutan kasein 5000 µg/mL sebanyak 2 mL, dan reagen biuret sebanyak 8 mL. Selanjutnya dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit di dalam penangas air pada temperatur 50˚C. Absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Geneys 20* pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) dan kadar protein awal diketahui dengan cara memplotkan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva baku kasein.

3.4.9 Amobilisasi Xilanase pada Matriks Bentonit Ca-Alginat

a) Preparasi matriks bentonit

Mineral bentonit dihaluskan dengan cara ditumbuk lalu diayak dengan ayakan 120 mesh, padatan yang lolos diayak kembali denga ayakan 150 mesh dan padatan yang tertahan di ayakan 150 mesh digunakan sebagai matriks amobilisasi. Selanjutkan padatan dicuci

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

dengan aquades, disaring dan dikeringkan pada temperatur 100˚C di dalam oven.

b) Aktivasi matriks bentonit

Mineral bentonit yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL sebanyak 10 g, ditambahkan larutan HCl 0,4 M sebanyak 200 mL, dikocok selama 3 jam pada temperatur menggunakan shaker dengan kecepatan 100 rpm. Selanjutnya disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan aquades hingga pH filtrat netral. Kemudian bentonit yang teraktivasi dikalsinasi di dalam tanur selama 4 jam pada temperatur 500˚C.

c) Preparasi larutan Na-Alginat

Padatan Na-Alginat sebanyak 3 g dilarutkan dengan aquades secukupnya di dalam gelas kimia 250 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades sebanyak 100 mL dan dipanaskan hingga larut sempurna di dalam penangas air lalu didinginkan.

d) Amobilisasi xilanase pada matriks bentonit teraktivasi

Ekstrak kasar xilanase dipipet sebanyak 2,8 mL kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 25 mL, ditambah larutan buffer asetat pH 5 hingga volume total 5 mL, ditambah padaran bentonit teraktivasi sebanyak 0,1 g. Setelah itu campuran dishaker selama 3 jam pada kecepatan 100 rpm dan filtrat diuji kadar protein sisanya.

e) Pembuatan Matriks Bentonit Ca-Alginat

Endapan matriks bentonit yang diperoleh kemudian dicampurkan kedalam 4mL larutan Na-Alginat yang berada dalam syringe 10mL dan diaduk hingga merata. Kemudian jarum dibuka dan larutan Na-Alginat dibiarkan menetes kedalam larutan $CaCl_2$ dalam gelas kimia 100mL. Setelahnya manik manik yang terbentuk dibiarkan dalam larutan $CaCl_2$ selama 1 jam.

3.4.10 Uji Kadar Protein Sisa

Filtrat hasil amobilisasi enzim dipipet sebanyak 2 mL, ditambahkan larutan kasein 5000 ppm sebanyak 2 mL, ditambah reagen biuret sebanyak 8 mL, dihomogenkan dan diinkubasi pada temperatur 50˚C selama 30 menit. Kemudian didinginkan pada temperatur ruang dan

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Geneys 20* pada panjang gelombang maksimum 540 nm kasein sehingga diketahui kadar protein sisa dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regeresi kurva standar kasein.

3.4.11 Penentuan Aktivitas Xilanase Amobil

Subtrat xilan 1% sebanyak 1 mL dicampur dengan larutan buffer asetat 0,2 M pH 5 sebanyak 1 mL, enzim xilanase amobil sebanyak 0,1 g, dan 1 mL air bebas reduktor. Setelah itu diinkubasi selama 55 menit pada temperatur 60˚C. Kemudian ditambah reagen DNS sebanyak 2 mL dan disaring dengan kertas saring. Larutan campuran kemudian diencerkan hingga volumenya 25 mL dengan aquades. Absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Geneys 20* pada panjang gelombang 485 nm dan hasil yang diperoleh dicatat untuk pembuatan kurva aktivitas xilanase amobil sehingga diperoleh panjang gelombang optimum pula.

3.4.12 Uji Pengaruh pH, Temperatur dan Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Amobil

a) Penentuan pH Optimum Terhadap Aktivitas Xilanase Bebas dan Amobil

Penentuan aktivitas enzim bebas dan enzim amobil dilakukan dengan variasi pH dilakukan dengan cara menginkubasi xilanase amobil pada variasi pH sebesar 3, 4, 5, 6 dan 7. Sebanyak 35 tabung reaksi disiapkan terlebih dahalu, 15 tabung reaksi diberi keterangan A (untuk enzim bebas) dan 15 tabung reaksi sisa diberi keterangan B (untuk enzim amobil), dan 5 tabung untuk membuat blanko pH 3-7. Kemudian sebanyak 1 mL substrat xilan 1% (b/v) diinkubasi selama 15 menit pada temperatur 60˚C. Kemudian untuk tabung A ditambahkan 1 mL enzim bebas dan tabung B ditambahkan 0,1g manik-manik gel enzim amobil. Masing-masing tabung kemudian ditambah larutan buffer asetat (0,2 M) yang berbeda dengan pH (3-7) sebanyak 1 mL dan air bebas reduktor sebanyak 1 mL. Setiap campuran diinkubasi selama 55 menit dalam penangas air pada temperatur 60˚C. Kemudian untuk tabung B disaring dengan kertas saring untuk menghentikan hidrolisis sedangkan tabung A dipanaskan kembali pada air mendidih selama 15 menit. Setelah itu seluruh tabung ditambah reagen DNS sebanyak 2 mL dan dipanaskan kembali dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Didinginkan dengan air mengalir hingga temperatur ruang, setiap tabung, kemudian

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

dipindah ke dalam labu ukur 25 mL dan diencerkan dengan aquades hingga tanda batas. Absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Geneys 20* pada panjang gelombang optimum yang ada di penentuan aktivitas xilanase amobil dan hasil yang diperoleh dicatat.

b) Penentuan Pengaruh Temperatur Optimum Terhadap Aktivitas Xilan Bebas dan Xilanase Amobil

Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan variasi temperatur pada 40, 50, 60, 70 dan 80˚C dengan sampel enzim xilanase bebas (A) dan manik-manik gel enzim xilanase (B) pada pH optimum yang diperoleh.

c) Penentuan Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Kestabilan Aktivitas Xilan Bebas dan Xilanase Amobil

Hasil yang diperoleh dari uji aktivitas enzim xilanase bebas dan amobil pada pH dan temperatur optimum digunakan untuk menentukan waktu inkubasi optimum dengan variasi waktu inkubasi selama (40; 45; 50; 55; 60; 65) menit.

3.4.13 Analisis Data

Data aktivitas enzim xilananse bebas dan enzim xilanase amobil pada matrik Ca-Alginat yang dipengaruhi oleh variasi pH, temperatur dan lama penyimpanan dianalisis menggunakan program SPSS 17.00 dengan uji ANOVA satu arah, dan dilanjutkan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) 5%.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Produksi dan Isolasi Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride*

Enzim xilanase merupakan enzim yang memiliki peran untuk menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Produksi xilanase dapat dilakukan secara fermentasi menggunakan kapang, bakteri, maupun ragi [6]. Salah satunya dengan menggunakan kapang *Trichoderma viride* yang diremajakan pada media padat PDA.

Mikroba yang ditumbuhkan pada media cair akan mengalami beberapa fase untuk beradaptasi dengan lingkungannya. Hal ini dikarenakan terbatasnya nutrisi didalam media cair tersebut. Fasee-fase tersebut dapat dilihat dengan menggunakan kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan merupakan kurva yang menggambarkan fase pertumbuhan dari suatu mikroorganisme dan perilakunya yang bertujuan untuk mengetahui waktu panen paling baik. fase-fase tersebut diantaranya fase lag atau fase penyesuaian sel-sel terhadap lingkungannya, fase eksponensial, merupakan fase sel melakukan perbanyakan jumlah serta aktivitas sel pada fase ini sangat meningkat. Fase eksponensial menjadi fase yang sangat penting bagi kehidupan kapang. Fase stasioner atau fase dimana jumlah sel yang tumbuh hampir sama dengan jumlah sel yang mati. Senyawa metabolit sekunder juga dihasilkan pada fase ini. Selanjutnya yaitu fase kematian dipercepat dimana jumlah sel yang mati ditingkatkan.

Pada produksi enzim diperlukan biakan aktif (inokulum) agar diperoleh hasil yang maksimal. Sehingga trichoderma viride yang telah diremajakan ditumbuhkan pada media cair hingga pertengahan fase log. Pada fase tersebut sel telah siap memproduksi enzim. Produksi xilanase dilakukan hingga akhir fase log, karena jumlah Trichoderma viride telah maksimal sehingga xilanase yang dihasilkan banyak. Isolasi enzim dilakukan dengan menggunakan sentrifugasi dingin dengan tujuan mengendapkan partikel dengan berat yang lebih besar dan mencegah denaturasi enzim karena panas. Komponen yang mengendap tersebut adalah sisa dari *Trichoderma viride* dan supernatant yang diperoleh

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

merupakan ekstrak kasar enzim xilanase. Ekstrak kasar yang diperoleh sekitar 1,4 Liter dari 1,56 Liter media produksi.

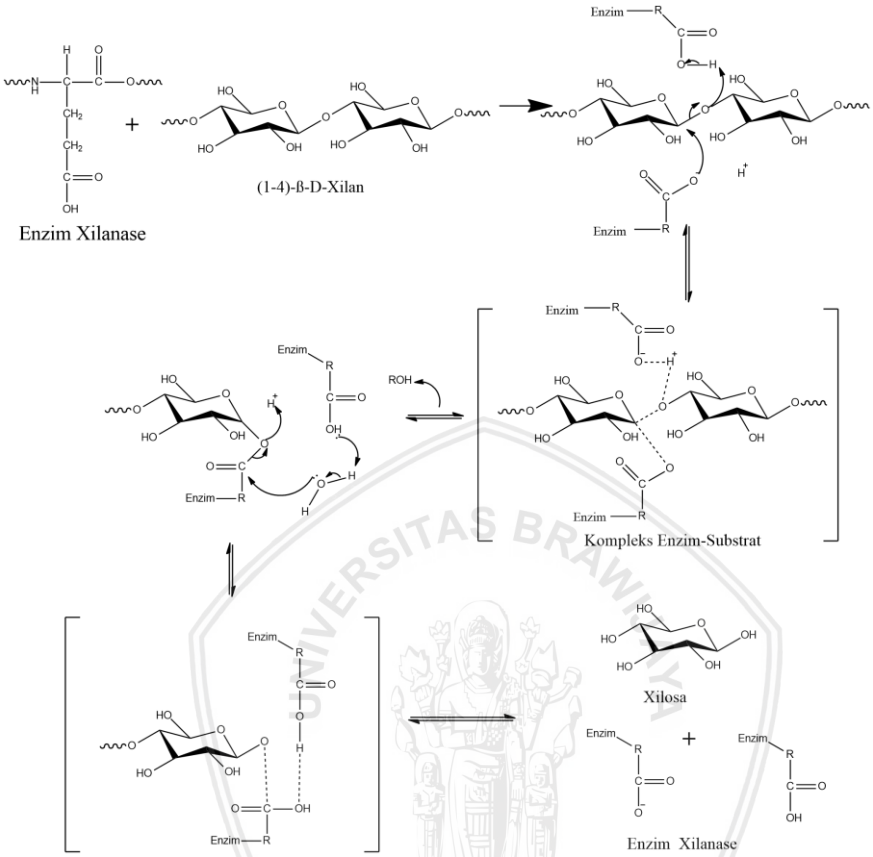
4.2 Amobilisasi Enzim Xilanase Pada Matriks Bentonit Ca-Alginat

Amobilisasi adalah metode untuk menempelkan enzim pada matriks agar enzim tidak mudah larut didalam air [9], dan bertujuan untuk menambah efisiensi enzim sehingga dapat digunakan secara berulang. Pada penelitian sebelumnya diketahui konsentrasi optimum xilanase untuk diamobilkan sebesar 3,5 mg/mL dan konsentrasi alginat optimum sebesar 3%. Hasil dari penelitian ini diperoleh kadar protein 6,915 mg. Aktivitas xilanase menggunakan satuan $\mu g.mg^{-1}.menit^{-1}$ yang artinya berapa besar jumlah gula pereduksi (xilosa) yang dihasilkan oleh enzim xilanase per menitnya. Berikut adalah reaksi mekanisme pembentukan xilan menjadi xilosa.

Reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa terjadi karena gugus karboksil pada rantai samping residu asam amino aspartat mengalami ionisasi. Kemudian terbentuklah ion karboksilat yang menyerang ikatan glikosidik atom C_1 pada Xilan. Atom H dari gugus karboksil residu asam amino glutamat menerima Pasangan elektron bebas dari atom O sehingga membentuk kompleks enzim-substrat. Kemudian Kompleks enzim-substrat akan di hidrolisis oleh H_2O yang menyebabkan ikatan hidrogen dalam kompleks enzim-substrat terputus sehingga terbentuklah xilosa dan enzim xilanase

Pada penelitiann ini enzim xilanase diamobilkan menggunakan bentonit dengan metode penjebakan dalam alginat. Keberhasilan metode ini diketahui dari distribusi enzim dalam matriks polimer. Hal ini dapat diatur dengan membedakan perbandingan enzim-matriks polimer pada saat pencampuran. Kontak antara enzim dengan substrat dapat ditingkatkan dengan mengatur ukuran pori-pori gel. Konsentrasi matriks polimer sangat berpengaruh, dimana konsentrasi yang tinggi akan menghasilkan gel yang lebih padat sehingga ukuran porinya mengecil dan menyebabkan sulitnya kontak antara enzim dengan substrat.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

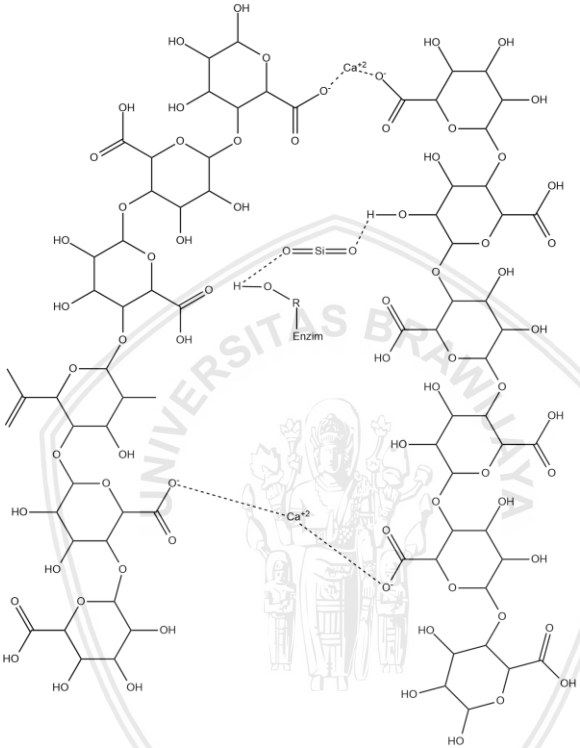


Gambar 4.1 Mekanisme Reaksi Xilan Menjadi Xilosa

Enzim xilanase diamobilkan pada matriks bentonit dengan metode adsorpsi. Metode ini adalah metode yang sederhana dan dikenal tidak mengubah aktivitas enzim yang diamobilkan. Pada proses pengikatan enzim, terdapat gaya elektrostatik, ikatan hidrogen dan gaya *van der waals*. pH dan kuat ion pada media reaksi akan mempengaruhi kesetimbangan dinamik antara enzim dengan matriks [42]. Ikatan yang terjadi setelah terjadinya kontak antara oksigen pada silika dalam bentonit dengan atom H pada gugus hidroksil dari rantai samping residu asam amino penyusun xilanase adalah ikatan hidrogen[43].

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Amobilisasi dilakukan dengan pencampuran larutan Na-alginat dengan matriks bentonit yg telah berisi enzim, kemudian diteteskan kedalam larutan $CaCl_2$ sehingga dapat terbentuk manik-manik gel Ca-alginat. Gel yang memadat ini terbentuk dari reaksi antara ion karboksilat ($-COO^-$) dari asam guluronat pada alginat dengan ion Ca^{2+} [44].



Gambar 4.2 Enzim Xilanase Terjebak pada Matriks Bentonit Ca-alginat

4.3 Penentuan Kondisi Optimum Xilanase Bebas dan Amobil

4.3.1 Penentuan pH Optimum

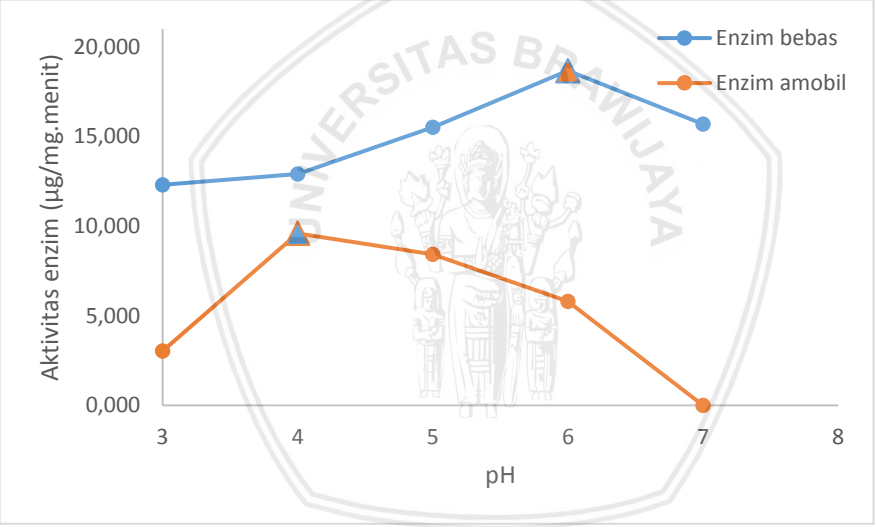
Setiap enzim memiliki kondisi pH lingkungan yang spesifik agar aktivitas dan kestabilan enzim lebih tinggi. Pada penelitian ini ditentukan sebanyak 5 variasi pH (3; 4; 5; 6; dan 7) dari sampel. Berdasarkan data yang diperoleh, diketahui pH optimum untuk enzim xilanase bebas pada pH 6 dengan aktivitas enzim sebesar 18,670 µg/mg.menit. Sedangkan

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

untuk enzim xilanase amobil optimum pada pH 4 dengan aktivitas enzim sebesar 9,590 µg/mg.menit.

Untuk enzim bebas dengan pH 3 memiliki aktivitas enzim sebesar 12,305 µg/mg.menit, pada pH 4 memiliki aktivitas enzim sebesar 12,910 µg/mg.menit, pada pH 5 memiliki aktivitas enzim sebesar 15,510 µg/mg.menit, pada pH 7 mengalami penurunan aktivitas dengan nilai 15,689 µg/mg.menit.

Sedangkan untuk enzim amobil pada pH 3 memiliki aktivitas enzim sebesar 3,034 µg/mg.menit, pada pH 5 mengalami penurunan aktivitas dengan nilai 8,427 µg/mg.menit, pada pH 6 terus mengalami penurunan aktivitas dengan nilai 5,798 µg/mg.menit, pada pH 7 tidak diperoleh data. Data yang diperoleh dapat dilihat pada **Gambar 4.3.**



Gambar 4.3 Kurva Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Amobil

Dari grafik tersebut diketahui bahwa terjadi pergeseran aktivitas enzim tertinggi dari pH 6 (enzim bebas) ke pH 4 (enzim amobil). Hal tersebut dipengaruhi oleh perbedaan jumlah ion H^+ pada lingkungan dan jumlah anion dalam matriks polimer.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Saat enzim berikatan dengan matriks polikation, muatan positif dari protein enzim ikut meningkat, dan pH dari daerah sekitar enzim yg diamobilkan menjadi lebih alkalin daripada lingkungan diluar matriks. Dengan demikian reaksi enzim berlangsung secara efektif pada bagian alkalin dari buffer eksternal yg digunakan. Sehingga pH optimum bergeser ke arah asam[39].

F_{hitung} enzim xilanase bebas = 167.495 dan $F_{tabel\ (0.05)}$ = 3,48 sehingga $F_{hitung} > F_{tabel\ (0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing pH berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim xilanase bebas.
F_{hitung} enzim xilanase amobil = 594,116 dan $F_{tabel\ (0.05)}$ = 3,48 sehingga $F_{hitung} > F_{tabel\ (0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing pH berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim xilanase amobil.

4.3.2 Penentuan Temperatur Optimum

Kinerja enzim sangat bergantung pada temperatur lingkungannya. Temperatur lingkungan yang tepat dapat mengoptimalkan aktivitas dari suatu enzim. Meningkatnya temperatur lingkungan akan meningkatkan energi kinetik dari sebuah molekul sehingga pergerakan molekul dan frekuensi tumbukan juga meningkat. Hal inilah yang meningkatkan laju reaksi.

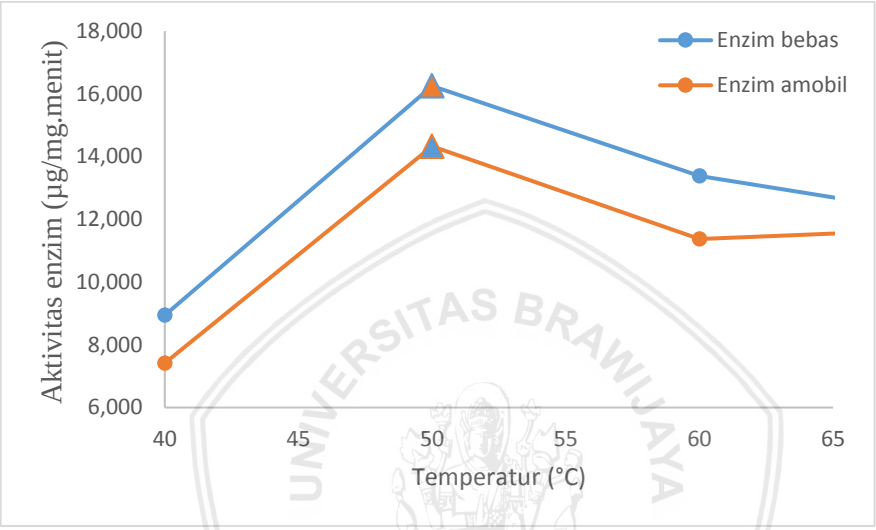
Pada penelitian ini masing-masing enzim baik enzim bebas dan amobil diberikan 5 variasi perlakuan temperatur (40; 50; 60; 70; dan 80 ^{o}C) Berdasarkan data yang diperoleh, diketahui enzim bebas memiliki temperatur optimum pada 50 ^{o}C dengan aktivitas enzim sebesar 16,250 µg/mg.menit. Pada enzim xilanase amobil juga memiliki temperatur optimum pada 50 ^{o}C dengan nilai aktivitas enzim sebesar 14,326 µg/mg.menit. Setelah mencapai temperatur optimum, enzim akan kehilangan aktivitasnya dan mengalami denaturasi.

Untuk enzim bebas dengan temperatur 40°C memiliki aktivitas enzim sebesar 8,943 µg/mg.menit; pada temperatur 60°C mengalami penurunan aktivitas enzim dengan nilai sebesar 13,381 µg/mg.menit; pada temperatur 70°C juga mengalami penurunan aktivitas enzim dengan nilai sebesar 12,014 µg/mg.menit; pada temperatur 80°C juga mengalami penurunan aktivitas dengan nilai 10,153 µg/mg.menit.

Untuk enzim amobil dengan temperatur 40°C memiliki aktivitas enzim sebesar 7,416 µg/mg.menit; pada temperatur 60°C mengalami

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

penurunan aktivitas enzim dengan nilai sebesar 11,377 µg/mg.menit; pada temperatur 70°C mengalami kenaikan aktivitas enzim dengan nilai sebesar 11,714 µg/mg.menit; pada temperatur 80°C mengalami penurunan aktivitas dengan nilai 9,321 µg/mg.menit. data yang diperoleh dapat dilihat pada **Gambar 4.4**.



Gambar 4.4 Kurva Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase bebas dan Amobil

F_{hitung} enzim xilanase bebas = 38,003 dan $F_{tabel\ (0.05)}$ = 3,48 sehingga $F_{hitung} > F_{tabel\ (0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing temperatur berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim xilanase bebas. F_{hitung} enzim xilanase amobil = 93,661 dan $F_{tabel\ (0.05)}$ = 3,48 sehingga $F_{hitung} > F_{tabel\ (0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing temperatur berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim xilanase amobil.

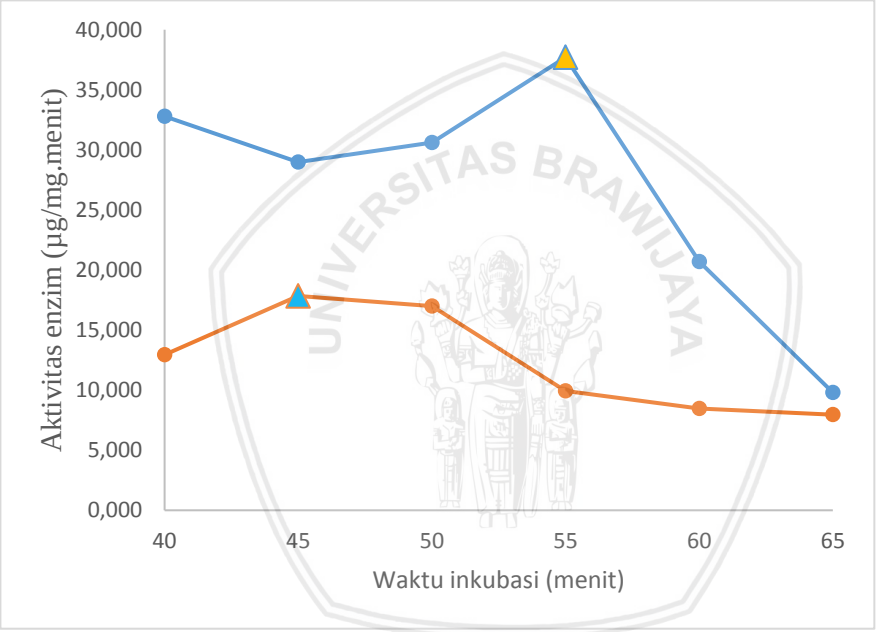
4.3.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Waktu inkubasi adalah waktu yang diperlukan suatu enzim untuk mengikat sebanyak mungkin substrat yang ada. Semakin lama waktu yang diberikan, maka semakin tinggi aktivitas enzim tersebut. Namun apabila terlalu lama aktivitas akan menurun. Karena semua sisi aktif enzim

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

berikatan dengan substrat yang ada dan setelah aktivitas enzim mencapai kondisi optimum, akan mengalami penurunan akibat dari sisi aktif enzim yang penuh.

Pada penelitian ini diberikan 6 variasi waktu inkubasi (40; 45; 50; 55; 60; dan 65 menit). Berdasarkan data yang diperoleh, enzim bebas memerlukan waktu inkubasi selama 55 menit dengan aktivitas sebesar 37,699 µg/mg.menit. Sedangkan enzim xilanase amobil diperlukan waktu inkubasi selama 45 menit dengan aktivitas enzim sebesar 17,840 µg/mg.menit.



Gambar 4.5 Kurva Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Bebas Dan Amobil

Untuk enzim bebas dengan waktu 40 menit memiliki aktivitas enzim sebesar 32,791 µg/mg.menit; pada waktu 45 menit memiliki aktivitas enzim sebesar 28,983 µg/mg.menit, pada waktu 50 menit memiliki aktivitas enzim sebesar 30,597 µg/mg.menit, pada waktu 60

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

menit memiliki akktivitas enzim sebesar 20,710 µg/mg.menit, pada waktu 65 menit memiliki aktivitas enzim sebesar 9,805 µg/mg.menit.

Untuk enzim amobil pada waktu 40 menit memiliki aktivitas enzim sebesar 12,955 µg/mg.menit, pada waktu 50 menit mengalami penurunan aktivitas enzim dengan nilai sebesar 16,840 µg/mg.menit, pada waktu 55 menit mememiliki aktivitas enzim sebesar 9,944 µg/mg.menit, pada waktu 60 menit memiliki aktivitas enzim sebesar 8,482 µg/mg.menit, pada waktu 65 menit memiliki aktivitas enzim sebesar 7,958 µg/mg.menit, data yang diperoleh dapat dilihat pada **Gambar 4.5**.

Dari gambar tersebut dapat diketahui terjadinya pergeseran waktu inkubasi optimum enzim amobil terhadap enzim bebas. Enzim amobil lebih cepat mencapai kondisi optimum dikarenakan matriks dapat membantu substrat untuk berinteraksi dengan enzim karena matriks bentonit tersusun dari atom Si dan O dan substrat xilan merupakan gula yang banyak mengandung gugus hidroksil (-OH). Sehingga atom O yang terikat pada Si dari matriks dapat menarik atom H yang berikatan pada atom O dari gugus hidroksil pada xilan.

F_{hitung} enzim xilanase bebas = 1320,454 dan $F_{tabel\ (0.05)}$ = 3,11 sehingga $F_{hitung} > F_{tabel\ (0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim xilanase bebas. F_{hitung} enzim xilanase amobil = 312,594 dan $F_{tabel\ (0.05)}$ = 3,11 sehingga $F_{hitung} > F_{tabel\ (0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim xilanase amobil.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa aktivitas optimum xilanase amobil pada matriks Bentonit Ca-alginat yaitu pada pH 4; temperatur optimum pada 50° C; dan waktu inkubasi optimum pada 45 menit dengan nilai aktivitas sebesar 17,840 µg/mg.menit.

5.2 Saran

Penelitian ini dapat dilanjutkan untuk menentukan kinetika reaksi serta pemakaian ulang enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks Bentonit Ca-alginat.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

DAFTAR PUSTAKA

[1]. Singh, S., Madlala, A.M., Prior, B. A., (2003), ***Thermomyces lanuginosus*: Properties of Strains and Their Hemicellulases,** *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 1, 3-16.

[2]. A. Belicová, L. Ebringer, J. Krajčovič, Z. Hromádková, A. Ebringerová, (2001), **Antimutagenic Effect of Heteroxylans, Arabinogalactans, Pectins and Mannans in The *Euglena* Assay,** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17, 293-299.

[3]. Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). **Xylanases from fungi: properties and industrial applications**. *Applied microbiology and biotechnology*, *67*(5), 577-591.

[4]. Kulkarni, N., Shendye, A., & Rao, M. (1999). **Molecular and biotechnological aspects of xylanases**. *FEMS microbiology reviews*, *23*(4), 411-456.

[5]. Susilowati, P. E., Raharjo, S., Kurniawati, D., Rahim, R., Sumarlin, S., & Ardiansyah, A. (2012). **Produksi Xilanase dari Isolat Sumber Air Panas Sonai, Sulawesi Tenggara, menggunakan Limbah Pertanian**. *Jurnal Natur Indonesia*, *14*(3).

[6]. Richana, N. (2002). **Produksi dan prospek enzim xilanase dalam pengembangan bioindustri di Indonesia**. *Buletin AgroBio*, *5*(1), 29-36

[7]. Budiman, A., & Setyawan, S. (2009). **Pengaruh konsentrasi substrat, lama inkubasi dan pH dalam proses isolasi enzim xylanase dengan menggunakan media jerami padi**.

[8]. Arianingrum, R., 2002, **Kandungan Kimia Jagung dan Manfaatnya Bagi Kesehatan,** http:// artikel-ppm-jagung, diakses pada 21 Juli 2017.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

[9]. Pearce, G.R., 1983, **The Utilization of Fibrous Agricultural Residue**, Australian Government Publishing Service, Carnberra.

[10]. Sulistyaningtyas, A. S., Prasetyawan, S., & Sutrisno, S. (2013). **PENGARUH PENAMBAHAN ION Fe3+ TERHADAP AKTIVITAS XILANASE DARI Trichoderma viride**. *Jurnal Ilmu Kimia Universitas Brawijaya*, *2*(2), pp-470.

[11]. Laziba, D., Sutrisno, S., & Suratmo, S. (2013). **OPTIMASI AMOBILISASI XILANASE DARI Trichoderma viride PADA MATRIKS PASIR LAUT**. *Jurnal Ilmu Kimia Universitas Brawijaya*, *2*(1), pp-456.

[12]. Windari, H. A. S., Sutrisno, S., & Roosdiana, A. (2014). **Penentuan Waktu Fermentasi Optimum Produksi Xilanase dari Trichoderma viride Menggunakan Substrat Kulit Kedelai dan Kulit Kacang Hijau Melalui Fermentasi Semi Padat**. *Jurnal Ilmu Kimia Universitas Brawijaya*, *1*(1), pp-85.

[13]. Arnata, I. W. (2009). **Pengembangan Alternatif Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol dari Ubi Kayu Menggunakan Trichoderma viride, Aspergillus niger dan Saccharomyces cerevisiae**. *Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor*.

[14]. Widiati, W. (1998). **Pengaruh perlakuan amoniasi dan fermentasi oleh kapang Trichoderma viride terhadap kualitas limbah pucuk tebu** (Doctoral dissertation, FMIPA UNDIP).

[15]. Rohaeno, E., Amalia, A., Subhan, A., Darmawan dan Sumanto. (2005). **Potensi dan Prospek Penggunaan Limbah Jagung Sebagai Pakan Ternak Sapi di Lahan Kering Kabupaten Tanah Laut, Kalimantan Selatan**. Prosiding Lokakarya Nasional Tanaman Pakan Ternak Bogor. PUSLITBANGNAK. 162-168

[16]. Sawhney, S., K., dan Singh R. (2008*)*. **Introduction Practical Biochemistry: 2nd Edition**. New Delhi: Narosa Publishing House Pvt Ltd.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

[17]. Aulanni'am. (2005). **Protein dan Analisisnya.** Malang: Citra Mentari Group.

[18]. Poedjiadi, A., dan Titin, S. (2006). **Dasar-Dasar Biokimia**. Jakarta: Universitas Indonesia-Press.

[19]. Muawanah, A. (2006*)*. **Produksi Enzim Xilanase Termostabil dari Thermomyces lanuginosus IFO 150 pada Bagasse Tebu.** (Tesis). Institut Pertanian Bogor. Bogor. Indonesia.

[20]. Pangesti, N.W.I., Artini, P., dan Estu, R.N. (2012). **Pengaruh Penambahan Molase pada Produksi Enzim Xilanase oleh Fungi Aspergillus niger dengan Substrat Jerami Padi**. *Jurnal Bioteknologi*. 9(2). 41-48

[21]. Saidatul, Maghfiroh. (2009). **Pengaruh Penambahan Mg^{2+} Terhadap Aktivitas dari Trichoderma viride dengan Induser Klobot Jagung**. Skripsi. Universitas Brawijaya, Malang.

[22]. Richana, N., Irawadi, T.T., Nur, A. dan Syamsu, K. (2008). **Isolasi Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase Serta Karakterisasi Enzimnya. Jurnal AgroBiogen**. 4. 24–34.

[23]. Irfan, M., M. Nadeem., and Quratulain S. (2014). **One Factor at a time (OFAT) Optimization of Xylanase Production from Trichoderma viride-IR05 in Solid State Fermentation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences**. 7. 317-326.

[24]. Nareswari, A. (2007). **Enzim Xilanase Bacillus licheniformis AQ1: Pemekatan, Studi Termostabilitas, dan Zimogram**.

[25]. Habibie, F. M., Wardani, A. K., & Nurcholis, M. (2014). **ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER MIKROORGANISME TERMOFILIK PENGHASIL XILANASE DARI LUMPUR PANAS LAPINDO [IN PRESS**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

OKTOBER 2014]. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, *2*(4), 231-238.

[26]. Lachke, A. (2002). **Biofuel fromD-xylose—The second most abundant sugar**. *Resonance*, *7*(5), 50-58.

[27]. Judoami, Djodjo, R. M., Darwis, A., dan Said, E. G. (1992). **Teknologi Fermentasi**. Jakarta: Rajawali Press

[28]. Koto, Rasul Gani. (2013). **Kecernaan In Vitro Bahan Kering dan Bahan Organik Jerami Jagung yang Diinokulasi dengan Trichoderma Sp pada Lama Inkubasi yang Berbeda**. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Hasanudin. Makasar

[29]. Susilo, B. (2012). **Studi Optimasi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Glukosa Menggunakan Lipase Candida rugosa EC 3.1.1.3 Teramobilisasi pada Matriks Zeolit.** Skripsi. Universitas Indonesia. Jakarta

[30]. Rai University. (2005). **Immobilization of Enzymes**. industrial biotechnology/lecture-notes/lecture-21.pdf. diakses tanggal 06 Februari 2018.

[31]. Rahman, A., Arryanto, Y., Sutarno, S., Juwono, A. L., & Roseno, S.(2015).**Sintesis dan Karakterisasi Organolempung dari Bentonit Indonesia**. *SPEKTRA: Jurnal Fisika dan Aplikasinya*, *16*(1), 42-47.

[32]. Syuhada, S., Wijaya, R., Jayatin, J., & Rohman, S. (2009). **Modifikasi Bentonit (Clay) menjadi Organoclay dengan Penambahan Surfaktan**. *Jurnal Nanosains & Nanoteknologi*, *2*(1), 48-51.

[33]. Volzone, C., Rinaldi, J. O., & Ortiga, J. (2002). **N2 and CO2 Adsorption by TMA-and HDP-Montmorillonites**. *Materials Research*, *5*(4), 475-479.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

[34]. Kusuma, W. A. Y. A. (2012). **Bentonit Pacitan Sebagai Adsorben untuk Delororosasi CPO (Crude Palm Oil).** (Doctoral dissertation, UNIVERSITAS AIRLANGGA).

[35]. Richana, Nur, Tun Tedja Irawadi, M. Anwar Nur, Illah Sailah, Khaswar Syamsu dan Yandra Arkenan. (2007). **Ekstraksi Xilan dari Tongkol Jagung**. Jurnal Pascapanen. 4(1). 38-43

[36]. Mulyani, N.S. (2009). **Penentuan Konsentrasi Optimum Oat Spelt Xylan pada Produksi Xilanase dari Aspergillus niger dalam Media PDB (Potato Dextrose Broth)**. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*. 12

[37]. Buchari, B., & Harsini, M. (1996). **Karakterisasi Bentonit Pacitan**. *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*, *6*(1-2).

[38].Sutrisno, A. (2017). **Teknologi Enzim**. Universitas Brawijaya Press.

[39]. Chibata, I. (1978). **Immobilized *enzymes***, *research and development*. Kodansha.

[40]. Palmer, T. (1991). **Understanding enzymes**. E. Horwood.

[41]. Pommersheim, R., Schrezenmeir, J., & Vogt, W. (1994). **Immobilization of enzymes by multilayer microcapsules**. *Macromolecular Chemistry and Physics*, *195*(5), 1557-1567

[42]. Saropah, Dyah Ayu., Akyunul Jannah., dan Anik Maunatin. (2012). **Kinetika Reaksi Enzimatis Ekstrak Kasar Enzim Selulase bakteri Selulolitik Hasil Isolasi Dari Bekatul**. Jurnal Alchemy, 2(1), 34-45.

[43]. Gusmawati, Niken Financia. (2008). **Amobilisasi Xilanase Ekstraseluler dari *Streptomyces sp*.451-3**. *Tesis*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.

[44]. Maharani, Laras Dwi., Sasangka Prasetyawan., dan Chanif Mahdi. (2013). **Optimasi Amobilisasi Urease dari *Schizzosaccharomyces pombe* Menggunakan Matriks Ca-alginat**. Kimia Student Journal Vol 2 (1) pp 421-427.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

UNIVERSITAS BRAWIJAYA