

repository.ub.ac.id

Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Pasir Laut Cagalinat

SKRIPSI

oleh :

RIDHA DINI RAHMAWATI
145090201111017



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

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Pasir Laut Calginat

SKRIPSI

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

oleh :

RIDHA DINI RAHMAWATI

145090201111017



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

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

oleh:

RIDHA DINI RAHMAWATI
145090201111017

Setelah diseminarkan di depan Majelis Penguji pada tanggal 19 JUL 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang kimia

Pembimbing I

Drs. Sutrisno, M.Si
NIP.196203181990021001

Pembimbing II

Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes.
NIP.197203262002122001



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia Fakultas
MIPA Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ridha Dini Rahmawati

NIM : 145090201111017

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul:

Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Pasir Laut 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, Juli 2018

Yang menyatakan,



(Ridha Dini Rahmawati)

NIM.145090201111017

repository.ub.ac.id

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

ABSTRAK

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang mampu menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Amobilisasi xilanase dilakukan sehingga enzim dapat digunakan lebih dari satu kali proses produksi. Metode amobilisasi yang digunakan adalah metode adsorpsi pasir laut dilanjutkan metode *entrapment* Ca-alginat. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum xilanase meliputi pH, temperatur, dan waktu inkubasi yang diamobilkan pada pasir laut terlapis Ca-alginat. Kondisi optimum ini ditentukan dengan cara mengukur aktivitas xilanase bebas dan amobil 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. Analisis data yang digunakan yaitu SPSS 22.0 melalui uji ANOVA *one-way* dan dilanjutkan dengan uji BNP ($\alpha = 5\%$). Hasil dari penelitian ini menunjukkan enzim xilanase amobil optimum pada pH 6 dengan nilai aktivitas sebesar 11,146 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$. Enzim xilanase amobil optimum pada temperatur 60 °C dengan nilai aktivitas sebesar 8,194 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$. Variasi waktu inkubasi, enzim xilanase amobil memiliki kondisi optimum pada 50 menit dengan nilai aktivitas sebesar 16,690 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$.

Kata Kunci : Xilanase, Amobil, *Trichoderma viride*, Pasir laut, Ca-alginat

repository.ub.ac.id

Determination of Optimum Condition of Xylanase from *Trichoderma viride* Carried on the Ca-alginate Sea Sand Matrix

ABSTRACT

Xylanase is an extracellular enzyme capable of hydrolyzing xylan to xylose. The immobilization of xylanase is carried out so that the enzyme can be used more than once in the production process. Amobilization method used is sea sand adsorbs method continued Ca-alginate entrapment method. This study aims to determine the optimum conditions of xylanase including pH, temperature, and incubation time which immobilized on Ca-alginate coated sea sand. This optimum condition was determined by measuring free and immobilized 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) minutes. The Data analysis used in this study is SPSS 22.0 through ANOVA *one-way* test and continued with BNJ test ($\alpha = 5\%$). The results of this study showed the optimum immobilized xylanase enzyme at pH 6 with an activity value of 11.146 $\mu\text{g} / \text{mg}\cdot\text{min}$. The immobilized xylanase enzyme is optimum at 60 ° C with an activity value of 8.194 $\mu\text{g} / \text{mg}\cdot\text{min}$. Variation of incubation time, immobilized xylanase enzyme had optimum condition at 50 min with activity value of 16,690 $\mu\text{g} / \text{mg}\cdot\text{min}$.

Keywords: Xylanase, Amobil, *Trichoderma viride*, Sea sand, Ca-alginate

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 Kondisi Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Pasir Laut 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 saran dan masukan serta bimbingan selama penyusunan proposal penelitian, pelaksanaan penelitian, hingga penulisan.
2. Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si, M.Kes 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. Dra. Anna Roosdiana, M.App. Sc., selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan saran dan masukkan selama menempuh pendidikan sarjana di Jurusan Kimia.
5. Aris Pardiyono, S.Pd dan Dwi Lin Wulanti selaku orang tua penulis, kakak Riza Aprilawati, Amd.Kep , Kakak Kukuh David Kristanto, Raras Yudhiawati, serta Shaqueena Oceandra yang selalu memberikan dukungan baik secara spiritual maupun material.
6. Shofiatul Hanani dan M. Hafid Bramantyo selaku rekan satu tim penelitian dan Bpk. Maryono selaku Laboran Biokimia

atas semua dukungan semangat dan berbagi ilmu yang terkait penelitian ini.

7. Anindia Nurul Cahyaningtia, Siti Sumadyah Nur'adya, Istoria Rosyada, Pretty Septiana, Ningrum Arrochmah, Zulfatul, Resti Rachmawanti, Cindy Alvionita, Fidela Azaria, Della Afriyana, Muhammad Syifaaul Fauzy dan Suci Susanti,S.Si, selaku sahabat yang selalu memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
8. Teman-teman kimia angkatan 2014 dan 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

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Masalah	3
1.5 Manfaat penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Enzim	5
2.2 Xilan	5
2.3 Xilanase	6
2.4 Klobot Jagung	6
2.5 <i>Trichoderma viride</i>	7
2.6 Isolasi Enzim	8
2.7 Aktivitas Enzim	8
2.8 Amobilisasi	9
2.9 Pasir Laut	11
2.10 Ca-alginat	11
2.11 Metode spektrofotometri	12
BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	13
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	13
3.3 Tahapan Penelitian	14
3.4 Prosedur Penelitian	15
3.4.1 Pembuatan Tepung Klobot Jantung	15
3.4.2 Pembuatan Media Padat	15
3.4.3 Peremajaan Biakan Murni <i>Trichoderma viride</i>	15
3.4.4 Pembuatan Media Cair	16

3.4.5 Pembuatan Inokulum	16
3.4.6 Produksi dan Isolasi Xilanase	16
3.4.7 Uji Kadar Protein	17
3.4.8 Penentuan Aktivitas Xilanase Bebas	18
3.4.9 Penentuan Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa	18
3.4.10 Amobilisasi Enzim Xilanase pada Ca-alginat Pasir Laut Teraktivasi	19
3.4.11 Uji Kadar Protein Sisa	20
3.4.12 Penentuan Aktivitas Xilanase Amobil	21
3.4.13 Uji Pengaruh pH, Temperatur dan Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Amobil	21
3.4.14 Analisis Data	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Produksi dan Isolasi Enzim Xilanase dari <i>Trichoderma viride</i>	23
4.2 Amobilisasi Enzim Xilanase pada Matriks Pasir Laut Ca-alginat	24
4.3 Aktivitas Optimum Xilanase	28
4.3.1 Penentuan pH Optimum	28
4.3.2 Penentuan Temperatur Optimum	30
4.3.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum	32
BAB V. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	35
5.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 :	Struktur Molekul Xilan	5
Gambar 2.2 :	Struktur Molekul Ca-alginat	12
Gambar 4.1 :	Mekanisme Reaksi Xilan menjadi Xilosa	25
Gambar 4.2 :	Enzim Xilanase Terjebak pada Matriks Pasir Laut Ca-alginat	26
Gambar 4.3 :	Ion Ca^{2+} terikat residu Guluronat	28
Gambar 4.4 :	Kurva Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Amobil	29
Gambar 4.5 :	Kurva Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Amobil	31
Gambar 4.6 :	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	50



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 :	Komposisi Kimia Klobot Jagung	7
Tabel 2.2 :	Kandungan Senyawa Kimia Pasir Laut	11
Tabel D.1 :	Data Absorbansi Panjang Gelombang Maksimum Gula Pereduksi	47
Tabel D.2 :	Data Absorbansi Gula Pereduksi	48
Table E.1 :	Data Absorbansi Panjang Gelombang Maksimum Kasein	49
Tabel E.2	Data Absorbansi Kasein	49
Tabel F.1 :	Konsentrasi Protein Awal	50
Tabel G.1 :	Konsentrasi Akhir	51
Tabel H.1 :	Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Variasi pH	52
Tabel H.2 :	Aktivitas Xilanase Bebas pada Variasi pH	53
Tabel H.3 :	Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variasi pH	54
Tabel H.4 :	Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi pH	54
Tabel H.5 :	Data Analisis Statistika pada Variasi pH	55
Tabel I.1 :	Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Variasi Temperatur	58
Tabel I.2	Aktivitas Xilanase Bebas pada Variasi Temperatur	58
Tabel I.3 :	Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variasi Temperatur	59
Tabel I.4 :	Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi Temperatur	60
Tabel I.5 :	Data Analisis Statistika pada Variasi Temperatur	60
Tabel J.1 :	Data Absorbansi Xilanase Bebas pada Variasi Waktu Inkubasi	63
Tabel J.2 :	Aktivitas Xilanase Bebas pada	63
Tabel J.3 :	Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variasi Waktu Inkubasi	64
Tabel J.4 :	Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi Waktu Inkubasi	65
Tabel J.5 :	Data Analisis Statistika pada Variasi Waktu Inkubasi	65

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	49
Lampiran F.	Penentuan Kadar Protein Awal	50
Lampiran G.	Penentuan Kadar Protein Akhir	51
Lampiran H.	Penentuan Aktivitas Enzim pada Variasi pH	52
Lampiran I.	Penentuan Aktivitas Enzim pada Variasi Temperatur	57
Lampiran J.	Penentuan Aktivitas Enzim pada Variasi Waktu Inkubasi	62





BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Industri yang semakin meningkat membuat adanya hal baru yang harus dilakukan untuk mengurangi dampak yang ditimbulkan, salah satunya yaitu dengan menggunakan enzim [1]. Enzim merupakan molekul protein yang memiliki fungsi sebagai bio katalisator. Enzim dapat meningkatkan laju reaksi dalam sistem biologik [2]. Berdasarkan lokasinya, enzim terbagi atas enzim ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler yaitu enzim yang bekerja diluar sel, sedang enzim intraseluler adalah enzim yang bekerja di dalam sel [3]. Aplikasi enzim dalam bidang industri dan bioteknologi juga semakin berkembang, umumnya berasal dari jamur dan bakteri. Sebagian besar industri enzim berupa enzim hidrolitik, diantaranya protease, amilase, esterase, dan lipase [4].

Xilanase (1,4- β -D-xilan xilanohidrolase, E.C 3.2.1.8) merupakan kelompok enzim ekstraseluler yang mampu menghidrolisa hemiselulosa dengan komponen utamanya xilan atau polimer dari xilosa dan xilo-oligosakarida [5]. Produksi xilanase dapat dilakukan dengan kapang *Trichoderma viride* [6]. *Trichoderma viride* merupakan salah satu jamur xilanolitik dan mampu memproduksi enzim xilanase yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Kelebihan dari jamur ini yaitu mampu ditumbuhkan pada waktu yang cepat dalam berbagai substrat, mampu berkembang dengan baik pada suasana asam dengan pH 3.5 – 6.5 [7].

Pemanfaatan enzim xilanase di bidang industri sangat beragam, namun pada skala besar tidak ekonomis. Hal ini dikarenakan penggunaan enzim bebas hanya mampu digunakan dalam satu kali proses, sehingga membutuhkan biaya yang cukup mahal. Perlu dilakukan amobilisasi untuk meningkatkan efisiensi pemakaian [8]. Amobilisasi merupakan pelekatan enzim pada media padat atau menempelkan enzim pada permukaan adsorben agar tidak larut dalam air [9]. Proses amobilisasi yang demikian memungkinkan penggunaan kembali bahan-bahan yang tidak larut yang mengandung zat tersebut [10]. Keuntungan dari enzim amobil yaitu membuat enzim lebih stabil, tahan terhadap protease, dan mudah dipisahkan dari campuran

repository.ub.ac.id

pada akhir reaksi untuk reaksi selanjutnya [8]. Media padat yang digunakan sebagai matriks pengadsorb diantaranya zeolit, alumina, dan pasir laut yang mengandung silika [9]. Sedangkan media gel untuk pengebakan dapat digunakan larutan Ca-alginat. Penggunaan dua matriks ini bertujuan meminimalisir proses difusi enzim dari matrik Ca-alginat. Semakin tinggi konsentrasi alginat maka porositas gel semakin rendah sehingga enzim sulit terlepas dari gel [11].

Proses amobil menyebabkan terjadinya perbedaan karakter enzim dan konsentrasi muatan pada lingkungan enzim amobil sehingga terjadi interaksi elektrostatik dengan bergabungnya muatan – muatan pada matriks pendukung. Perubahan karakter tersebut disebabkan oleh proses amobilisasi ataupun bahan pendukung yang digunakan [12].

Kondisi optimum enzim xilanase amobil tidak selalu sama dengan kondisi optimum xilanase bebas. Xilanase bebas optimum pada pH 5, temperatur 60°C, dan waktu inkubasi 55 menit [13]. Kondisi optimum enzim xilanase yang diamobilkan pada pasir laut yaitu pada pH 6, temperatur 50°C, dan waktu inkubasi 60 menit dengan nilai aktivitas sebesar 91,697 $\mu\text{g/g}\cdot\text{menit}^{-1}$ [14]. Oleh karena itu penelitian ini akan ditentukan pH, temperatur, dan waktu inkubasi optimum xilanase dari *Trichoderma viride* yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini yaitu bagaimana kondisi optimum xilanase dari *Trichoderma viride* yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat.

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan uraian perumusan masalah, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Enzim xilanase yang digunakan adalah ekstrak enzim kasar
2. Variasi pH yang digunakan yaitu 3, 4, 5, 6, dan 7
3. Variasi suhu penyimpanan yang digunakan yaitu 40, 50, 60, 70, dan 80 °C
4. Variasi waktu inkubasi yang digunakan yaitu 40; 45; 50; 55; 60; 65 menit

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang tersebut, tujuan dari penelitian ini yaitu menentukan kondisi optimum xilanase dari *Trichoderma viride* yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai kondisi optimum xilanase dari *Trichoderma viride* yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

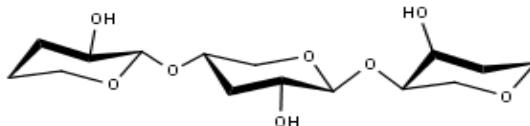
2.1 Enzim

Enzim merupakan suatu kelompok protein yang memiliki peran penting di dalam aktivitas biologis [15]. Enzim memiliki sifat spesifik dan menguntungkan diantaranya yaitu efektif, efisien, selektif, proses reaksi tanpa menghasilkan produk samping, ramah lingkungan, serta dapat diprediksi. Sifat - sifat enzim tersebut menyebabkan penggunaan enzim semakin meningkat yaitu sekitar 10 - 15% per tahun [16]. Sifat enzim yang spesifik dikarenakan enzim bekerja pada substrat dan jenis reaksi tertentu serta pada kisaran temperatur tertentu. Enzim dapat kehilangan aktivitasnya akibat dari proses denaturasi yang dapat diakibatkan oleh pH ekstrim, kenaikan temperatur, pelarut organik, dan urea. Proses katalis enzim terjadi dengan peningkatan laju reaksi mencapai 10^7 - 10^{13} kali lebih cepat bila dibanding tanpa menggunakan enzim [17].

Beberapa enzim seperti enzim tripsin, pepsin dan kimotripsin hanya disebut enzim monomerik, yaitu enzim yang hanya terdiri satu rantai polipeptida. Sedangkan enzim oligomerik adalah enzim yang memiliki dua atau lebih rantai polipeptida yaitu enzim heksokinase, laktat hidrogenase, dan piruvat kinase [15].

2.2 Xilan

Xilan merupakan polimer dari pentosa atau xilosa yang tersusun atas rantai D-xilopranosa dengan ikatan β -1,4 glikosidik [15]. Selain itu xilan memiliki monomer dari polimer xilosa sekitar 150 - 200 unit. Hemiselulosa memiliki fungsi sebagai bahan pendukung dalam dinding sel. Hemiselulosa relatif mudah dihidrolisis oleh asam menjadi komponen monomernya yang terdiri D-glukosa, D-manosa, D-galaktosa, D-arabinosa, dan D-sylosa. Kandungan xilan pada tanaman sekitar 20% - 30% dari berat kayu kering [18].



Gambar 2.1 : Struktur molekul xilan

Xilan mempunyai substituen yang berada disekitar cincin dari struktur inti xilan. Umumnya substituen yang ditemukan di cincin belakang merupakan cincin asetil, arabanil, dan glukuronosil [18].

2.3 Xilanase

Xilanase (1,4- β -D-xilan xilanohidrolase, E.C 3.2.1.8) merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis xilan [19]. Xilanase adalah enzim ekstraseluler yang mampu menghidrolisis xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilan dapat dimanfaatkan untuk pemutihan kertas, campuran pakan ternak, dan penjernihan sirup. Xilanase digunakan oleh mikroorganisme untuk merombak xilan dalam medium menjadi gula yang lebih sederhana sehingga dapat digunakan untuk pertumbuhan. Enzim xilanase dapat dihasilkan oleh mikroorganisme [20].

Enzim xilanase berasal dari mikroba yang diklasifikasikan dalam dua famili utama berdasarkan titik isoelektrik dan massa molekul relatifnya. Kelompok endoxilanase dengan titik isoelektrik lebih rendah namun massa molekul relatif tinggi diklasifikasikan dalam famili GH10 atau famili F dan kelompok endoxilanase dengan nilai titik isoelektrik lebih tinggi namun massa molekul relatif lebih rendah disebut famili GH 11 atau famili G. Perbedaan kedua famili tersebut yaitu famili F akan menyerang ikatan glikosida disebelah percabangan dan mengarah pada ujung nonpereduksi menggunakan xilopiranosil non-substitusi antara cabang-cabang. Sedangkan famili G menggunakan tiga residu xilanopirosil non-substitusi [21].

Xilanase banyak dimanfaatkan dalam bidang industri. Xilanase digunakan untuk meningkatkan daya kembang roti, meningkatkan tekstur, menghasilkan gula rendah kalori, serta bahan penjernih dalam industri minuman. Pada industri farmasi, xilanase digunakan menjadi salah satu enzim pada formula sediaan suplemen untuk mengatasi masalah pencernaan dan menghambat terjadinya osteoporosis, serta bahan tambahan formula pasta gigi. Xilanase juga berpotensi membantu dalam pra-perlakuan biomassa industri [22].

2.4 Klobot jagung

Jagung juga merupakan sumber utama pati yang dapat digunakan sebagai bahan makanan, termasuk bahan bakar etanol. Kegunaan jagung cukup banyak serta digunakan dalam penyusunan makanan atau minuman, sebagai pakan ternak atau untuk keperluan industri. Kulit jagung adalah bagian utama yang melindungi biji jagung [23].

Klobot jagung merupakan hasil samping yang diperoleh dari pengelupasan biji jagung yang disebut dengan kulit buah jagung. Komposisi kimia yang terkandung di dalam klobot jagung diantaranya [23] :

Tabel 2.1 : Komposisi kimia klobot jagung

Komponen	Kandungan (%)
Alkohol-sikloheksana	4,57
Alfa selulosa	26,81
Hemiselulosa	30,91
Abu	4,57
Nitrogen	2,12
Lignin	15,52

Kandungan terbesar pada klobot jagung adalah hemiselulosa dengan kadar 30,91% sehingga klobot jagung dapat dijadikan sebagai sumber xilan dalam memproduksi xilanase. Klobot jagung dapat digunakan sebagai induser dalam media pertumbuhan mikroorganisme. Tujuan penambahan induser pada pertumbuhan mikroorganisme yaitu untuk menginduksi enzim dari mikroorganisme sehingga mikroorganisme tersebut dapat mengeluarkan enzim yang diinginkan [23].

2.5 *Trichoderma viride*

Trichoderma viride merupakan kapang berfilamen yang memiliki sifat xilanolitik dan memproduksi enzim xilanase yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa. *Trichoderma viride* merupakan jenis kapang yang paling banyak ditemukan diantara jenisnya dan dapat digunakan dalam proses produksi xilanase. Hal ini dikarenakan dapat mendegradasi komponen polisakarida menjadi gula [24].

Kelebihan *Trichoderma viride* dibandingkan dengan jenis kapang lainnya yaitu dapat tumbuh di berbagai substrat, mampu berkembang biak pada pH 3,5 – 6,5 serta dapat tumbuh pada temperatur 50 – 60 °C [7].

Taksonomi *Trichoderma viride* adalah sebagai berikut [25] :

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Class	: Sordariomycetes

Subclass	: Hypocremycetidae
Orde	: Hypocreales
Family	: Hypocreaceae
Genus	: <i>Tricoderma</i>
Species	: <i>T. Viride</i>

2.6 Isolasi enzim

Isolasi enzim adalah suatu pemisahan partikel dari larutan dengan menggunakan metode sentrifugasi. Hal ini termasuk pemisahan sel - sel dari medium biakan, pemisahan atau penghancuran sel dan pengumpulan presipitat untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim. Isolasi enzim biasanya dilakukan pada temperatur rendah dan dengan ditambahkan larutan penyangga atau buffer untuk mempertahankan kestabilan pH enzim. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang akan berada pada lapisan air [3].

Isolasi enzim intraseluler dapat dilakukan dengan menghilangkan gangguan komponen biologi sel. Hal tersebut dapat dilakukan dengan metode mekanik seperti *freeze drying* dan lisis secara fisik, kimia, dan enzimatik. Setelah itu dilakukan pemisahan sel yang telah rusak dengan cara filtrasi atau sentrifugasi [26].

2.7 Aktivitas enzim

Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim diantaranya konsentrasi substrat, pH, suhu, lamanya waktu penyimpanan, konsentrasi enzim, aktivator serta inhibitor [27]. Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan internasional unit (IU) yang merupakan nilai perubahan 1μ per menit tiap 1 mL larutan enzim [28]. Enzim xilanase memiliki nilai aktivitas di tanah sebesar 1,33 - 3125 $\mu\text{mol xilosa g}^{-1}$ 24 jam⁻¹ [29].

Aktivitas enzimatik sangat dipengaruhi oleh pH dan suhu. Setiap enzim memiliki pH dan suhu optimum yang berbeda-beda dari reaksi enzimatik [30] :

1. Pengaruh pH

Enzim apabila bekerja pada pH dibawah pH optimum maka aktivitasnya semakin rendah. Hal ini terjadi karena struktur tiga dimensi enzim mulai berubah. Sehingga substrat tidak dapat berikatan dengan sisi aktif enzim secara sempurna [31].

2. Pengaruh suhu

Temperatur mampu mempengaruhi aktivitas enzim. Saat temperatur rendah maka reaksi enzimatik berlangsung lambat. Kenaikan temperatur akan mempercepat laju reaksi hingga mencapai temperatur optimum. Ketika temperatur optimum maka reaksi enzimatik berlangsung secara maksimal [32].

2.8 Amobilisasi

Amobilisasi enzim merupakan pelekatan enzim pada media padat atau menempelkan enzim pada permukaan adsorben agar tidak larut dalam air [9]. Proses amobilisasi yang demikian memungkinkan penggunaan kembali bahan-bahan yang tidak larut yang mengandung zat tersebut [10]. Amobilisasi sel dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu metode penjeratan (*entrapping*), metode pengikatan silang (*crosslinking*), metode *carrier-binding*, dan metode adsorpsi [33] :

1. Metode ikatan antar polimer (*crosslinking*)

Metode ikatan polimer memiliki kelebihan dibanding metode yang lain yaitu ikatan antar enzim dan padatan (media pengadsorb) lebih stabil, sehingga enzim tidak mudah lepas dan substrat dapat berinteraksi maksimal. Contoh senyawa yang banyak digunakan dalam metode ini yaitu glutraldehid. Glutraldehid memiliki preparasi yang mudah dan harganya lebih terjangkau. Meskipun sederhana dan terjangkau, metode ini tidak banyak digunakan dengan menggunakan protein murni. Dikarenakan hanya mampu menghasilkan enzim amobil yang sangat sedikit dan memiliki aktivitas intrinsik yang sangat tinggi. Sehingga metode *cross linkin* digabungkan dengan metode adsorpsi agar meningkatkan efek amobilisasi.

2. Metode *carrier-binding*

Metode ini didasarkan pengikatan enzim pada *carrier* yang tidak larut dalam air. Pemilihan *carrier* bergantung pada sifat enzim, ukuran partikel, luas permukaan, dan rasio molar kelompok hidrofobik-hidrofilik.

3. Metode ikatan ionik

Metode ikatan ionik dilakukan pada bahan pendukung yang mengandung residu penukar ion, baik penukar kation maupun anion. Ikatan yang terbentuk relatif lebih kuat daripada adsorpsi. Sehingga kemungkinan perubahan konformasi lebih besar. Bahan pendukung metode ikatan ion yaitu DEAE selulosa dan karboksil metil selulosa.

4. Metode adsorpsi

Amobilisasi secara penyerapan fisik termasuk metode amobilisasi enzim yang sederhana. Bahan pendukung yang dapat digunakan yaitu bentonit, silika gel, zeolit, dan alumina. Ikatan yang terbentuk adalah ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, dan gaya *van der waals* yang bersifat lemah.

5. Metode penjerapan atau penjebakan

Metode penjebakan enzim didasarkan pada penempatan enzim dalam kisi-kisi matriks polimer atau membran. Matriks yang digunakan adalah kalsium alginat, poliakrilamid, dan resin sintesis. Sedangkan serat yang digunakan adalah selulosa triasetat dan polimer lainnya. Keuntungan menggunakan metode penjebakan yaitu struktur alami enzim tidak mengalami gangguan fisik, dikarenakan tidak terikat dengan bahan pendukung. Metode ini juga terdapat kerugiannya yaitu terjadi bocoran kontinyu karena ukuran pori yang terlalu besar serta interaksi antara substrat dan enzim kurang karena jeratan gel.

Proses amobilisasi enzim dapat menyebabkan beberapa sifat enzim berubah. Karena amobilisasi memungkinkan memilih polimer yang sesuai agar pH optimum yang akan ditentukan sesuai dengan stabilitas substrat maupun produknya. Perubahan konformasi molekul enzim yang menimbulkan perubahan stereokimiawi dan muatan lokal pada sisi aktif enzim akan mengubah daya katalitik enzim substratnya. Ketika enzim terikat oleh senyawa polikationik, muatan positif pada protein enzim amobil menjadi lebih basa dari pada lingkungan eksternalnya [34].

Distribusi yang tidak seragam dari ion H^+ ataupun ion OH^- menyebabkan perubahan pada pH. *Carrier* bermuatan negatif menyebabkan pH optimum yang bersifat basa, misalnya CMC (Carboxy Methyl Cellulose) dan asam galakturonat. Sedangkan

carrier bermuatan positif menyebabkan pH optimum disisi yang lebih asam, sebagai contoh DEAE-selulosa dan polimer poliornitil [35].

2.9 Pasir Laut

Pasir laut merupakan suatu sumber daya alam non hayati yang apabila dikelola dengan baik maka akan memberikan prospek yang baik. Pasir laut termasuk dalam contoh pasir karbonat yang berasal dari galian pasir diwilayah perairan Indonesia dan tidak mengandung unsur golongan A ataupun golongan B ditinjau dari segi ekonomi pertambangan [36]. Pasir laut berasal dari pelapukan batuan yang banyak mengandung feldspar dan kuarsa nilai kekerasan pasir laut adalah 7 dalam skala *mosh*, dengan berat jenis sebesar 2,65 kg/m³, titik lebur 1715°C dan memiliki struktur kristal heksagonal. Kandungan senyawa kimia dalam pasir laut dapat dilihat pada tabel [36] :

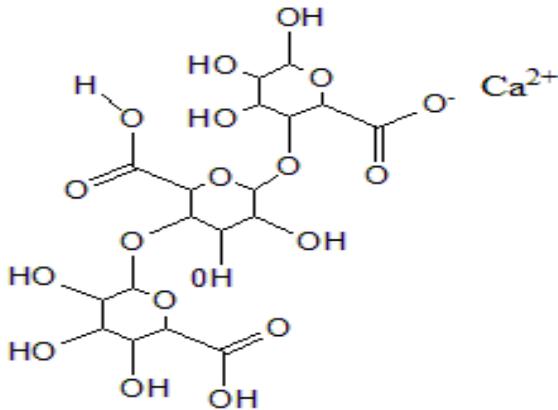
Tabel 2.2 ; Kandungan senyawa kimia pasir laut

Senyawa Kimia	Komposisi (%)
SiO ₂	70 – 75
Fe ₂ SO ₃	0,31
Al ₂ SO ₃	0,01 – 0,18
CaO	0,01 – 0,49
MgO	0,01 – 0,26
K ₂ O	0,01 – 17

Kandungan SiO₂ yang tinggi menyebabkan pasir laut memiliki daya serap (adsorpsi) yang tinggi. Pasir laut perlu dilakukan aktivasi untuk memperbesar pori atau luas permukaan sehingga daya serapnya meningkat. Aktivasi yang dapat dilakukan secara kimia yaitu dengan penambahan asam [36].

2.10 Ca-Alginat

Alginat adalah suatu polisakarida hasil ekstraksi rumput laut coklat *Sargassum sp.* dan *Turbinaria sp.* yang banyak ditemukan di perairan Indonesia [37]. Karakteristik dan sifat gel alginat sebagai media amobilisasi bergantung pada sumber alga dan adanya kation seperti timbal, tembaga, cadmium, barium, stronsium, kalsium, dan zinc [38]. Ca-alginat memiliki kelebihan bila digunakan sebagai matrik yaitu dapat membentuk gel yang kokoh, tidak beracun, dapat dilakukan pada suhu ruang serta ekonomis dalam pengerjaannya [39]. Struktur molekul dari Ca-alginat adalah sebagai berikut :



Gambar 2.2 : Struktur molekul Ca-alginat

2.11 Metode Spektrofotometri

Pengukuran dengan menggunakan metode spektrofotometri yaitu berdasarkan absorpsi cahaya pada panjang gelombang tertentu melalui suatu larutan yang mengandung senyawa dan akan ditentukan konsentrasinya. Spektrofotometri menggunakan panjang gelombang pada gelombang ultraviolet dan gelombang inframerah. Prinsip kerja metode spektrofotometri yaitu jumlah cahaya yang diabsorpsi oleh larutan sebanding dengan konsentrasi senyawa pada larutan. Hal ini sesuai dengan Hukum Lambert Beer [40] :

$$A = \log (I_{in}/I_{out}) = (1/T) = a \times b \times c$$

Keterangan :

- A = Absorbansi
- I_{in} = Intensitas cahaya masuk
- I_{out} = Intensitas cahaya keluar
- a = Tetapan absorpsivitas molar
- b = Panjang jalur
- c = Konsentrasi pada suatu bahan yang mengabsorpsi

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 pada bulan Februari sampai Juni 2018.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah *Trichoderma viride* yang diperoleh di Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya dan klobot jagung. Selain itu bahan-bahan kimia yang sifatnya pro analisis (p.a) seperti dextrosa, asam asetat glasial, CH_3COONa , KH_2PO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$ (NaK-tartrat), glukosa anhidrat, DNS (asam dinitrosalisilat), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaOH, HCl, padatan BaCl_2 0.1M, xilosa, Kristal fenol, KMnO_4 , Na-alginat, dan Na_2SO_3 . Terdapat bahan yang sifatnya *for microbiology* seperti urea, pepton, tepung agar, xilan, zeolit, dan kasein (Merck). Sedangkan bahan lainnya yaitu aquades, membran selofan, kentang, asam oleat dan tepung klobot jagung.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya gelas kimia (500 mL, 250 mL, 100 mL), erlenmeyer (250 mL, 50 mL), pipet ukur (10 mL, 1 mL), pipet tetes, labu ukur (100 mL, 250 mL, 10 mL), taung reaksi, rak tabung reaksi, gelas arloji, pengaduk gelas, pengaduk magnet, corong gelas, botol semprot, botol sampel, jarum ose, kapas, kasa, aluminium foil, kertas coklat, bunsen burner, kertas saring Whatman No 40, syringe (10 mL), pH meter (*Senz Ph tester*), ayakan 150 mesh, neraca analitik (*Mettler Toledo AL 204*), oven (Memmert), pemanas listrik (*Janke-Kunkel*), motor rotary (*Janke-Kunkel*), autoklaf (*All American Model 20X*), laminar air flow, inkubator (*Heraeus type B 5042*), lemari pendingin, shaker (*Edmund Buhler SM 25 24.B*), sentrifuse dingin (*Tomy MX-305*), penangas air (*Memmert W 200*), Spectronic Genesys 20 (*Thermo Scientific Genesys 20*), kuvet, Tanur (Nabertherm), aluminium foil, kapas steril, pH universal, jarum ose.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam 14 tahap yang berkesinambungan antara lain :

1. Pembuatan tepung klobot jagung
2. Pembuatan media padat
3. Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*
4. Pembuatan media cair
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase dari biakan *Trichoderma viride*
7. Uji kadar protein
 - a. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan kasein
 - b. Pembuatan kurva baku laruta kasein
 - c. Penentuan kadar protein
8. Penentuan aktivitas xilanase bebas
 - a. Pengujian aktivitas xilanase bebas
 - b. Pengukuran aktivitas xilanase bebas
9. Penentuan kurva baku gula pereduksi xilosa
 - a. Penentuan panjang gelombang maksimal gula pereduksi xilosa
 - b. Pembuatan kurva baku gula pereduksi xilosa
10. Amobilisasi xilanase pada matriks Ca-alginat pasir laut teraktivasi
 - a. Preparasi matriks pasir laut
 - b. Aktivasi matriks pasir laut
 - c. Preparasi larutan Ca-alginat
 - d. Amobilisasi xilanase pada matriks Ca-alginat pasir laut teraktivasi
11. Penentuan kadar protein sisa
12. Uji aktivitas enzim xilanase amobil
 - a. Penentuan aktivitas xilanase amobil
 - b. Pengukuran aktivitas xilanase amobil
13. Penentuan kondisi optimum xilanase amobil
 - a. Penentuan pH optimum
 - b. Penentuan temperatur optimum
 - c. Penentuan waktu inkubasi optimum
14. Analisis data

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan tepung klobot jagung

Klobot jagung dicuci dengan aquades dan dikeringkan dalam oven pada temperatur 100° C. Setelah kering, klobot jagung dipotong kecil-kecil kemudian di blender. Klobot jagung yang sudah di blender, kemudian diaya dengan menggunakan ayakan 150 mesh. Serbuk halus yang lolos ditampung dalam wadah dan digunakan sebagai induser.

3.4.2 Pembuatan media padat

Potatoes Dextrose Agar (PDA) merupakan media padat yang digunakan. Dibuat dengan cara kentang yang sudah dikupas diambil 20 g, dicuci dengan aquades, dan dipotong kecil-kecil. Kemudian dimasukkan dalam gelas kimia 100 mL ditambahkan aquades hingga volume 100 mL dan dipanaskan hingga mendidih selama 1 jam pada pemanas listrik. Sesekali ditambahkan aquades agar volumenya tetap 100 mL. Selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring, sehingga diperoleh sari kentang. Sari kentang tersebut selanjutnya ditambahkan Dextrose sebanyak 2 g, 1 mL buffer asetat (0,2 M) pH 5, lalu dipanaskan kembali hingga mendidih dan ditambah 1,5 g tepung agar sambil diaduk. Larutan PDA dipanaskan hingga mendidih ambil diaduk, lalu dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 4 mL, ditutup dengan kapas, dan dilapisi kertas coklat. Larutan PDA tersebut disterilkan dengan menggunakan outoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 15 lbs. Larutan PDA yang sudah disterilkan kemudian didinginkan pada temperatur ruang dengan posisi miring. Sehingga diperoleh media padat PDA.

3.4.3 Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*

Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride* dilakukan didalam *Laminar Air Flow*. Jarum ose disiapkan, kemudian mulut tabung biakan murni *Trichoderma viride*, dan mulut tabung media padat dipanaskan pada nyala api Bunsen untuk disterilkan. Lalu spora *Trichoderma viride* diambil sebanyak satu mata ose, dipindahkan ke media padat PDA steril secara aseptis. Kemudian tabung media padat tersebut ditutup dengan kapas steril dan dilapisi kertas coklat. Selanjutnya diinkubasi pada inkubator selama 144 jam (6 hari) pada temperatur 30°C.

3.4.4 Pembuatan media cair

Sebanyak 0,036 g KH_2PO_4^- ; 0,054 g CaCl_2 ; 0,252 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,054 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g pepton; 0,054 g urea ; 0,005 g tween-80 ; 0,4 mL unsur renik, dan 0,9 g tepung klobot jagung ditimbang dengan neraca analitik. Semua bahan dimasukkan dalam erlenmeyer 250 mL ditambah aquades 180 mL, dan dikondisikan pada pH 5 dengan ditambahkan 1 mL larutan buffer asetat (0,2) pH 5. Larutan media cair diaduk dan dipanaskan hingga mendidih, lalu ditutup dengan kapas serta dilapisi kertas coklat dan diikat dengan karet. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C pada 15 psi selama 15 menit.

3.4.5 Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan didalam *Laminar Air Flow*. Spora hasil biakan murni *Trichoderma viride* yang telah berumur 6 hari diambil dengan menggunakan jarum ose dan dipindahkan secara aseptis kedalam erlenmeyer 50 mL yang sudah berisi 25 mL media cair steril. Kemudian diinkubasi sampai mencapai pertengahan fase logaritma (36 jam) dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm pada temperaur ruang. Kemudian larutan inokulum 1 yang telah diinkubasi diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam 4 erlenmeyer yang berisi media cair sebanyak 50 mL secara aseptis. Selanjutnya diinkubasi kembali menggunakan *shaker* selama 36 jam (pertengahan fase logaritma) dengan kecepatan 100 rpm pada temperatur ruang.

3.4.6 Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase dari Biakan

Trichoderma viride

Diambil sebanyak 18 mL larutan inokulum kemudian dimasukkan ke dalam 8 erlenmeyer yang berisi media cair steril sebanyak 180 mL secara aseptis dalam *Laminar Air Flow*. Campuran diinkubasi selama 60 jam pada temperatur ruang dan dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Kemudian ditambah 16 mL buffer asetat pH 5 dan disentrifugasi dingin pada kecepatan 3000 rpm dan suhu 4° C selama 30 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim xilanase yang kemudian ditentukan kadar protein dan aktivitasnya.

3.4.7 Uji kadar protein

3.4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan

Kasein

Sebanyak 2 mL larutan kasein konsentrasi 5000 $\mu\text{g/mL}$ diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 8 mL reagen biuret dan 2 mL larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5. Kemudian dikocok dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 460-600 nm dengan *Spectronic Genesys 20*.

3.4.7.2 Pembuatan Kurva Baku Larutan Kasein

Kasein ditimbang sebanyak 1 g, dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL, diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan ditambah beberapa tetes larutan NaOH 0,1 N hingga kasein larut dengan sempurna. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 100 mL, ditambah aquades hingga tanda batas dan dikocok agar homogen. Diperoleh larutan stok kasein 10000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan stok dipipet dengan volume (1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; dan 9) mL, dimasukkan dalam labu takar 10 mL, ditambah aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan (1000; 2000; 3000; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000; dan 9000) $\mu\text{g/mL}$. Dipipet sebanyak 2 mL masing – masing konsentrasi larutan kasein kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 2 mL larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 dan 8 mL reagen Biuret. Kemudian dikocok dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Diukur nilai absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum. Dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi kasein ($\mu\text{g/mL}$) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

3.4.7.3 Penentuan Kadar Protein

Uji kadar protein dilakukan dengan menggunakan reagen biuret, yaitu 2 mL ekstrak xilanase hasil sentrifugasi dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 $\mu\text{g/mL}$. Campuran larutan dikocok hingga homogen dan diinkubasi selama 30 menit kedalam penangas air pada temperatur 50°C. Diukur nilai absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum dengan *Spectronic Genesys 20*. Kadar protein awal diketahui dengan cara memplotkan nilai absorbansi pada persamaan kurva baku protein.

3.4.8 Penentuan Aktivitas Xilanase Bebas

3.4.8.1 Uji Aktivitas Xilanase

Substrat xilan 1% (b/v) sebanyak 1 mL kedalam tabung reaksi, dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit pada temperatur 60° C. Ditambahkan 1 mL xilanase, 1 mL buffer asetat (0,2M) pH 5, dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran larutan diinkubasi selama 55 menit pada temperatur 60° C . Ditambahkan 2 mL reagen DNS ke dalam tabung reaksi dan dimasukkan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Kemudian didinginkan dengan air mengalir, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas serta dihomogenkan. Diukur nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimum 485 nm dengan *Spectronic Genensys 20*.

3.4.8.2 Pengukuran Aktivitas Xilanase Bebas

Aktivitas xilanase dinyatakan dalam satuan $\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$. satuan unit aktivitas enzim bebas dinyatakan sebagai 1 μg xilosa yang dihasilkan per menit per mL enzim. Pengukuran aktivitas xilanase bebas dilakukan dengan cara memplotkan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva baku, sehingga diperoleh konsentrasi gula pereduksi dari hidrolisis xilan oleh xilanase. Berikut adalah persamaan untuk mengetahui satu unit aktivitas enzim :

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

Keterangan :

AE	= aktivitas enzim ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$)
X	= konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)
V	= volume total sampel (mL)
Fp	= faktor pengenceran
p	= massa protein (μg)
q	= waktu reaksi (menit)

3.4.9 Penentuan Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa

3.4.9.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Gula Pereduksi Xilosa

Dipipet sebanyak 1 mL larutan xilosa 300 $\mu\text{g/mL}$ dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Ditambahkan sebanyak 1 mL larutan buffer asetat 0,2 M pH 5 dan 2 mL reagen DNS. Campuran larutan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan

didinginkan dengan air mengalir. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen. Larutan blanko yang digunakan adalah aquades dengan perlakuan sama seperti sampel. Diukur nilai absorbansinya pada kisaran panjang gelombang 480-530 nm. Ditentukan panjang gelombang maksimum dengan cara memilih nilai absorbansi paling besar.

3.4.9.2 Pembuatan Kurva Baku Gula Pereduksi Xilosa

Ditimbang 0,15 gram xilosa, dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL dan ditambahkan aquades secukupnya. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambah aquades hingga tanda batas serta dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan gula stok gula 1500 µg/mL. Dipipet larutan sebanyak 2; 2,7; 3; 3,3; 3,7; 4; 4,3 ; dan 5 mL larutan stok gula 1500 µg/mL dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berbeda. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Sehingga diperoleh larutan stok 300, 400, 450, 500, 550 600, 650, dan 750 µg/mL. Setiap konsentrasi larutan stok tersebut diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda., lalu ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5 dan 2 mL reagen DNS pada masing-masing tabung reaksi. Kemudian, semua campuran larutan tersebut dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dalam air mengalir. Masing-masing larutan dimasukkan dalam labu ukur 25 mL yang berbeda. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Kemudian diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimum glukosa dengan menggunakan *Spectronic Genesys*. Kurva baku dibuat dengan memplotkan data konsentrasi gula (µg/mL) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

3.4.10 Amobilisasi Enzim Xilanase pada Matriks Ca-alginat Pasir Laut Teraktivasi

3.4.10.1 Preparasi Matriks Pasir Laut

Mineral pasir laut dihaluskan dengan cara ditumbuk lalu diayak dengan ayakan 120 *mesh*, padatan yang lolos diayak kembali dengan ayakan 150 *mesh* dan padatan yang tertahan di ayakan 150 *mesh* digunakan sebagai matriks amobilisasi. Selanjutnya padatan

dicuci dengan aquades, disaring dan dikeringkan pada temperatur 105°C di dalam oven.

3.4.10.2 Aktivasi Matriks Pasir Laut

Mineral pasir laut yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL sebanyak 10 g, ditambahkan larutan HCl 0,4 M sebanyak 200 mL, dikocok selama 4 jam pada temperatur menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Selanjutnya disaring dengan kertas Whatman No.40 dan dicuci dengan aquades hingga pH filtrat netral. Kemudian pasir laut yang teraktivasi, dikalsinasi di dalam tanur selama 4 jam pada temperatur 500°C.

3.4.10.3 Preparasi Larutan Ca-Alginat

Padatan Ca-Alginat sebanyak 0,3 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.

3.4.10.4 Amobilisasi Xilanase pada Matriks Pasir Laut Ca-alginat

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 padatan pasir laut teraktivasi sebanyak 0,1 g. Setelah itu campuran di shaker selama 3 jam pada kecepatan 100 rpm. Endapan yang diperoleh kemudian dicampurkan dengan larutan alginat dengan konsentrasi 3 %. Kemudian campuran xilanase dan larutan alginat diteteskan dengan *syringe* 10 mL pada gelas kimia yang telah berisi larutan CaCl₂ 7,5 mL. Kemudian manik-manik yang telah terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan CaCl₂ 0,15 M selama satu jam agar manik-manik menjadi keras. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No. 40. Endapan yang diperoleh merupakan xilanase amobil yang selanjutnya ditentukan aktivitasnya. Kemudian digunakan konsentrasi xilanase optimum untuk menentukan konsentrasi alginat optimum. Sedangkan filtrat diuji kadar protein sisanya.

3.4.11 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 absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spectronic Genesys 20* pada panjang gelombang maksimum 540 nm kasein sehingga diketahui kadar protein sisa dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein.

3.4.12 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. Selanjutnya diinkubasi selama 55 menit pada temperatur 50°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 *Spectronic Genesys 20* pada panjang gelombang 485 nm dan hasil yang diperoleh dicatat untuk pembuatan kurva aktivitas xilanase amobil sehingga diperoleh panjang gelombang optimum pula.

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

3.4.13.1 Penentuan Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Xilanase Bebas dan Xilanase 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 10 tabung reaksi disiapkan terlebih dahulu, 5 tabung reaksi diberi keterangan A (untuk enzim bebas) dan 5 tabung reaksi sisa diberi keterangan B (untuk enzim amobil). 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 0,1 g manik-manik gel enzim amobil. Masing-masing tabung kemudian ditambah larutan buffer asetat (0,2 M) yang berbeda dengan pH (3, 4, 5, 6, 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 dididihkan 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

repository.ub.ac.id

mengalir hingga temperatur sama dengan temperatur ruang, setiap tabung, kemudian diencerkan ke dalam labu ukur 25 mL dengan ditanda bataskan menggunakan aquades. Absorbansi larutan diukur dengan instrumen *Spectronic Genesys 20* pada panjang gelombang optimum yang ada di penentuan aktivitas xilanase amobil dan hasil yang diperoleh dicatat. Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali pengulangan.

3.4.13.2 Penentuan Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas

Xilanase 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 amobil (B) pada pH optimum yang diperoleh yaitu pH 6 dan waktu inkubasi yang digunakan 55 menit. Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali pengulangan.

3.4.13.3 Penentuan Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap

Aktivitas Xilanase Bebas dan Xilanase Amobil

Hasil yang diperoleh dari uji aktivitas enzim xilanase bebas dan amobil pada pH 6 dan temperatur 60 °C digunakan untuk menentukan waktu inkubasi optimum dengan variasi waktu inkubasi selama (40; 45; 50; 55; 60; 65) menit. Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali pengulangan.

3.4.14 Analisis Data

Data aktivitas enzim xilanase bebas dan enzim xilanase amobil pada matrik pasir laut Ca-Alginat yang dipengaruhi oleh variasi pH, temperatur dan waktu inkubasi dianalisis menggunakan program SPSS 22.00 dengan uji ANOVA satu arah, dan dilanjutkan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) 5%.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Produksi dan Isolasi Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride*

Enzim xilanase merupakan suatu 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 menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Hal ini dikarenakan terbatasnya nutrisi didalam media cair tersebut. Fase – 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 [41]. Fase-fase tersebut diantaranya ; (a) fase lag, merupakan fase penyesuaian sel-sel terhadap lingkungannya; (b) 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; (c) fase stasioner, merupakan fase dimana jumlah sel yang tumbuh hampir sama dengan jumlah sel yang mati. Senyawa metabolit sekunder juga dihasilkan pada fase stasioner ini. Fase akhir dari siklus atau kurva pertumbuhan adalah fase kematian (d) dimana jumlah sel yang mati lebih banyak dibandingkan dengan sel yang tumbuh [42].

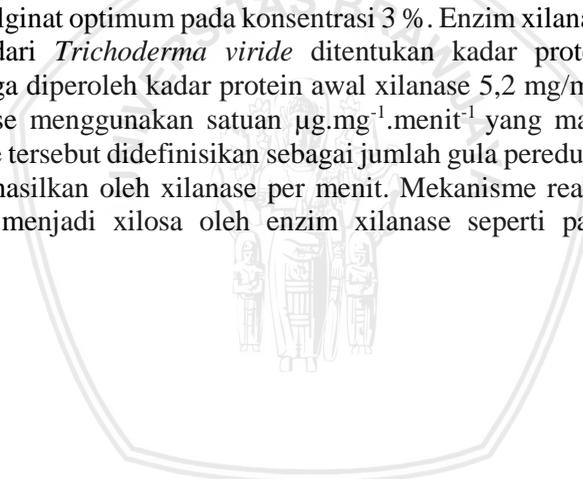
Produksi enzim diperlukan biakan aktif (inokulum) agar diperoleh hasil yang maksimal, sehingga *Trichoderma viride* yang telah diremajakan ditumbuhkan pada media cair hingga pertengahan fase logaritmik. Pada fase tersebut jumlah enzim yang dihasilkan sebanding dengan jumlah mikroba. Produksi xilanase dilakukan hingga akhir fase logaritmik, karena pada fase ini jumlah *Trichoderma viride* maksimal sehingga xilanase yang dihasilkan juga maksimal. Isolasi enzim dilakukan dengan menggunakan sentrifugasi dingin, dimana partikel yang memiliki berat lebih besar akan terendapkan. Partikel yang mengendap tersebut merupakan komponen sisa dari *Trichoderma viride* dan supernatan yang dihasilkan dari proses sentrifugasi ini merupakan ekstrak kasar xilanase. Ekstrak kasar

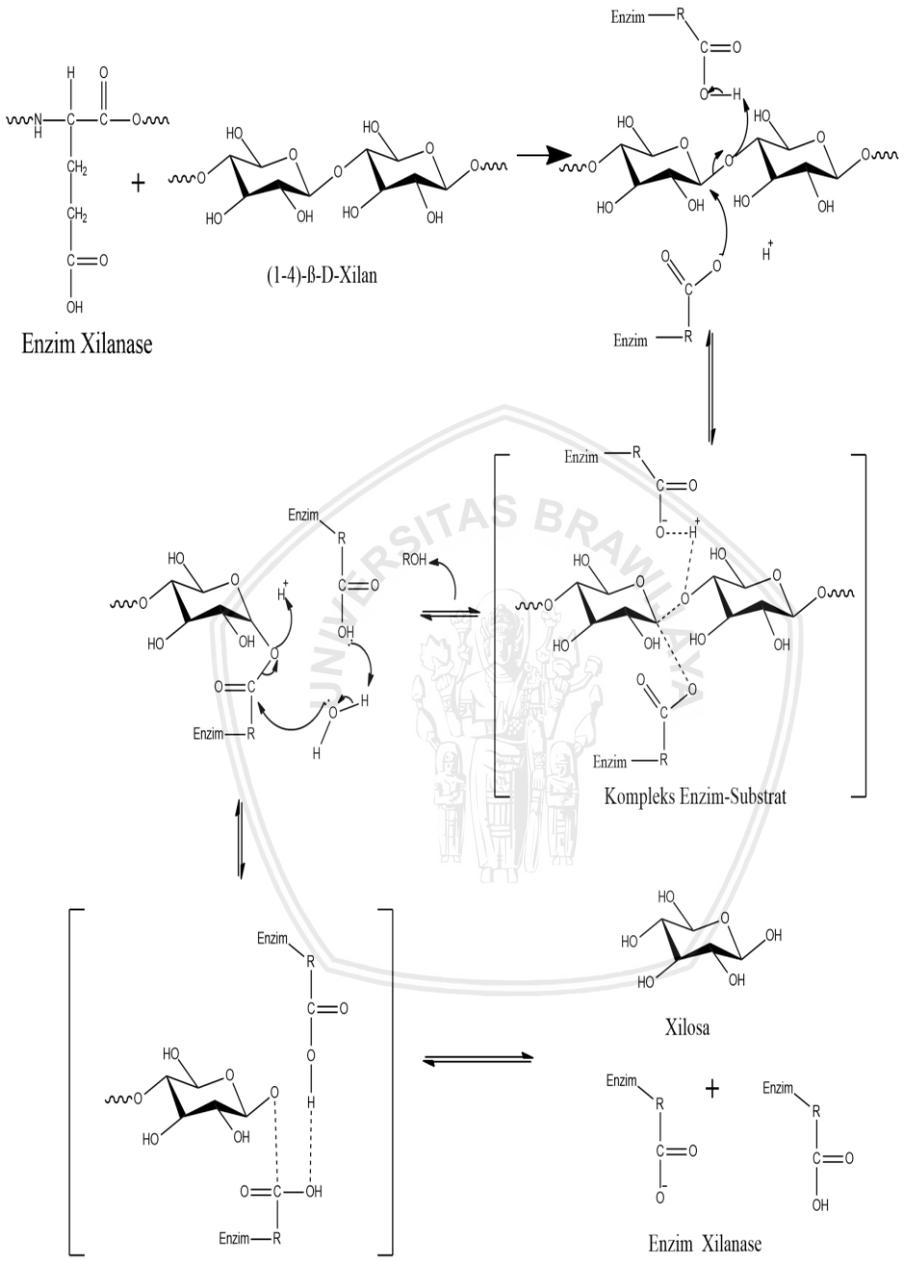
repository.ub.ac.id

xilanase yang dihasilkan sekitar 1,5 liter dari 1.6 liter media produksi. Ekstrak kasar tersebut dilakukan pengukuran aktivitas enzim xilanase bebas dan kadar protein enzim. Aktivitas enzim diukur menggunakan *Spektronic Genesys 20* dengan menggunakan reagen DNS. Sedangkan pengukuran kadar protein enzim dilakukan dengan menggunakan reagen biuret.

4.2 Amobilisasi Enzim Xilanase pada Matriks Pasir Laut Ca-alginat

Amobilisasi merupakan pelekatan enzim pada media padat yang bersifat adsorben agar enzim tidak mudah larut didalam air [9]. Amobilisasi dilakukan dengan menggunakan pasir laut Ca-alginat agar enzim yang teramobilkan lebih kokoh dan dapat digunakan secara berulang. Penelitian sebelumnya telah dilakukan variasi konsentrasi xilanase dan konsentrasi alginat untuk memperoleh konsentrasi optimumnya. Diperoleh konsentrasi optimum xilanase yaitu sebesar 3,5 mg/mL dan alginat optimum pada konsentrasi 3 %. Enzim xilanase yang diisolasi dari *Trichoderma viride* ditentukan kadar protein awalnya, sehingga diperoleh kadar protein awal xilanase 5,2 mg/mL. Aktivitas xilanase menggunakan satuan $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ yang mana aktivitas xilanase tersebut didefinisikan sebagai jumlah gula pereduksi (xilosa) yang dihasilkan oleh xilanase per menit. Mekanisme reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa oleh enzim xilanase seperti pada gambar 4.1.

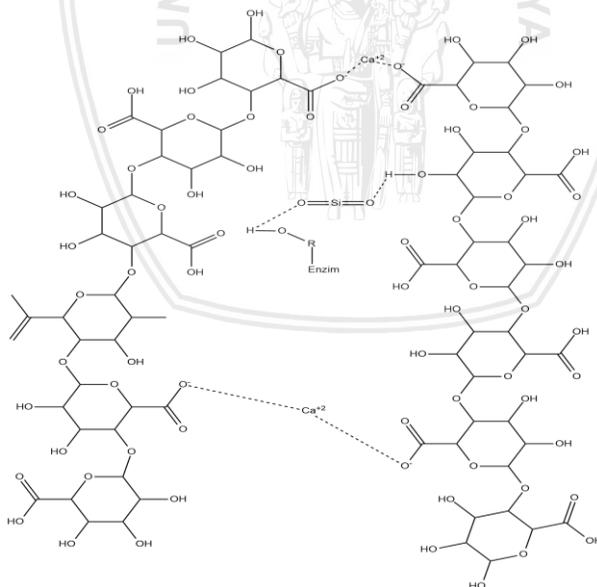




Gambar 4.1 : Mekanisme reaksi xilan menjadi xilosa

Reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa oleh enzim xilanase terjadi karena gugus karboksil yang berada pada rantai samping residu asam amino aspartat mengalami ionisasi. Ionisasi ini membentuk ion karboksilat dan menyerang ikatan glikosidik atom C1 pada xilan. Ion H^+ dari gugus karboksil residu asam amino glutamat menerima pasangan elektron bebas dari atom O sehingga membentuk kompleks enzim-substrat. Selanjutnya dihidrolisis oleh H_2O untuk memutus ikatan hidrogen sehingga dapat membentuk xilosa dan xilan kembali [14].

Penelitian ini xilanase diamobilkan menggunakan metode adsorpsi pasir laut. Metode adsorpsi merupakan metode yang sederhana dan tidak mengubah aktivitas enzim yang diamobilkan. Gaya elektostatik, ikatan hidrogen atau gaya *van der waals* merupakan jenis ikatan untuk metode amobilisasi adsorpsi. Kesetimbangan dinamik antara enzim dan matriks umumnya dipengaruhi oleh pH dan kuat ion pada media reaksi [43]. Ikatan hidrogen yang terjadi akibat adanya kontak antara oksigen pada silika yang terdapat pada pasir laut dengan atom H pada rantai samping asam amino penyusun xilanase [14].

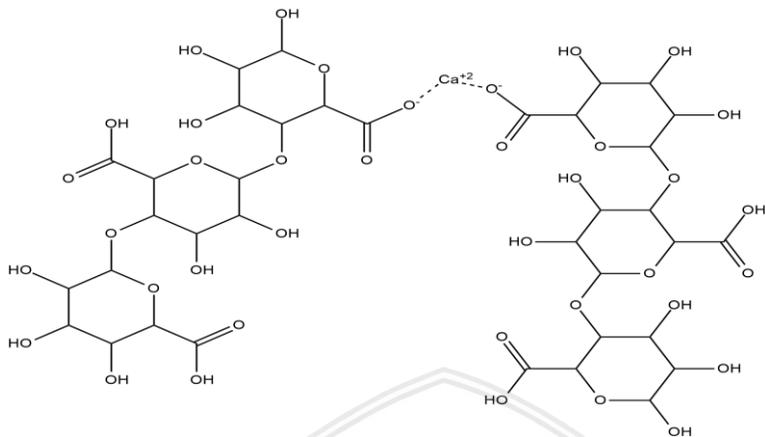


Gambar 4.2: Enzim Xilanase terjebak pada matriks pasir laut Ca-alginat

Metode amobilisasi lain yang digunakan yaitu *entrapment* (penjebakan) dengan menggunakan alginat. Keberhasilan menggunakan metode ini dapat diketahui dari distribusi enzim dalam matriks polimer. Hal ini dapat diatur dengan pencampuran enzim dan matriks polimer pada rasio tertentu. Sedangkan kontak antara enzim dengan substrat dapat ditingkatkan dengan mengatur ukuran pori gel. Ukuran pori gel dapat diatur dengan konsentrasi matriks polimer, konsentrasi matriks polimer yang semakin tinggi akan menghasilkan gel yang semakin padat sehingga ukuran pori gel akan mengecil dan mengakibatkan kontak antar enzim dengan substrat semakin sulit [44].

Amobilisasi dilakukan dengan pencampuran larutan Na-alginat dengan enzim teradsorpsi dalam pasir laut kemudian diteteskan ke larutan CaCl_2 sehingga membentuk manik Ca-alginat. Pori pada manik alginat terbentuk dari reaksi silang antara ion karboksilat ($-\text{COO}^-$) dari asam guluronat pada alginat dengan Ca^{2+} . Selain itu metode ini dipengaruhi oleh kerapatan pori dari gel alginat [45]. Pengaruh pH terhadap pori alginat yaitu adanya ion H^+ dari asam akan mensubstitusi ion Ca^{2+} sehingga matriks gel Ca-alginat terdegradasi dan menjadi lebih longgar menyebabkan jumlah sel bebas meningkat [46].

Alginat yang digunakan yaitu dalam bentuk garamnya, natrium alginat. Keunikan dari Na-alginat yaitu perubahannya menjadi hidrogel dengan 95% molekul air di dalamnya, yang merupakan syarat penting untuk penggunaan dalam metode *entrapment*. Ketika Na-alginat bertemu dengan kation divalent seperti Ca^{+2} menghasilkan pembentukan gel dimana residu Guluronat (blok G) dari alginat yang mengikat ion Ca^{+2} . Diduga adanya ikatan kompleks terbentuk antara satu Ca^{+2} dan dua blok GG dalam struktur kotak telur yaitu 5-COO-dan 2-OH dari unit G dalam pembentukan ikatan. Ion kalsium dapat berkoordinasi dengan gugus karboksil dan atom oksigen pada cincin dari tiap blok paralel. Gel alginat membentuk jaringan tiga dimensi molekul rantai panjang yang terdiri dari ikatan dari daerah blok G molekul alginat dengan ion kalsium. Ketika blok G tersusun paralel berbentuk pola rantai seperti dengan lubang-lubang yang sangat ideal sebagai tempat pengikatan kalsium ini menyerupai telur dalam kotaknya (*egg in an egg box*) [47].



Gambar 4.3 : Ion Ca^{2+} terikat residu Guluronat

Reaktivitas kalsium terhadap alginat adalah hasil penggabungan dimer dari daerah blok Guluronat yang diinduksi oleh kalsium. Penggabungan antar rantai dapat bersifat sementara atau permanen bergantung pada jumlah kalsium yang ada pada sistem. Dengan kadar kalsium yang rendah akan dihasilkan penggabungan sementara, menghasilkan larutan yang sangat kental. Jika kadar kalsium tinggi, akan terjadi pengendapan atau gelasi dari penggabungan permanen dari rantai. Gel terbentuk melalui reaksi kimia dimana kalsium menggantikan natrium dengan alginat mengikat molekul –molekul alginat yang panjang sehingga membentuk gel. Tergantung dari jumlah kalsium yang memberikan asosiasi sementara dan meningkatkan viskositas larutan. Sedangkan kandungan kalsium yang tinggi menghasilkan asosiasi permanen yang menyebabkan pengendapan atau gelatin. Gel yang lebih homogen dan stabil dapat diperoleh melalui pendinginan yang lambat larutan alginat dengan adanya ion kalsium [48].

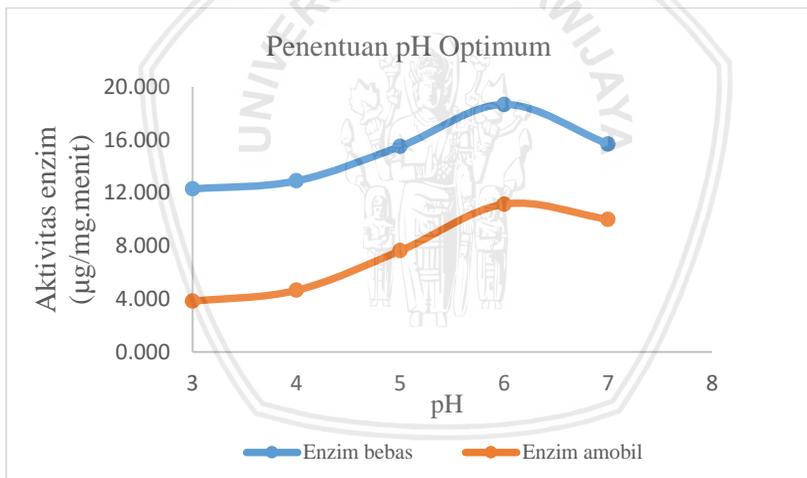
4.3 Aktivitas Optimum Xilanas

4.3.1 Penentuan pH Optimum

Enzim memiliki pH optimum yang spesifik yang dapat menyebabkan aktivitas dan stabilitas enzim menjadi tinggi [31]. Oleh karena itu perlu dilakukan penentuan kondisi optimum xilanas amobil. Perubahan pH memiliki peran penting terhadap aktivitas

enzim karena muatan gugus aktif pada protein enzim mengalami perubahan tingkat ionisasi. Penentuan pH optimum enzim xilanase amobil dilakukan pada temperatur 60 °C dan waktu inkubasi 55 menit.

Data perubahan aktivitas enzim xilanase amobil dengan variasi pH (3; 4; 5; 6; 7; dan 8) dapat dilihat pada Gambar 4.4. Berdasarkan data yang diperoleh dapat diketahui bahwa pH optimum untuk enzim xilanase bebas pada pH 6 dengan nilai aktivitas sebesar 18,670 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$. Sedangkan enzim xilanase amobil juga optimum pada pH 6 dengan nilai aktivitas sebesar 11,146 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{menit}$. Hal ini sesuai dengan hasil uji statistika yang menyatakan F_{hitung} enzim xilanase bebas = 106,669 dan $F_{\text{tabel}}(0.05) = 3,48$ sehingga $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}(0.05)$, artinya perlakuan masing-masing pH berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim xilanase bebas. F_{hitung} enzim xilanase amobil = 1304,706 dan $F_{\text{tabel}}(0.05) = 3,48$ sehingga $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}(0.05)$, artinya perlakuan masing-masing pH berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim xilanase amobil.



Gambar 4.4 Kurva Pengaruh pH terhadap aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Amobil

Perubahan pH dapat menyebabkan berhentinya aktivitas enzim xilanase karena adanya proses denaturasi pada struktur tiga dimensi enzim. Hal tersebut menyebabkan substrat tidak dapat

berikatan dengan sisi aktif enzim akibatnya proses katalis tidak dapat berlangsung sempurna. Profil perubahan pH enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan. Kenaikan pH atau penurunan pH menyebabkan penurunan aktivitas enzim bahkan kehilangan aktivitas katalitiknya [31].

pH optimum enzim bebas dan enzim amobil sama, dimungkinkan karena ion H^+ pada sekitar matriks mempunyai konsentrasi yang sama dengan ion H^+ pada daerah jauh pada matriks [14]. Penurunan aktivitas enzim amobil ini dikarenakan Ca-alginat memiliki sifat hidrolitik, yang menimbulkan penurunan kemampuan substrat hidrofobik untuk mencapai sisi aktif xilanase dan sedikitnya xilanase yang dapat diamobilkan [44].

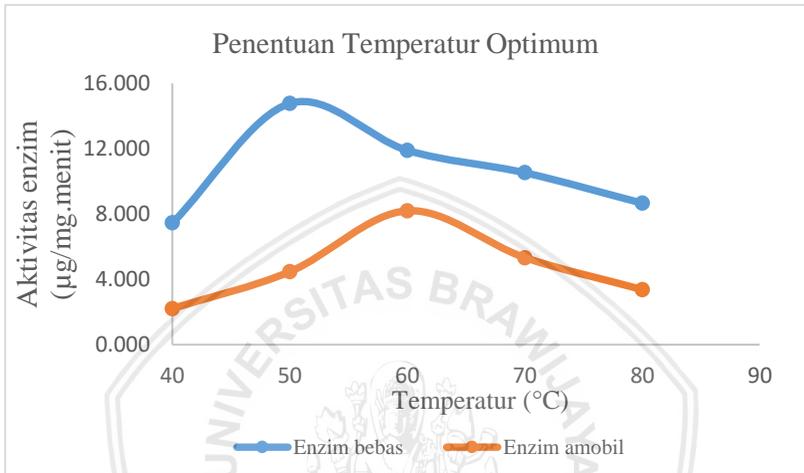
Perubahan karakter enzim yang meliputi pH disebabkan oleh proses amobilisasi ataupun bahan pendukung yang digunakan. Perubahan pH optimum bisa terjadi karena muatan molekul protein atau matriks pendukungnya. Proses amobil menyebabkan terjadinya perbedaan konsentrasi muatan pada lingkungan enzim amobil sehingga terjadi interaksi elektrostatik dengan bergabungnya muatan – muatan pada matriks pendukung. Adanya efek difusi yang disebabkan oleh proses penjeratan dan pengikatan pada pori –pori matriks pendukung, sehingga melindungi enzim dari pH ekstrem yang dapat mengakibatkan denaturasi enzim [12].

4.3.2 Penentuan Temperatur Optimum

Temperatur merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim xilanase. Enzim memiliki aktivitas yang tinggi pada saat temperatur optimum [32]. Peningkatan suhu akan meningkatkan energi kinetik molekul. Peningkatan energi kinetik molekul juga meningkatkan gerakan molekul sehingga frekuensi tumbukan juga meningkat. Kombinasi tumbukan yang lebih sering dan lebih berenergi serta produktif ini akan meningkatkan laju reaksi [31]. Penentuan temperatur optimum enzim xilanase amobil dilakukan pada pH 6 dan waktu inkubasi 55 menit

Berdasarkan data hasil penelitian, perubahan aktivitas enzim xilanase bebas pada variasi temperatur (40; 50; 60; 70; dan 80 °C) memiliki temperatur optimum 50° C dan nilai aktivitas sebesar 14,770 µg/mg.menit. Enzim xilanase amobil optimum pada temperatur 60 °C dengan nilai aktivitas sebesar 8,194 µg/mg.menit. Hal ini sesuai

dengan uji statistika yang menyatakan F_{hitung} enzim xilanase bebas = 38,447 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 = 42,187 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.



Gambar 4.5 Kurva Pengaruh Temperatur terhadap aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Amobil

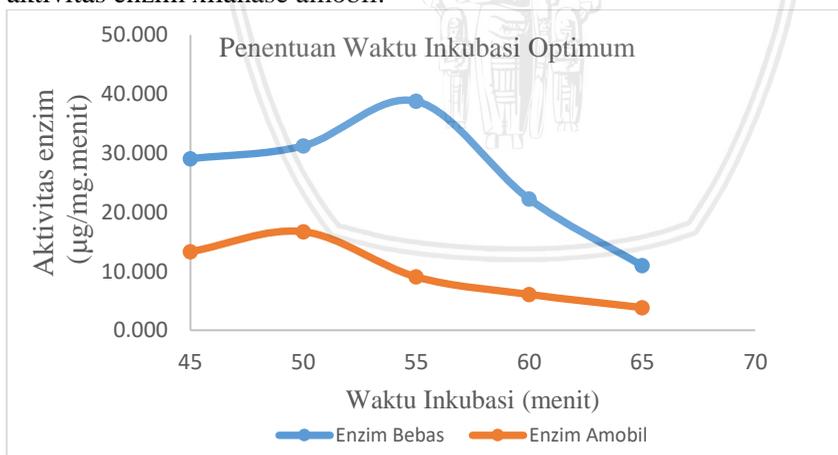
Temperatur enzim amobil lebih tinggi dibandingkan enzim xilanase bebas, hal ini memungkinkan matriks menurunkan pergerakan enzim untuk bertumbukkan dengan substrat pada suhu - suhu yang lebih rendah [14]. Aktivitas enzim xilanase amobil mulai naik saat temperatur 40° C. Hasil optimum dicapai pada saat temperatur 60° C. Pada saat temperatur optimum dimungkinkan terjadi tumbukan paling banyak dan perubahan reaktan menjadi produk paling cepat [31]. Setelah mencapai temperatur optimum, enzim akan kehilangan aktivitasnya dan mengalami denaturasi. Enzim xilanase amobil mengalami denaturasi pada saat temperatur lebih dari 60 °C. Sedangkan aktivitas enzim xilanase bebas mulai naik pada temperatur 40 °C dan mencapai temperatur optimum pada 50 °C.

Kemudian menurun pada temperatur lebih dari 50 °C karena proses denaturasi.

4.3.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Waktu inkubasi merupakan waktu reaksi enzim untuk enzim berikatan dengan substrat. Semakin lama waktu inkubasi maka semakin efektif kerja enzim, namun tidak selamanya semakin lama waktu inkubasi akan meningkatkan kerja enzim [14]. Penentuan waktu inkubasi optimum enzim xilanase amobil dilakukan pada pH 6 dan temperatur 60 °C.

Data perubahan aktivitas enzim xilanase amobil pada variasi waktu inkubasi (40; 45; 50; 55; 60; dan 65 menit) dapat dilihat pada gambar 4.6. Waktu inkubasi optimum enzim xilanase bebas yaitu pada 55 menit dengan nilai aktivitas sebesar 38,753 µg/mg.menit. Enzim xilanase amobil memiliki waktu inkubasi optimum pada 50 menit dengan nilai aktivitas sebesar 16,690 µg/mg.menit. Hal ini sesuai dengan uji statistika yang menyatakan F_{hitung} enzim xilanase bebas = 167,225 dan $F_{tabel (0.05)} = 3,48$ 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 = 274,713 dan $F_{tabel (0.05)} = 3,48$ sehingga $F_{hitung} > F_{tabel (0.05)}$, artinya perlakuan masing-masing waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim xilanase amobil.



Gambar 4.6 Kurva Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap aktivitas Enzim Xilanase Bebas dan Amobil

Waktu inkubasi optimum yang dicapai oleh enzim xilanase amobil yaitu pada saat 50 menit, hal ini dikarenakan produk xilosa yang dihasilkan sebanding dengan waktu inkubasi. Pada menit ke 55 aktivitas menurun karena enzim sudah jenuh berikatan dengan substrat. Sehingga jumlah xilosa yang dihasilkan tidak sebanding dengan waktu reaksi.



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum xilanase yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat yaitu pada pH 6, temperatur 60° dan waktu inkubasi pada 50 menit dengan nilai aktivitas sebesar 16,690 µg/mg.menit.

5.2 Saran

Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan mencari kinetika reaksi serta pemakaian ulang enzim xilanase dari *Trichoderma viride* yang diamobilkan pada matriks pasir laut Ca-alginat



DAFTAR PUSTAKA

- [1] Yuneta, R., dan Putra S. R. (2010). **Pengaruh Suhu Pada Lipase dan Bakteri *Bacillus subtilis***. Prosding Kimia FMIPA. Surabaya : Institut Teknologi Sepuluh November.
- [2] Soewoto, H. D. (2001). **Biokimia Eksperimen Laboratorium**. Jakarta: Widya Medika.
- [3] Cooper, P. (1986). **The Enzim**. New York : Academic Press Inc.
- [4] Telussa, Ivonne. (2013). **Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Lipase dari Coco Butter Substitute dan Karakter Lipasenya**. Prosding Kimia. Irian Jaya : Universitas Pattimura.
- [5] Richana, Nur. (2002). **Produksi dan Prospek Enzim Xilanase Dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia**. Buletin Agro Bio 5(1) 29 – 36.
- [6] Larasati, Luckyta Retno., Sutrisno., dan Anna Roosdiana., (2015). **Pengaruh waktu Pengocokan dan Konsentrasi Xilanase dari *Trichoderma viride* Terhadap Xilanase Teradsorbsi dan Aktivitas Xilanase**. Kimia Student Journal, 1(1), 812 – 818.
- [7] Sulistyningtyas, S. A., Sasangka Prasetyawan., dan Sutrisno. (2013). **Pengaruh Penambahan Ion Fe³⁺ Terhadap Aktivitas Xilanase Dari *Trichoderma viride***. Kimia Student Journal, 2(2), 470 – 476.
- [8] Masyithah, Z. (2005). **Pemodelan Numerik Reaksi Enzimatik Imobilisas**. 4 (2), 18 – 25.
- [9] Thaati, Hayyunisa., Sutrisno., dan Anna Roosdiana. (2013). **Optimasi Amobilisasi Xilanase dari *Trichoderma viride* pada Matriks Pasir Laut Terlapis Kitosan**. Kimia Student Journal, 2,(1), 310-316.
- [10] Mayasari, D. (2008). **Pengaruh Sumber karbon Terhadap Produksi Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride***. Malang

- : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.
- [11] Mesla,Wifda., Chanif Mahdi., dan Sutrisno. (2014). **Optimasi Amobilisasi Xilanase Dari *Trichoderma viride* Menggunakan Matriks Ca-Alginat-Kitosan**. *Kimia Student Journal*, 2(1),428-434.
- [12] Wuryanti. (2009). **Penggunaan Karagenan Dari Rumput Laut (*Euchema cottonii*) Sebagai Bahan Pendukung (Support) Pada Amobilisasi Enzim Papain**. *Jurnal Sains dan Matematika*, 17(1).
- [13] Gusmawati, Niken Financia. (2008). **Amobilisasi Xilanase Ekstraseluler dari *Streptomyces sp.*451-3**. *Tesis*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- [14] Adiningtyas, Nursamsi. (2016). **Karakterisasi Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Diamobilisasi pada Matriks Pasir Laut Teraktivasi HCl**. *Skripsi*. Malang : Universitas Brawijaya.
- [15] Sumardjo, Damin. (2006). **Pengantar Kimia : Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata 1 Fakultas Bioeksakta**. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- [16] Fitriani, Hasnah Natsir., dan Damma Salama. (2014). **Eksplorasi Mikroba Penghasil Enzim Protease Dari Sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng Sulawesi Selatan**. *Indonesia Chimica Acta*, Makassar : Universitas Hasanuddin.
- [17] Champe, Pamela C., Richard A., Harvey. (2005). **Lippincott's Illustrated Reviews : Biochemistry**, New York : A Wolters Kluwer Company.
- [18] Richana, Nur., Tun Tedja Irawadi., M. Anwar Nur., Illah Sailah., Khaswar Syamsu., dan Yandra Alkenan. (2007). **Ekstraksi Xilan Dari Tongkol Jagung**. *Jurnal Pasca Panen*, 4(1), 38 – 43.

- [19] Septianingrum, Krisna., dan Chandra Apriana, P. (2011). **Produksi Xilanase Dari Tongkol Jagung Dengan Sistem Bioproses menggunakan *Bacillus Circulans* Untuk Pra-Pemutihan Pulp.** Jurnal Riset Industri, 1(1), 87-97.
- [20] Pangesti, Nur Wahyu Indira., Artini Pangastuti., dan Estu Retnaningtyas, N. (2012). **Pengaruh Penambahan Molase Pada Produksi Enzim Xilanase Oleh Fungi *Aspergillus niger* Dengan Substrat Jerami Padi.** Bioteknologi, 9(2), 41-48.
- [21] Ratnadewi, A. A., Istri., Wuryanti., Handayani., dan Ni Nyoman Tri Puspaningsih. (2007). **Produksi dan Karakterisasi Enzim β -Endoxilanase dari Bakteri Sistem Intestinal Rayap.** Jurnal Ilmu Dasar, 8(2), 110-117.
- [22] Fawzya, Yusro Nuri., Rani Elsa Prima., Wibowo Mangunwardoyo., Ifah Munifah., dan Gintung Patantis. (2013). **Produksi dan Karakterisasi Xilanase Dari Isolat Bakteri M-13.2A Asal Air Laut Manado.** JPB Kelautan dan Perikanan, 8(1), 55-64.
- [23] Prasetyawati, Dwi Putri. (2015). **Pemanfaatan Kulit Jagung dan Tongkol Jagung (*Zea mays*) Sebagai Bahan Dasar Pembuatan Kertas Seni Dengan Penambahan Natrium Hidroksida (NaOH) dan Pewarna Alami.** Naskah Publikas, Surakarta : Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [24] Purwanti, Afif Qonita. (2015). **Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase dari *Trichoderma viride* yang Ditumbuhkan pada Media Tongkol Jagung.** Skripsi. Malang : Universitas Islam Negeri Malang Maulana Malik Ibrahim.
- [25] M. Tribak., J. A., Ocampo., and I. Garcia-Romera. (2002). **Production of Xyloglucanolytic Enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus*.** Mycologia, 94(3), 404-10.

- repository.ub.ac.id
- [26] Aehle, W. (2007). **Enzymes in Industry: Production and Applications**. Weinheim : John Wiley & Sons.
- [27] Lehninger, A. L. (1998). **Biochemistry**. New York : Academic Press.
- [28] Robert, R. H. (2002). **Resensi Ilmu Laboratorium Klinis**. Jakarta: EGC.
- [29] Richard, G. B. dan Richard, P. D. (2002). **Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications**. New York : Marcel Dekker Inc.
- [30] S. C., Vermelho., and Alane, B. (2013). **Methods to Determine Enzymatic Activity**. Brazil : Bentham Science.
- [31] Nurkhotimah., Evy Yulianti., dan Anna Rakhmawati. (2017). **Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Fosfatase Bakteri Termofilik Sungai Gendol Pasca Erupsi Merapi**. Jurnal Biologi, 6(8), Yogyakarta : Universitas Negeri Yogyakarta.
- [32] Noviyanti, Tri., Puji Ardiningsih., dan Winda Rahmalia. (2012). **Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Daun Sansaking (*Pycnarrhena cauliflora Diels*)**. JKK, 1(1), 31-34.
- [33] Wulandari, Ana Febrianti. (2016). **Amobilisasi Enzim Protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Menggunakan Bentonit**. *Skripsi*, Lampung : Universitas Negeri Lampung.
- [34] Chibata, Ihiro. (1978). **Immobilized Enzymes**. New York : Halsted Press.
- [35] Aulia, Fika Putri. (2017). **Amobilisasi Enzim Selulose dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Menggunakan Bentonit**. *Skripsi*. Lampung : Universitas Lampung.
- [36] Pambudi, D. S. (2013). **Pemanfaatan Pasir Laut Teraktivasi H_2SO_4 dan Tersalut Fe_2O_3 Sebagai Adsorben Ion Logam Cu (II) dalam Larutan**. *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang.

- [37] Basmal, J., Wikanta, T., dan Tazwir. (2002). **Pengaruh kombinasi perlakuan kalium Hidroksida dan Natrium Karbonat dalam Ekstraksi Natrium Alginat Terhadap Kualitas Produk yang Dihasilkan.** Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia 8, 45-52.
- [38] Rabyt, J.F., and B. J., White. (1987). **Biochemical Techniques : Theory and Practice.** Brooks/cole California : Publishing Company.
- [39] Mesla, Wifda., Chanif Mahdi., dan Sutrisno. (2014). **Optimasi Amobilisasi Xylanase dari *Trichoderma viride* Menggunakan Matriks Ca-alginat Kitosan,** Kimia Student Journal, 2(1), 428-434.
- [40] Lestari, fatma. (2010). **Bahaya Kimia : Sampling dan Pengukuran Kontaminan Kimia di Udara.** Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- [41] 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.
- [42] Hakim, Al Capi. (1997). **Isolasi dan Seleksi Bakteri Unggul Penghasil Enzim Xylanase dengan Penentuan Suhu dan pH Optimum Pertumbuhannya.** *Skripsi.* Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- [43] Prasetyawan, Sasangka. (2015). **Optimasi Amobilisasi Enzim Pektinase dari *Aspergillus niger* Menggunakan Matriks Kitosan – Natrium Tripolifosfat dan Penentuan Efisiensi Penggunaannya.** Prosding SEMIRATA. Hal 312 – 321. Pontianak : Universitas Tanjungpura.
- [44] Ratnaningsih, Nani., (2004). **Pengaruh Variasi Konsentrasi Alginat dan Konsentrasi Lipase Terhadap Aktivitas Hidrolisis dan Aktivitas Spesifik Lipase Amobil pada Proses Amobilisasi Lipase dari *Rhizopus delemar*.** Jurnal Penelitian Saintek Vol 9 (1). Pp 31-50.

- [45] Maharani, Laras Dwi., Sasangka Prasetyawan., dan Chanif Mahdi. (2013). **Optimasi Amobilisasi Urease dari *Schizosaccharomyces pombe* Menggunakan Matriks Calcium**. *Kimia Student Journal* Vol 2 (1) pp 421-427.
- [46] Ratnasari, Nike., Netty Kusumawati., dan Indah Kuswardani. (2014). **Pengaruh Konsentrasi Natrium Alginat Sebagai Penjerat Sel *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dan Lama Penyimpanan Terhadap Jumlah Sel yang Terlepas dari Karakter Carrier**. *Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi*. Vol 13 (2). Pp 81-86.
- [47] Zhanjiang, Fisheries. (1990). **Training Manual of Gracilaria Culture and Seaweed Processing in China**. Region Seafarming Development and Demonstration Project China.
- [48] Abadi, Hafizhatul. (2008). **Pembuatan Membran Alginat - Kitosan dan Kalsium Alginat – Kitosan Serta Pengujiannya Terhadap Penyembuhan Luka Marmut**. *Skripsi*. Universitas Sumatra Utara