

repository.ub.ac.id

**Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari  
*Trichoderma viride* yang diamobilisasi pada  
Matriks Zeolit Ca-Alginat**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
SHOFIATUL HANANI  
145090201111002**



**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 diamobilisasi pada Matriks Zeolit Ca-Alginat

**SKRIPSI**

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

Oleh:

**SHOFIATUL HANANI**

**145090201111002**



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

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

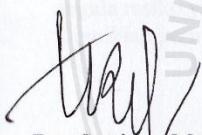
**Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang diamobilisasi pada Matriks Zeolit Ca-Alginat**

Oleh:  
**SHOFIATUL HANANI**  
145090201111002

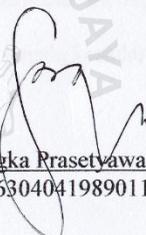
Setelah diseminarkan di depan Majelis Penguji pada tanggal.....**16 JUL 2018** dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Pembimbing II



Drs. Sutrisno, M.Si  
NIP. 196203181990021001



Dr. Sasangka Prasetyawan, MS  
NIP. 196304041989011001



Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya



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

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Shofiatul Hanani

NIM : 145090201111002

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

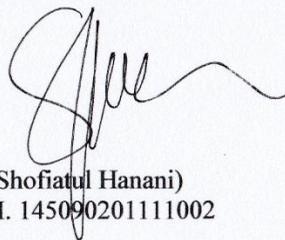
Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari  
*Trichoderma viride* yang diamobilisasi pada Matriks  
Zeolit Ca-Alginat

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 diisi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.  
Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Juli 2018

Yang menyatakan,



(Shofiatul Hanani)  
NIM. 145090201111002

# Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang diamobilisasi pada Matriks Zeolit Ca-Alginat

## ABSTRAK

Xilanase merupakan salah satu jenis enzim yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma viride* yang memiliki kemampuan untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis xilan menjadi xilosa. Amobilisasi xilanase bertujuan untuk meningkat ketahanan enzim terhadap perubahan lingkungan yang ekstrem dan agar mampu digunakan berulang kali. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui kondisi optimum meliputi pH, temperatur, dan waktu inkubasi xilanase yang diamobilisasi pada matriks zeolit Ca-alginat. Kondisi optimum dapat ditentukan dengan cara mengukur aktivitas xilanase pada variasi pH (3, 4, 5, 6, 7), temperatur (20, 30, 40, 50, 60)°C dan waktu inkubasi (35, 40, 45, 50, 55) menit pada xilanase bebas dan amobil. Diperoleh kondisi optimum xilanase bebas dan amobil masing-masing pada pH 6. Temperatur optimum xilanase bebas dan amobil masing-masing dicapai pada temperatur 50°C dan 40°C, serta waktu inkubasi optimum xilanase bebas dan amobil masing-masing dicapai pada 55 dan 45 menit.

Kata kunci: Amobilisasi xilanase, *Trichoderma viride*, zeolit, Ca-alginat, kondisi optimum

repository.ub.ac.id

## **Determination Optimum Condition of Xylanase from *Trichoderma viride* which immobilization on the Zeolite Ca-Alginate Matrix**

### **ABSTRACT**

Xylanase is one type of enzyme produced by *Trichoderma viride* mold which has the ability to catalyze the hydrolysis reaction of xylan into xylose. The immobilization of xylanase was used to increase the enzyme's resistance to extreme environmental changes and can be used repeatedly. The purpose of this research is to know the optimum conditions include pH, temperature, and incubation time of immobilized xylanase on zeolite Ca-alginate matrix. The optimum conditions can be determined by measuring xylanase activity with variation of pH (3, 4, 5, 6, 7), temperature (20, 30, 40, 50, 60) °C and incubation time (35, 40, 45, 50, 55) minutes on free and immobilized xylanases. The optimum condition of free and immobilized xylanase were reached at pH 6. The optimum temperature of both free and immobilized xylanases were reached at 50°C and 40°C, and the optimum incubation time of free and immobilized xylanase were reached 55 and 45 minute.

**Keywords:** Immobilized xylanase, *Trichoderma viride*, Zeolite, Ca-alginate, Optimum condition

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Penentuan Kondisi Optimum Xilanase dari *Trichoderma viride* yang diamobilisasi pada Matriks Zeolit Ca-Alginat**” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang. Sholawat serta salam tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya.

Penulis menyadari bahwa selama pelaksanaan dan penyelesaian skripsi ini telah banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada :

1. Drs. Sutrisno, M.Si. selaku dosen pembimbing satu dan Dr. Sasangka P., M.S selaku dosen pembimbing dua yang telah memberikan saran dan arahan dalam pelaksanaan penelitian hingga penyelesaian skripsi.
2. Masruri, S.Si, M.Si, Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia yang telah memberikan dukungan dalam proses penyelesaian skripsi.
3. Dr. Ani Mulyasuryani, MS. selaku dosen pembimbing kuliah selama 4 tahun atas saran, perhatian dan dukungannya.
4. Pertamina Foundation Scholarship yang telah membantu materil selama berkuliah kurang lebih 2 tahun serta pengalaman dan kesempatan untuk belajar lebih dalam organisasi lingkungan.
5. Bapak Sofyan dan Ibu Lamini Ekawati selaku orang tua penulis, Mbah Jinawari, Alm. Mbah Maldi, Mbah Wartu, Mbah Hanifah, Mbah Mujannah selaku kakek dan nenek penulis yang selalu mendoakan, memberi dukungan dan motivasi kepada penulis.
6. Bapak Maryono selaku Laboran Biokimia atas semua dukungan semangat dan berbagi ilmu yang terkait penelitian ini.
7. Ridha Dini Rahmawati dan M. Hafid Bramantyo selaku partner dalam penyelesaian skripsi.
8. Dyah, Nindi, Rossa, Pretty, Resti, Zulfa, Cindy dan teman-teman Kandang Aligator Chem B atas kesabaran dan motivasi yang diberikan.

9. Teman-teman Kimia semua, khususnya kimia angkatan 2014 yang telah banyak membantu selama ini.
10. Dwi Aman Nur R., Rizki Pratama Juwita S.D., Yussi Isna P., Wahyu Nurhuda T., Retno Dwi J., Mahendra Luvita Happy, Verani Eka W., dan teman-teman seperjuangan sarjan namun beda kampus, atas doa, waktu, semangat dan motivasi yang telah diberikan
11. Tante Indah dan Om Vic Toriq Sihombing, Om Wiwik, Tante Gusti, dan Bunda Ratna yang sudah menganggap saya bagian dari keluarga atas semangat, doa dan motivasi yang telah diberikan.
12. Ragel Wandoyo, Mustika Putri I., Syifa, Indah, Piun, Ipat, Hesti, Mila, Ditya dan teman-teman Sobat Bumi Malang lainnya atas motivasi yang diberikan
13. Arzaqunaa selaku partner sukses hingga kedepan kelak yang telah memberikan waktu, motivasi, kesabaran, doa dan lainnya.
14. Dhanny, Pupung, Usman, Dennis, Wandu, Aji, Aong, Haris, Ara, Mia, Nurul, Oktav, Septi, Atin, Larryta, dan teman-teman PFS V atas motivasi dan kesabaran yang diberikan.
15. Mbak Finna, Tika, Mbak Fai, Dewi, Devia, Gisma dan teman-teman kos lainnya atas hiburan dan motivasi yang diberikan.

Penulis menyadari dalam laporan ini masih banyak terdapat kekurangan. Untuk itu, penulis mengharapkan semoga laporan ini dapat bermanfaat khususnya penulis dan pembaca pada umumnya. Amin.

Malang, 16 Juli 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	<b>xii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Penelitian	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
<b>BAB II TINJUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Enzim	5
2.2 <i>Trichoderma viride</i>	6
2.3 Xilan	6
2.4 Enzim Xilanase	7
2.5 Isolasi Enzim	8
2.6 Aktivitas Enzim	9
2.7 Amobilisasi	9
2.8 Zeolit	11
2.9 Ca-Alginat	13
2.10 Penentuan Aktivitas Enzim	13
2.11 Spektrofotometri Uv-Vis	14
2.12 Hipotesis	15
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	17

3.2 Bahan dan Alat Penelitian	17
3.3 Tahapan Penelitian	18
3.4 Prosedur Kerja	18
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Isolasi Xilanase dari Kapan <i>Trichoderma viride</i>	29
4.2 Aktivitas Enzim Xilanase Bebas	29
4.3 Amobilisasi Xilanase	29
4.4 Karakterisasi Xilanase Amobil	33
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan	39
5.2 Saran	39
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	41
<b>LAMPIRAN</b>	45



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1: Struktur Molekul Xilan	7
Gambar 2.2: Struktur Kristal Zeolit	12
Gambar 2.3: Reaksi Alginat dengan $\text{Ca}^{2+}$	13
Gambar 4.1: Mekanisme Reaksi Enzimatis Pembentukan Gula Pereduksi (Xilosa)	30
Gambar 4.2: Reaksi antara Reagen DNS dengan Glukosa	31
Gambar 4.3: Kurva Pengaruh Variasi pH Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Amobil	33
Gambar 4.4: Kurva Pengaruh Variasi Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Amobil	35
Gambar 4.5: Kurva Pengaruh Variasi Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Amobil	37
Gambar D.1: Kurva Baku Larutan Standar Xilosa	50
Gambar D.2: Kurva Baku Larutan Standar Xilosa pada $\lambda_{\text{maks}}$ 485nm	51
Gambar E.1: Kurva Baku Larutan Standar Kasein	52
Gambar E.2: Kurva Baku Larutan Standar Kasein pada $\lambda_{\text{maks}}$ 540nm	53

**DAFTAR TABEL**

Tabel D.1: Data Absorbansi Larutan Xilosa $\lambda$ 470-500 nm	49
Tabel D.2: Data Absorbansi Larutan Standart Xilosa pada $\lambda$ maks 485 nm	50
Tabel E.1: Data Absorbansi Larutan Kasein (5000 $\mu\text{g/mL}$ ) pada $\lambda$ 500-580 nm	51
Tabel E.2: Data Absorbansi Larutan Standar Kasein pada $\lambda$ maks 540 nm	52
Tabel F.1: Aktivitas Xilanase Bebas	54
Tabel G.1: Konsentrasi Protein Xilanase Bebas	54
Tabel H.1: Massa Enzim Tidak Terjebak	55
Tabel I.1 : Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variasi pH	56
Tabel I.2 : Aktivitas Enzim Xilanase Amobil pada Variasi pH	56
Tabel J.1 : Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variasi Temperatur	56
Tabel J.2: Aktivitas Enzim Xilanase Amobil pada Variasi Temperatur	57
Tabel K.1: Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variasi Waktu Inkubasi	57
Tabel K.2: Aktivitas Enzim Xilanase Amobil pada Variasi Waktu Inkubasi	57
Tabel L.1: Tabel ANOVA Penentuan pH Optimum Xilanase Amobil	58
Tabel L.2: Tabel ANOVA Penentuan Temperatur Optimum Xilanase Amobil	58
Tabel L.3: Tabel ANOVA Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Xilanase Amobil	58

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Skema Kerja Penelitian	45
Lampiran B. Preparasi Larutan	
B.1 Akuades Steril	46
B.2 Larutan Asam Asetat 0.2 M	46
B.3 Larutan Natrium Asetat 0.2 M	46
B.4 Buffer Asetat pH 5	46
B.5 Larutan Stok Glukosa 1500 µg/mL	46
B.6 Larutan Baku Gula Pereduksi	46
B.7 Reagen DNS	47
B.8 Substrat Xilan 1%	47
B.9 Larutan NaOH 10%	47
B.10 Reagen Biuret	47
B.11 Larutan HCl 0.4 M	47
Lampiran C. Perhitungan Preparasi Larutan	
C.1 Larutan Asam Asetat 0.2 M	47
C.2 Larutan Natrium Asetat 0.2 M	48
C.3 Pembuatan Buffer Asetat (0.2M) pH 5	48
C.4 Larutan NaOH 0.1 M	49
C.5 Larutan HCl 0.4 M	49
Lampiran D. Grafik Larutan Standar Xilosa	49
Lampiran E. Grafik Larutan Standar Kasein	51
Lampiran F. Aktivitas Xilanase Bebas	53
Lampiran G. Konsentrasi Protein Xilanase Bebas	54
Lampiran H. Jumlah Enzim Xilanase Terjebak Zeolit Ca-Alginat	55
Lampiran I. pH Optimum Xilanase Amobil	56
Lampiran J. Temperatur Optimum Xilanase Amobil	56
Lampiran K. Waktu Inkubasi Optimum Xilanase Amobil	57
Lampiran L. Analisa Statistika	58





# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan suatu senyawa katalis pada reaksi kimia dalam sistem biologis yang memiliki kemampuan untuk mempercepat reaksi hingga  $10^8$ - $10^{11}$  kali lebih cepat jika dibandingkan dengan reaksi non katalis [1]. Kemampuan enzim sebagai katalis membuatnya memiliki banyak manfaat di berbagai industri seperti industri pangan, kesehatan, bioteknologi dan lain sebagainya. Salah satu enzim yang sering digunakan dalam bidang industri kertas adalah enzim xilanase. Enzim ini digunakan sebagai pengganti klorin dalam memutihkan warna kertas. Enzim xilanase dapat diproduksi dari jenis kapang *Trichoderma viride* [6]. Pemanfaatan kapang *Trichoderma viride* untuk menghasilkan xilanase memiliki kelebihan dibanding kapang lainnya, diantaranya adalah mampu tumbuh lebih cepat di berbagai substrat, mudah berkembang biak, mampu berkembang biak pada pH asam (3,5-6,5) dan tidak menimbulkan residu kimia [9].

Enzim memang memiliki banyak manfaat sesuai kelompok enzim itu sendiri. Namun penggunaan enzim dalam bentuk enzim bebas memiliki kelemahan dimana enzim bebas tidak mampu bertahan dalam kondisi lingkungan ekstrem seperti peningkatan pH, temperatur dan waktu inkubasi, serta tidak mampu digunakan secara berulang sehingga kurang efisien. Maka dari kekurangan tersebut, enzim bebas perlu dilakukan amobilisasi agar kestabilannya meningkat dan efisiensi penggunaan ulangnya mampu ditingkatkan juga [10].

Amobilisasi enzim didefinisikan sebagai enzim yang ditahan pada matriks tertentu secara fisik namun tetap memiliki aktivitas dan justru mampu digunakan secara berulang [31]. Proses utama dalam amobilisasi enzim memerlukan pertimbangan yang tepat dalam pemilihan material pendukung atau matriks dan metode amobil yang akan digunakan. Metode amobilisasi enzim yang sering dilakukan diantaranya metode pengikatan silang, penjebakan dan adsorpsi. Sedangkan matriks yang sering digunakan diantaranya kitosan, pasir laut, alginat, dan zeolit [32].

repository.ub.ac.id

Zeolit terdiri dari oksida rangkap  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Si}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CaO}$  dan  $\text{MgO}$  yang biasanya ditemui di batuan sedimen. Zeolit memiliki sifat-sifat istimewa diantaranya selektif permukaan, penukar ion, pengayak molekul, stabil terhadap panas dan mudah dimodifikasi sehingga banyak digunakan dalam industri sebagai katalis, *ion exchange* dan adsorben dalam pengolahan limbah [24]. Selain zeolit, matriks lain yang kerap digunakan adalah alginat. Derivate alginat yang sering digunakan untuk amobilisasi ialah kalsium, magnesium dan natrium alginat [30].

Amobilisasi enzim membuat aktivitas enzim amobil berbeda dengan enzim bebas. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut diantaranya konsentrasi substrat, aktivator dan inhibitor, konsentrasi enzim, temperatur, dan pH. Pengukuran aktivitas untuk enzim xilanase sendiri dapat dilakukan dengan mengukur jumlah produk (xilosa) yang terbentuk menggunakan metode spektrofotometri dengan menggunakan reagen DNS dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer [29].

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa enzim xilanase amobil pada matriks zeolit teraktivasi asam diperoleh kondisi optimum pada pH 6, temperatur  $50^\circ\text{C}$  dan waktu inkubasi 45 menit [27]. Peneliti [28] telah melakukan karakterisasi xilanase amobil pada matriks Ca-alginat kitosan dan diperoleh hasil kondisi optimum aktivitas enzim xilanase amobil dicapai pada pH 6, temperatur  $70^\circ\text{C}$  dan waktu inkubasi 60 menit dengan aktivitas enzim sebesar  $10,981 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$ . Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai kondisi optimum dari enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks zeolit Ca-alginat dari *Trichoderma viride*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana kondisi optimum dari enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks zeolit Ca-alginat?

### 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Induser yang digunakan pada produksi xilanase dari *Trichoderma viride* berasal dari klobot jagung.
2. Enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks zeolit Ca-alginat merupakan enzim ekstrak kasar
3. Variasi pH yang digunakan sebesar 3, 4, 5, 6, dan 7, variasi temperatur yang digunakan sebesar 20, 30, 40, 50, dan 60°C serta variasi waktu inkubasi yang digunakan sebesar 35, 40, 45, 50, dan 55 menit.
4. Kadar zeolit yang digunakan sebesar 0,1 gram dalam temperatur kamar dan kecepatan pengocokan sebesar 100 rpm dalam kurung waktu 3 jam.
5. Konsentrasi optimum yang digunakan dari xilanase yang diamobilkan sebesar 3,5mg/mL dan alginat 3% (w/v).

### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui kondisi optimum dari enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks zeolit Ca-alginat meliputi pH, temperatur dan waktu inkubasi.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi mengenai kondisi optimum enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks zeolit Ca-alginat meliputi pH, temperatur, dan waktu inkubasi.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Enzim

Enzim merupakan protein yang mampu mengkatalisis reaksi kimia dalam sistem biologis dan sekaligus mempercepat reaksi. Selain itu, enzim memiliki kemampuan untuk mengubah substrat menjadi produk baru [1]. Enzim mampu mempercepat suatu reaksi hingga  $10^8$ - $10^{11}$  kali lebih cepat jika dibandingkan dengan reaksi non katalis dan dapat mempercepat reaksi tanpa mengubah keseimbangan reaksi. Enzim memiliki aktivitas dimana aktivitas enzim merupakan jumlah enzim yang dapat menyebabkan adanya perubahan 1  $\mu\text{g}$  substrat per menit ketika keadaan optimum [2]. Aktivitas dan stabilitas enzim sendiri dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya:

##### a. Aktivator dan Inhibitor

Aktivator merupakan ion yang terdiri dari koenzim, gugus prostetik dan logam yang mampu meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik [3]. Inhibitor merupakan ion yang mampu menghambat reaksi enzimatik dimana terjadinya inhibisi ketika terjadinya penggabungan substrat dengan sisi aktif enzim. Inhibisi sendiri bisa berupa inhibisi irreversible dan invihibisi reversible yang terbagi lagi menjadi reversible kompetitif dan reversible tidak kompetitif [2].

##### b. Derajat Keasaman (pH)

Nilai pH apabila jauh dari kondisi optimum dapat menyebabkan aktivitas dan stabilitas struktur enzim menurun serta berakibat pada perubahan struktur enzim. Enzim sendiri memiliki aktivitas optimum pada pH optimum [2].

##### c. 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 jenuhnya semua sisi aktif enzim sehingga hasil reaksi tidak bertambah besar meski konsentrasi substrat terus ditambah [3].

#### d. Temperatur

Temperatur memiliki pengaruh yang besar terhadap aktivitas dan stabilitas struktur enzim. Temperatur rendah membuat aktivitas enzim rendah namun kestabilan strukturnya tinggi dan sebaliknya ketika temperatur tinggi aktivitas enzim tinggi namun kestabilan rendah. Aktivitas enzim sisa apabila lebih dari 50% dari enzim awal maka enzim tersebut dikatakan yang stabil [4]. Enzim memiliki temperatur optimum dimana jika temperatur yang diberikan sedikit diatas optimum saja mampu menyebabkan aktivitas enzim menurun, sedangkan apabila temperatur yang diberikan jauh diatas temperatur optimum maka enzim akan mengalami denaturasi [5].

### 2.2 *Trichoderma viride*

Xilanase secara umum dapat dihasilkan dari jenis mikroorganisme golongan kapang dan bakteri. *Aspergillus* dan *Trichoderma* merupakan golongan kapang yang mampu menghasilkan xilanase, sedangkan *Bacillus* dan *Clostridium* sendiri golongan bakteri penghasil xilanase [6]. Pemanfaatan kapang *Trichoderma viride* untuk menghasilkan xilanase dapat dilakukan dengan proses fermentasi, dimana kapang ini memiliki kelebihan dibanding kapang lainnya yaitu mampu tumbuh lebih cepat di berbagai substrat, mudah berkembang biak, mampu berkembang biak pada pH asam (3,5-6,5) dan tidak menimbulkan residu kimia. Selain itu *Trichoderma viride* mampu menghasilkan enzim xyloglukanolitik disamping menghasilkan enzim selulolitik lengkap, sehingga pemecahan selulosa akan lebih mudah [7].

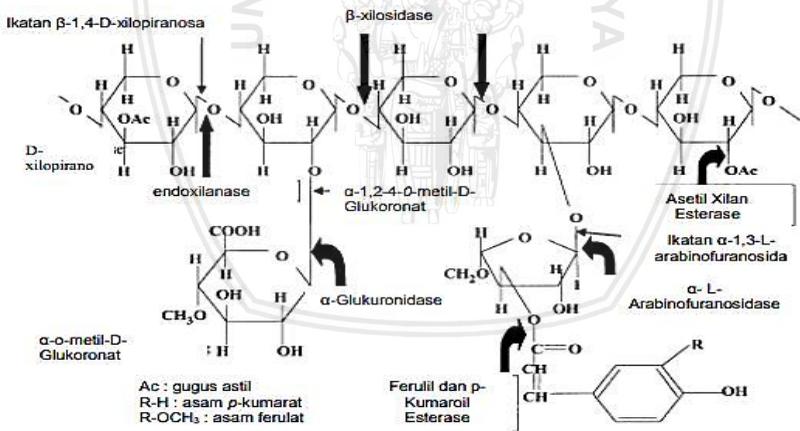
*Trichoderma viride* dikenal sebagai penghasil enzim endo-1,4- $\beta$ -xilanase yang dapat mendegradasi polimer polisakarida kompleks seperti xilan [8]. Selain itu, *Trichoderma viride* juga memproduksi spora dengan cara mitosis (aseksual), hidup pada bahan-bahan organik yang telah mati atau tumbuh langsung pada kayu yang komposisi dasarnya adalah selulosa. Diameter dari *Trichoderma viride* mampu mencapai lebih dari 5 cm dalam kurung waktu 9 hari [9].

### 2.3 Xilan

Kelompok polisakarida terbesar setelah selulosa dan salah satu komponen terbesar penyusun struktur dinding sel sekitar 20-40%

dari berat kering tanaman ialah xilan. Xilan termasuk jenis hemiselulosa yang memiliki struktur bervariasi pada berbagai tumbuhan. Secara umum kerangka dasar dari xilan ialah residu 1,4-D-xilopiranosil yang rantai sampingnya tersubstitusi dengan gugus asetil, 4-O-metil-D-glukuronosil dan  $\alpha$ -arabinofuranosil [8].

Xilan dapat diekstraksi dari tongkol jagung maupun klobot jagung. Prosesnya ialah baik tongkol jagung ataupun klobot jagung dibuat menjadi serbuk halus berukuran 150 mesh. Kemudian direndam dalam NaOCl selama 5 jam pada temperatur ruang. Kemudian ditambahkan aquades, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit, lignin yang diperoleh dikeringkan selama 24 jam pada temperatur 35°C. Selanjutnya direndam di NaOH 10% selama 24 jam pada temperatur ruang, disentrifus kembali dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit dan supernatan yang diperoleh dinetralkan dengan HCl 6N. Supernatan disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit, direndam dengan etanol 95%, disentrifus kembali dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit dan hasil yang diperoleh disebut *xylan* [25]. Berikut ini merupakan struktur dari xilan [10]:



**Gambar 2.1** Struktur Molekul Xilan

## 2.4 Enzim Xilanase

Enzim xilanase merupakan enzim yang memiliki sifat induktif. Hal ini menyebabkan enzim xilanase membutuhkan substrat sebagai induser dalam media pertumbuhan untuk menginduksi

biosintesis enzim dari mikroorganisme. Kandungan xilan yang tinggi menjadi syarat substrat yang digunakan dalam produksi xilanase. Contoh induser dengan kandungan xilan yang tinggi ialah klobot jagung dimana ia memiliki kandungan xilan yang tinggi dimana didalamnya terdapat hemiselulosa sebesar 32% [11].

Xilanase dari mikroorganisme jamur memiliki sifat ekstraseluler, sehingga proses ekstraksinya lebih mudah dari pada jamur [12]. Melalui proses fermentasi fase padat xilanase dapat diproduksi. Keuntungan dari proses fermentasi fase padat sendiri selain modal dan biaya operasi yang lebih rendah, limbah yang dihasilkan sedikit, prosesnya sederhana, wadah yang diperlukan dalam jumlah kecil, media produksi dapat menggunakan residu agroindustri dan konsentrasi produk tinggi [15].

Aplikasi xilanase cukup luas baik dibidang industri makanan, minuman, agro industri, industri pakan ternak, farmasi dan industri kertas. Xilanase pada industri pakan ternak digunakan seperti enzim lainnya seperti selulase, lipase, peptinase dan berpotensi membantu pra-perlakuan biomassa pada industri bioenergi [21]. Pada industri farmasi, xilanase digunakan sebagai salah satu jenis enzim pada formula sediaan suplemen, bahan tambahan pada formula pasta gigi dan menghambat terjadinya osteoporosis. Aplikasi enzim xilanase juga bisa digunakan untuk membantu diet penderita diabetes mellitus dan sebagai penjernih industri minuman/jus buah. Namun enzim xilanase paling sering digunakan pada industri *pulp* dalam proses *bleaching* sebagai pengganti proses kimiawi yaitu penggunaan klorin yang bersifat toksik [9].

## 2.5 Isolasi Enzim

Isolasi dalam bidang sains secara umum pemisahan senyawa atau komponen yang bercampur dimana tujuannya untuk memperoleh senyawa atau komponen tunggal secara murni. Isolasi enzim sendiri memiliki pengertian yaitu proses pengambilan enzim dari suatu sel secara kimiawi ataupun mekanik dengan cara menghancurkan dinding sel [13]. Isolasi enzim dapat dilakukan secara intraseluler maupun ekstraseluler, namun isolasi enzim intraseluler pengerjaannya lebih sulit daripada 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 [14].

Tahap awal sebelum isolasi enzim dari suatu mikroorganisme adalah pembuatan inokulum hingga pertengahan fase log dan dilanjutkan dengan produksi enzim hingga fase awal stasioner. Isolasi bisa dilakukan setelah enzim diproduksi pada fase eksponensial dimana pada fase ini pertumbuhan biomassa sesuai dengan pertumbuhan fase log [15]. Pada isolasi enzim ekstraseluler proses pemisahan bisa dilakukan dengan metode sentrifugasi, filtrasi, ekstraksi, presipitasi, koagulasi, kromatografi dan filtrasi. Metode yang paling sering digunakan adalah metode setrifugasi. Sentrifugasi merupakan metode pemisahan enzim dari sisa sel yang telah hancur sehingga ekstrak enzim kasar dapat diperoleh. Sentrifugasi dilakukan pada temperatur rendah dan dilakukan penambahan larutan buffer yang bertujuan agar pH enzim tetap stabil [20].

## **2.6 Aktivitas Enzim**

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat, aktivator dan inhibitor, konsentrasi enzim, temperatur, dan pH. Pengukuran aktivitas untuk enzim xilanase dapat dilakukan dengan mengukur jumlah produk (xilosa) yang terbentuk menggunakan metode spektrofotometri dengan menggunakan reagen DNS [16]. Glukosa mampu mereduksi DNS karena memiliki gugus aldehid yang terletak pada rantai karbon nomor satu pada xilosa dan dapat dioksidasi oleh reagen DNS menjadi gugus karbosisil. Reaksi ini membentuk senyawa berwarna merah kecoklatan, ketika dalam suasana basa sebagai asam-3-amino-5-nitrosalisilat dan dalam suasana asam sebagai asam xilonat. Absorbansi dari kompleks warna tersebut dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang visible [17].

## **2.7 Amobilisasi**

Amobilisasi merupakan proses pemeliharaan, pengendalian dan pertumbuhan pada enzim, organel ataupun sel. Amobilisasi enzim sendiri merupakan proses penahanan pergerakan molekul enzim pada maktriks tertentu dimana enzim tetap memiliki sifat katalitiknya dan mampu digunakan secara berulang [31]. Amobilisasi enzim sendiri terbagi menjadi beberapa metode diantaranya metode penjeratan

(*entrapping*), metode pengikatan pada penyangga (*carrier binding*), dan metode pengikatan silang (*crosslinking*) [19]:

### 1. Metode Penjeratan (*entrapping*)

Metode penjeratan merupakan metode dimana enzim secara langsung dijerat ke dalam matriks polimer atau dibungkus dalam membran semipermeable dengan erat sehingga enzim menjadi tidak bebas dan menjalankan fungsi katalitiknya dalam kisi-kisi polimer tersebut. Metode penjeratan sendiri terbagi menjadi dua tipe, yakni tipe kisi dan tipe mikrokapsul. Sarana penempatan enzim dapat berbentuk serabut kapiler atau mikrokapsul dan berbentuk gel.

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

Enzim pada metode ini akan diikat pada matriks yang tidak larut dalam air. Luas permukaan diameter pori matriks merupakan muatan enzim. Pada metode ini, terbagi lagi menjadi tiga jenis yaitu adsorpsi fisik, ikatan ionik dan ikatan kovalen. Permukaan padat digunakan pada metode adsorpsi, dimana enzim menempel pada permukaan matriks. Metode ini memang mudah dilakukan namun enzim mudah rusak enzim proleotik karena ikatan dan pH enzim dapat berubah. Selanjutnya pada ikatan ionik, enzim yang memiliki gugus karboksilat bermuatan negatif akan berikatan membentuk ikatan ionik dengan gugus amino pada matriks yang bermuatan positif. Sedangkan pada ikatan kovalen, enzim berikatan dengan matriks yang tidak larut dalam air dan ikatan yang terbentuk bersifat kuat.

### 3. Metode Pengikatan Silang

Metode ini didasarkan pada pembentukan ikatan kovalen antara enzim dan matriks. Enzim saling berikatan silang membentuk ikatan melintang dengan pereaksi bifungsional ataupun multifungsional seperti glutaraldehid. Kelemahan metode ini yaitu adanya distorsi dari konformasi enzim selama proses ikatan silang dan adanya penurunan aktivitas enzim yang disebabkan perubahan konformasi enzim.

Tujuan dilakukannya amobilisasi enzim adalah menambah daya tahan enzim terhadap lingkungan seperti pelarut, pH, temperatur dan penggunaan kembali enzim tersebut secara kontinu [30]. Enzim

amobil memiliki kelebihan daripada enzim bebas, diantaranya adalah bisa digunakan secara berulang kali, lebih stabil, lebih tahan terhadap serangan protease dan mudah dipisahkan dari campuran. Kelebihan dari enzim amobil itu sendiri menjadikannya memiliki nilai jual yang lebih daripada enzim bebas [18].

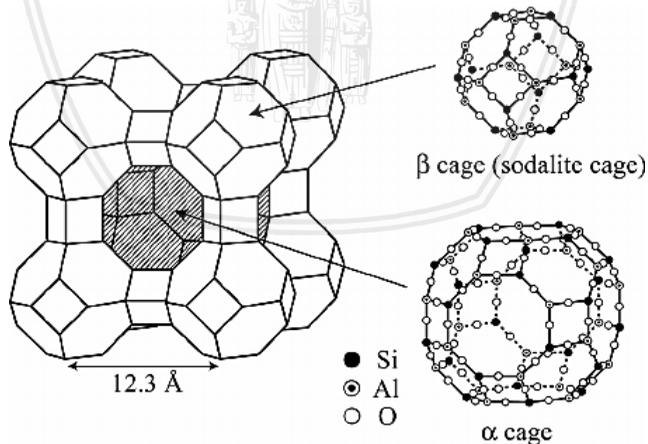
Matriks merupakan salah satu bagian terpenting dalam amobilisasi enzim. Matriks sangat penting dalam penentuan kinerja sistem amobil, dimana karakter matriks yang mendukung sistem amobil ialah ketahanan fisik terhadap serangan mikroba, ketahanan kompresi, hidrofilik dan biokompabilitas [31]. Karakter dari enzim bebas dan amobil tentu berbeda. Karakter ini dipengaruhi oleh jenis matriks dan metode amobilisasi yang dipilih. Beberapa perbedaan karakter dari enzim amobil diantaranya perubahan aktivitas, kondisi pH optimum dan kondisi temperatur optimum. Perubahan aktivitas enzim amobil cenderung mengalami penurunan hal ini diakibatkan ketika dilakukan amobilisasi, konfigurasi antara enzim dan matriks mampu menghalangi substrat untuk berikatan dengan enzim [30]. Kondisi pH optimum enzim amobil memiliki karakter berbeda dengan enzim bebas yang disebabkan oleh adanya distribusi ion  $H^+$ , ion  $OH^-$  dan substrat bermuatan. Apabila matriks memiliki karakter bermuatan negatif maka pergeseran pH untuk enzim amobil cenderung bergeser ke pH basa, sedangkan jika matriks memiliki karakter bermuatan positif maka pergeseran pH untuk enzim amobil cenderung bergeser ke pH asam [31]. Kondisi temperatur optimum dari enzim amobil bisa lebih rendah atau lebih tinggi daripada enzim amobil. Enzim amobil mampu bertahan di temperatur rendah berkisar  $20^{\circ}C$  dan mampu bertahan di temperatur tinggi berkisar  $70^{\circ}C$ . Pergeseran kondisi temperatur optimum enzim amobil ini bergantung dari jenis matriks yang digunakan, karena setiap matriks memiliki karakter khas tersendiri [32].

## 2.8 Zeolit

Zeolit merupakan mineral yang biasanya bisa ditemukan di dalam batuan sedimen, terutama kristal dari kelompok aluminium silikat. Zeolit memiliki kapasitas tukar kation (KTK) yang lebih tinggi dibandingkan bentonit, zeolit jenis klinoptilolit memiliki total KTK berkisar antara (1,5-2,0) meq/g sedangkan untuk jenis bentonit total KTK berkisar (0,4-1,2) meq/g. Zeolit yang ditemukan di alam biasanya

memiliki kandungan pengotor seperti Na, K Ca, Mg dan Fe. Zeolit terdiri dari oksida rangkap  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Si}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CaO}$  dan  $\text{MgO}$  yang biasanya ditemui di batuan sedimen []. Zeolit tersusun atas mineral kristal alumina silica tetrahidrat berpori dan terdiri dari tiga struktur dimensi, terbentuk oleh  $[\text{SiO}_4]^+$  dan  $[\text{AlO}_4]^{5-}$  yang dihubungkan oleh atom-atom oksigen [24]. Zeolit mengandung kation alkali atau alkali tanah dalam kerangka tiga dimensinya, dimana kation tersebut tergantikan oleh kation-kation lain tanpa merusak struktur zeolit dan bersifat mampu menyerap air secara *reversible*. Molekul atau kation lain tersebut akan mampu bergerak bebas sehingga memungkinkan zeolit dapat digunakan sebagai matriks pendukung untuk amobilisasi enzim [27].

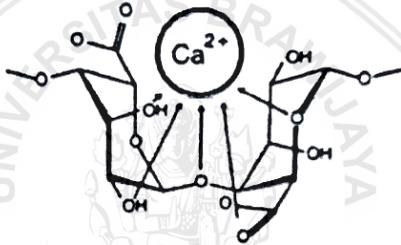
Zeolit memiliki sifat-sifat istimewa seperti selektif permukaan, penukar ion, pengayak molekul, stabil terhadap panas dan mudah dimodifikasi sehingga banyak digunakan dalam industri sebagai katalis, *ion exchange* dan adsorben dalam pengolahan limbah. Zeolit mudah mengalami dehidrasi apabila dipanaskan, struktur kerangkanya akan menyusut namun kerangka dasar zeolit tidak mengalami perubahan. Zeolit yang terhidrasi memiliki struktur pro terbuka dengan *internal surface area* besar yang membuatnya mampu mengadsorb molekul selain air semakin tinggi. Berikut adalah struktur dari kristal zeolit [24]:



**Gambar 2.2** Struktur Kristal Zeolit

## 2.9 Ca-alginat

Ca-alginat merupakan salah satu matriks yang dapat digunakan sebagai media pengebakan dengan memanfaatkan metode melokalisasi enzim dalam kisi matriks atau mikrokapsul, namun enzim tetap mampu mempertahankan kemampuan untuk menerima substrat. Penggunaan Ca-alginat sebagai matriks memiliki kelebihan mampu membentuk gel yang kokoh, tidak beracun dan pengerjaannya bisa dikerjakan pada temperatur ruang [22]. Terbentuknya gel pada Ca-alginat ketika digunakan sebagai matriks akibat adanya ikatan ionik antara alginat dan kation. Selain itu juga diakibatkan oleh ukuran molekul dan komposisi alginat yang mengandung asam gluronat. Ketika Na-alginat didalam larutan  $\text{CaCl}_2$  maka dua ion  $\text{Na}^+$  akan tergantikan oleh satu ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Ukuran manik yang terbentuk sekitar 5-200 nm. Berikut adalah reaksi alginat dengan  $\text{Ca}^{2+}$  [30]:



Gambar 2.3 Reaksi Alginat dengan  $\text{Ca}^{2+}$

## 2.10 Penentuan Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan unit. Satu unit aktivitas enzim adalah jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mengubah 1  $\mu\text{mol}$  substrat menjadi sebuah produk dalam waktu satu menit pada temperatur dan pH optimum [23]. Penentuan unit aktivitas xilanase dilakukan dengan mengamati kadar gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat enzim [16]. Reagen DNS (asam dinitrosalisilat) dapat digunakan untuk penentuan gula pereduksi secara spektrofotometri. 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 kompleks asam-3-amino-5-nitrosalisilat yang berwarna merah kecoklatan. Sedangkan xilosa akan teroksidasi menjadi asam xilonat [23]. Penelitian kali ini digunakan standar

xilosa, sehingga dalam reaksinya terjadi proses oksidasi xilosa menjadi xilonat.

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 480-560 nm, setelah itu absorbansi yang diperoleh diplotkan terhadap kurva standar xilosa untuk mengetahui besarnya unit aktivitas yang terdapat pada ekstrak kasar [29].

## 2.11 Spektrofotometri Uv-Vis

Spektrofotometri Uv-vis adalah pengukuran serapan cahaya pada daerah ultraviolet (200-400) nm dan sinar tampak/*visible* (400-800) nm. Metode pengukuran pada spektrofotometri adalah absorpsi cahaya pada panjang gelombang tertentu melalui suatu larutan yang mengandung kontaminan dan konsentrasinya akan ditentukan [29]. Prinsip kerja spektrofotometri adalah jumlah cahaya yang diabsorpsi oleh larutan sebanding dengan konsentrasi kontaminan dalam larutan. Prinsip ini dijabarkan dalam Hukum Lambert-Beer, berikut persamaanya [26]:

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

Keterangan:

A = Absorbansi

I<sub>in</sub> = Intensitas cahaya yang masuk

I<sub>out</sub> = Intesitas cahaya yang keluar

T = Trasnmitansi

ε = Tetapan absorpsivitas molar (L/mol.cm)

b = Panjang jalur/lebar kuvet (cm)

c = Konsentrasi suatu bahan yang mengabsorpsi (mol/L)

Pelarut yang digunakan pada prosedur spektrofotometrik menimbulkan beberapa masalah diantara, pelarut tidak hanya harus melarutkan sampel, namun tidak boleh juga menyerap cukup banyak dalam daerah dimana penetapan itu dibuat. Aquades merupakan pelarut yang memiliki kemampuan tembus cahaya di seluruh daerah tampak dan turun hingga panjang gelombang 200 nm di daerah ultraviolet. Pelarut aquades tidak cocok untuk digunakan pada

senyawa organik, untuk senyawa organik biasanya digunakan pelarut seperti metanol, etanol, dan dietil eter [29].

## 2.12 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah variasi pH, temperatur dan waktu inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas xilanase yang diamobilkan pada matriks zeolit Ca-alginat sehingga diperoleh kondisi optimum pada xilanase amobil.





## 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 Maret hingga Mei 2018.

#### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

##### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah hasil biakan murni *Trichoderma viride* dari Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang.

Bahan kimia yang digunakan memiliki kualitas derajat kemurnian pro analisis (p.a) dan *for microbiology*. Bahan-bahan kimia dengan kualitas pro analis (p.a) diantaranya  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$  (NaK-tartrat),  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaOCl}$ ,  $\text{HCl}$  asam asetat glasial, urea, glukosa anhidrat, DNS (asam dinitrosalisilat), reagen biuret, fenol, dextrose, Ca-alginat, dan zeolit.

Bahan-bahan kimia dengan kualitas *for microbiology* diantaranya pepton, kasein, tepung agar, tween-80, sedangkan bahan lain yang digunakan adalah aquades, kentang dan klobot jagung.

##### 3.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini ialah seperangkat alat gelas yang terdiri dari corong gelas, gelas arloji, rak tabung reaksi, tabung reaksi, pengaduk gelas, labu ukur (100 mL, 25 mL, 10 mL), pipet tetes, pipet ukur (10 mL, 5 mL), erlenmeyer (250 mL, 100 mL), gelas kimia (500 mL, 250 mL, 100mL), termometer dan kuvet. Selain itu digunakan alat lainnya seperti grinder, blender, statif, pengaduk magnet (*stirer*), botol semprot, aluminium foil, kertas coklat, jarum ose, kapas, kasa steril, bunsen burner, ayakan (150 mesh dan 120 mesh), oven, neraca analitik, syringe 10 mL, kertas saring Whatman No. 40, pemanas listrik, pipet mikro 1,0  $\mu\text{L}$ , bola hisap, autoklaf, *laminar air flow*, inkubator, pH meter, lemari pendingin, pemanas air, sentrifus dingin, *shaker*, dan *spektronik Genesys 20*.

### 3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan tepung dari klobot jagung
2. Pembuatan media padat
3. Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*
4. Pembuatan media cair
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi dan isolasi enzim
7. Penentuan kurva baku standart
  - 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 zeolit 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 xilanase amobil
  - Penentuan pengaruh pH penyimpanan terhadap aktivitas xilanase bebas dan xilanase amobil
  - Penentuan pengaruh temperatur penyimpanan terhadap aktivitas xilanase bebas dan xilanase amobil
  - Penentuan pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas xilanase bebas dan xilanase amobil
13. Analisis data

### 3.4 Prosedur Kerja

#### 3.4.1 Pembuatan Tepung Klobot Jagung

Klobot jagung yang segar dikering anginkan terlebih dahulu, kemudian dicuci dengan aquades dan dikering anginkan. Klobot jagung yang tidak terlalu basah lalu dikeringkan kembali dengan oven

18

repository.ub.ac.id

pada temperatur 100°C, setelah itu dipotong menjadi ukuran lebih kecil menggunakan *grinder* lalu dihaluskan dengan blender. Klobot jagung yang sudah halus diayak menggunakan ayakan 150 mesh dimana serbuk halus yang lolos ayakan disimpan dan digunakan sebagai induser.

### 3.4.2 Pembuatan Media Padat

Media padat pada penelitian ini yang digunakan adalah *Potatoes Dextrose Agar* (PDA). Pembuatan PDA dilakukan dengan mengupas kentang dan ditimbang sebanyak 20 g, kemudian kentang dicuci dengan aquades dan dipotong-potong hingga ukurannya kecil. Kentang yang sudah berukuran kecil dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL, ditambah aquades hingga volumenya 100 mL, lalu dipanaskan diatas pemanas listrik selama  $\pm$  1 jam dan sesekali ditambahkan aquades agar volumenya tetap 100 mL.

Sari kentang yang sudah dipanaskan lalu disaring menggunakan kertas saring Whatman No.40 dan ditampung dalam erlemeyer. Kemudian dipindahkan ke gelas kimia 100 mL, ditambahkan dextrose 2 g, larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 sebanyak 1 mL, lalu kembali dipanaskan hingga larutan mendidih dan ditambahkan 1,5 g tepung agar sambil diaduk.

Larutan PDA kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dimana setiap tabung diisi  $\pm$  4 mL dan ditutup dengan kapas steril yang dilapisi kertas coklat dan diikat rapat. Selanjutnya larutan PDA disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 15 psi. Larutan PDA steril dikeluarkan dari autoklaf lalu didinginkan pada temperatur ruang dengan posisi miring dan dibiarkan selama 24 jam, apabila larutan PDA sudah padat, disimpan di dalam lemari pendingin.

### 3.4.3 Peremajaan Biakan Murni *Trichoderma viride*

Biakan *Trichoderma viride* murni diremajakan di dalam *laminar air flow* dengan cara dipanaskannya mulut tabung biakan *Trichoderma viride* dan mulut tabung media padat dengan nyala api bunsen agar steril. Kemudian spora *Trichoderma viride* diambil dengan jarum ose 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,054 g urea, 0,09 g pepton, 0,054 g  $\text{CaCl}_2$ , 0,252 g  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , 0,036 g tween-80, 0,054 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 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 (0,2M) pH 5, diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Kemudian ditutup dengan kapas steril dan dilapisi kertas coklat. Campuran disterilkan di dalam autoklaf dengan temperature 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit.

#### **3.4.5 Pembuatan Inokulum**

Pembuatan inokulum sama halnya dengan peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*, dimana dilakukan di dalam *laminar air flow*. Spora dari biakan murni *Trichoderma viride* yang berumur 6 hari diambil sebanyak satu jarum ose dengan jarum ose steril, dipindahkan secara aseptis ke dalam media cair steril 25 mL. Selanjutnya diinkubasi dengan menggunakan *shaker* selama 36 jam (pertengahan fase logaritma) dengan kecepatan 150 rpm pada temperatur ruang. Kemudian diambil sebanyak 5 mL dari inokulum pertama yang dihasilkan dan dipindahkan secara aseptis ke media cair steril sebanyak 50 mL yang baru pada 4 erlemeyer berbeda. Tahap terakhir yaitu dilakukan inkubasi kembali di temperatur ruang selama 36 jam dengan menggunakan *shaker* pada kecepatan 150 rpm.

#### **3.4.6 Produksi dan Isolasi Enzim**

Erlenmeyer 250 mL sebanyak 6 buah masing-masing diisi media cair steril sebesar 180 mL, lalu 18 mL inokulum ditambahkan secara aseptis ke dalam setiap erlemeyer. Selanjutnya diinkubasi selama 60 jam (awal fase stasioner) dengan *shaker* kecepatan 150 rpm pada temperatur ruang dan digunakan metode sentrifugasi untuk mengisolasi enzim. Setiap media produksi yang telah diinkubasi ditambah larutan buffer asetat (0,2M) 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 Standart**

#### **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 15 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 digunakan ialah aquades dengan diberikan perlakuan yang sama seperti sampel. Absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Genesys 20* pada kisaran panjang gelombang 480-530 nm. Hasil yang diperoleh dicatat dan nilai absorbansi paling besar digunakan sebagai panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{maks}$ ).

#### **b) Pembuatan kurva baku gula pereduksi**

Padatan serbuk xilosa ditimbang sebanyak 0,15 g, kemudian dimasukkan 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 glukosa 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 15 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 Genesys 20* pada panjang gelombang ( $\lambda_{\text{maks}}$ ). Hasil yang diperoleh dibuat kurva baku gula pereduksi sebagai hubungan antara konsentrasi larutan xilosa ( $\mu\text{g/mL}$ ) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

**c) Penentuan panjang gelombang maksimum larutan kasein**

Larutan kasein 5000  $\mu\text{g/mL}$  dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 2 mL dengan cara dipipet, 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 Genesys 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.

**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  $\mu\text{g/mL}$ .

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)  $\mu\text{g/mL}$ . Setiap masing-masing konsentrasi larutan kasein dipipet dengan volume sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan larutan buffer asetat (0,2M) 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 Genesys 20* pada panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) dan hasil yang diperoleh lalu digunakan untuk membuat kurva baku kasein sebagai hubungan antara konsentrasi kasein ( $\mu\text{g/mL}$ ) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

### 3.4.8 Uji Aktivitas Xilanase Bebas dan 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  $60^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Kemudian ditambahkan ekstrak kasar xilanase sebanyak 1 mL, larutan buffer asetat (0,2M) pH 5 sebanyak 1 mL, dan air bebas reduktor sebanyak 1 mL. Setelah itu, diinkubasi selama 55 menit ke dalam penangas air pada temperatur  $60^{\circ}\text{C}$ . Didinginkan dengan air mengalir lalu ditambahkan reagen DNS sebanyak 2 mL dan dipanaskan kembali selama 5 menit di dalam penangas air kemudian 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 Genesys 20* pada panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) dan hasil yang diperoleh dicatat.

#### b) Pengukuran aktivitas xilanase bebas

Enzim bebas didalamnya memiliki aktivitas yang dinyatakan dalam satuan unit. Setiap satu unit aktivitas merupakan satu  $\mu\text{g}$  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:

$$AE = \frac{x \times v \times fp}{p \times q}$$

Keterangan:

AE = aktivitas enzim ( $\mu\text{g. mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ )

X = konsentrasi gula pereduksi ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )

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  $\mu\text{g/mL}$  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 Genesys 20* pada panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) 540 nm dan kadar protein awal diketahui dengan cara memplotkan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva baku kasein.

## 3.4.9 Amobilisasi Xilanase pada Matriks Zeolit Ca-Alginat

### a) Preparasi Matriks Zeolit

Mineral zeolit 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.

### b) Aktivasi Matriks Zeolit

Mineral zeolit 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 zeolit 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 Zeolit Ca-alginat Teraktivasi**

Ekstrak kasar xilanase dipipet sebanyak 2,8 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan buffer asetat 0,2 M pH 5 hingga volume total menjadi 5 mL. Larutan tersebut kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer yang berisi 0,1 g zeolit yang telah diaktivasi lalu dikocok dengan shaker selama 3 jam dengan kecepatan 100 rpm. Hasil pengocokan kemudian disaring dengan kertas saring Whatman No 40 dan filtrat yang diperoleh digunakan untuk mengukur jumlah enzim yang tidak terjebak di dalam matriks dengan menguji kadar protein sisanya. Padatan yang tertahan di kertas saring Whatman No 40 dicampurkan dengan larutan alginat sebanyak 4 mL konsentrasi 3%. Larutan campuran xilanase dan alginat diteteskan dengan syringe 10 mL pada gelas kimia yang berisi larutan  $\text{CaCl}_2$ . Kemudian manik-manik yang terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan  $\text{CaCl}_2$  0,15 M selama satu jam lalu disaring dengan kertas saring Whatman No.40 dan xilanase amobil diuji aktivitasnya sedangkan filtratnya digunakan untuk menguji kadar protein sisa.

**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 absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Genesys 20* pada panjang gelombang maksimum 540 nm

kasein sehingga diketahui kadar protein sisa dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar kasein.

### **3.4.11 Penentuan Aktivitas Xilanase Amobil**

Subtrat xilan 1% sebanyak 1 mL yang sudah diinkubasi selama 15 menit pada temperatur 60° C 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 agar enzim amobilnya terpisah. Kemudian dididihkan selama 5 menit dan didinginkan dalam air mengalir. Larutan campuran kemudian diencerkan hingga volumenya 25 mL dengan aquades. Absorbansi larutan diukur dengan instrumen *spektronik Genesys 20* pada panjang gelombang maksimal xilosa 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 Xilanase Bebas dan Xilanase Amobil**

#### **a) 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 ekstrak kasar xilanase 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 (3-7) 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. Setelah itu seluruh tabung ditambah reagen DNS sebanyak 2 mL dan dididihkan dalam penangas

air selama 5 menit. Didinginkan dengan air 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 *spektronik Genesys 20* pada panjang gelombang maksimum xilosa. Hasil yang diperoleh digunakan untuk penentuan aktivitas xilanase amobil. Perlakuan ini dilakukan secara duplo

**b) Penentuan Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Xilanase Bebas dan Xilanase Amobil**

Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan variasi temperatur pada 20, 30, 40, 50, dan 60°C menggunakan sampel enzim xilanase bebas (A) dan manik-manik gel enzim xilanase (B) pada pH optimum yang diperoleh. Kemudian diberikan prosedur yang sama seperti variasi pH hanya saja setelah diperoleh larutan campuran, waktu inkubasi yang diberikan untuk menginkubasi sampel selama 30 menit.

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

Hasil yang diperoleh dari uji aktivitas xilanase bebas dan amobil pada pH dan temperatur optimum digunakan untuk menentukan waktu inkubasi optimum dengan variasi waktu inkubasi selama (35; 40; 45; 50; 55) menit. Kemudian diberikan prosedur yang sama seperti variasi pH hanya saja setelah diperoleh larutan campuran, lama waktu inkubasi yang diberikan bervariasi pada setiap tabung reaksi.

### **3.4.13 Analisis Data**

Data aktivitas enzim xilanase bebas dan enzim xilanase amobil pada matriks Ca-Alginat yang dipengaruhi oleh variasi pH, temperatur dan waktu inkubasi serta dianalisis menggunakan program SPSS 17.00 dengan uji ANOVA.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Isolasi Xilanase dari Kapang *Trichoderma viride*

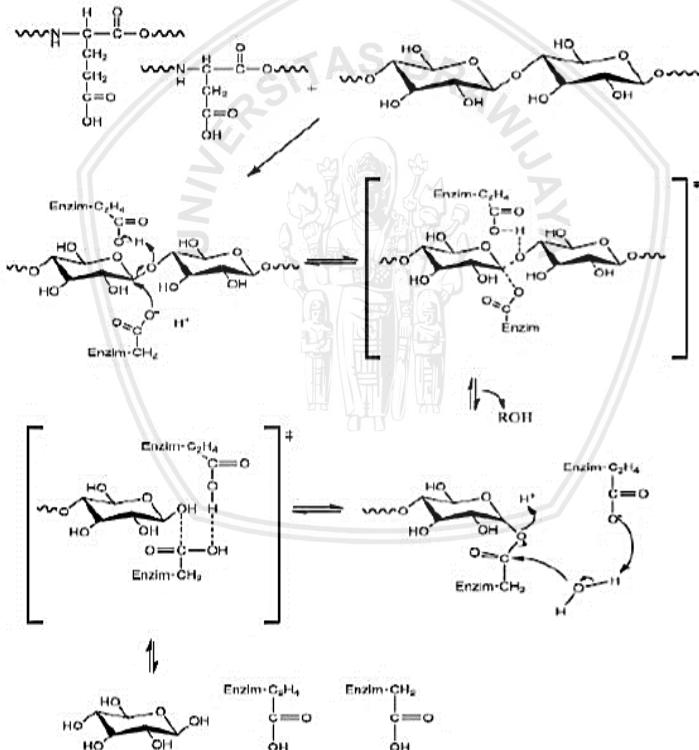
Xilanase merupakan salah satu enzim ekstraseluler yang bersifat induktif karena terbentuknya enzim xilanase sendiri dibutuhkan adanya substrat sebagai induser [1]. Pada penelitian ini, enzim xilanase diisolasi dari kapang jenis *Trichoderma viride* dengan tepung klobot jagung sebagai induser. Menurut literature [11] klobot jagung dipilih sebagai induser dikarenakan memiliki kandungan hemiselulosa sebesar 32%. Komponen terbesar dari hemiselulosa ialah xilan dan xilan dalam hemiselulosa dapat dihidrolisis secara enzimatik oleh xilanase.

Produksi xilanase diawali dengan proses menumbuhkan kapang pada media cair sampai pertengahan fase logaritma (36) jam. Fase ini merupakan fase dimana pertumbuhan jamur sangat cepat sehingga sangat aktif dalam memproduksi enzim. Selanjutnya dipindahkan pada media cair yang baru dan diinkubasi dengan lama waktu yang sama. Media cair pada proses produksi ini mengandung tepung klobot jagung dan ditambahkan buffer asetat 0,2 M pH 5 yang berfungsi selain untuk menjaga stabilitas dan aktivitas enzim, juga berfungsi sebagai pelarut enzim. Enzim diproduksi hingga mendekati fase akhir eksponensial atau awal stasioner (60) jam. Fase akhir eksponensial atau fase awal stasioner ini dipilih karena pada fase ini diharapkan isolat sudah secara maksimal memproduksi enzim xilanase. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dingin untuk memisahkan supernatan yang mengandung enzim dari endapan sel. Sentrifugasi sendiri merupakan salah satu metode pemisahan yang berdasarkan ukuran dan berat molekul. Sentrifugasi dingin pada penelitian ini dipilih agar enzim tetap dalam keadaan steril bebas dari bakteri dan pengotor lain. Ekstrak hasil sentrifugasi dingin merupakan ekstrak kasar enzim xilanase sedangkan endapan merupakan sisa sel kapang dan komponen media produksi lain.

#### 4.2 Aktivitas Enzim Xilanase Bebas

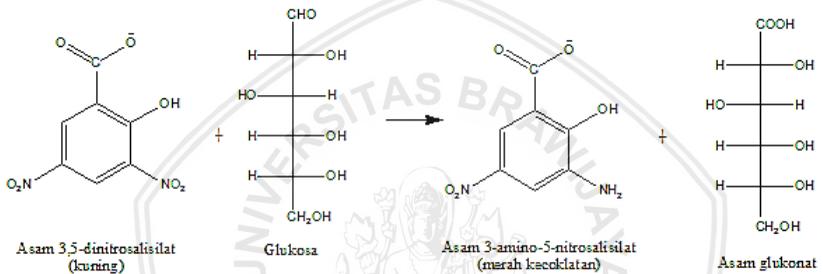
Aktivitas enzim xilanase bebas didefinisikan sebagai jumlah gula pereduksi (xilosa) yang dihasilkan oleh xilanase per menit. Pembentukan gula pereduksi terjadi antara substrat xilan dengan sisi

aktif enzim dimana sisi aktif enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis xilan adalah gugus karboksil (-COOH). Gugus karboksil ini merupakan rantai samping asam amino jenis asam glutamat dan asam aspartat. Mekanisme reaksi enzimatik pembentukan xilosa terjadi ketika gugus karboksil (jenis asam glutamat dan asam aspartat) mengalami ionisasi sehingga sebagai nukleofil akan menyerang ikatan glikosidik pada atom C<sub>1</sub> yang mengikat atom O. Sedangkan atom H dari gugus karboksil residu asam amino glutamat akan menerima PEB (pasangan elektron bebas) dari atom O sehingga terbentuk kompleks enzim-substrat. Kemudian, kompleks enzim-substrat dihidrolisis oleh H<sub>2</sub>O sehingga terbentuk xilosa dan enzim diperoleh kembali. Mekanisme yang mungkin terjadi terdapat pada gambar 4.1.



**Gambar 4.1.** Mekanisme Reaksi Enzimatik Pembentukan Gula Pereduksi (Xilosa)

Berdasarkan uji aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase terhadap substrat xilan 1% dihasilkan aktivitas enzim sebesar  $60.024 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$ . Hasil uji aktivitas enzim xilanase bebas tersebut diperoleh dengan menggunakan metode spektrofotometri pada  $\lambda_{\text{maks}}$  480 nm menggunakan reagen DNS dimana penentuan kadar gula pereduksinya didasarkan oleh pembentukan kompleks warna yang berasal dari asam dinitrosalisilat yang tereduksi oleh gula pereduksi hasil hidrolisis enzim xilanase. Senyawa yang dihasilkan dari metode tersebut adalah asam-3-amino-5-nitrosalisilat yang memiliki kompleks warna kuning-kecoklatan sedangkan gula pereduksi mengalami oksidasi. Berikut merupakan gambar 4.2. yang menunjukkan reaksi antara reagen DNS dengan glukosa



**Gambar 4.2.** Reaksi antara Reagen DNS dengan Glukosa

Penentuan kadar protein xilanase menggunakan metode biuret diperoleh kadar protein awal xilanase sebesar  $1825 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Pengukuran kadar protein awal xilanase secara spektrofotometri pada  $\lambda_{\text{maks}}$  540 nm dapat ditentukan dengan metode biuret yang didasarkan pada pembentukan kompleks  $\text{Cu}^{2+}$  dengan gugus  $-\text{CO}$  dan  $-\text{NH}$  dari rantai peptide dalam suasana basa yang berwarna biru.

## 4.3 Amobilisasi Xilanase

### 4.3.1 Preparasi dan Aktivasi Zeolit

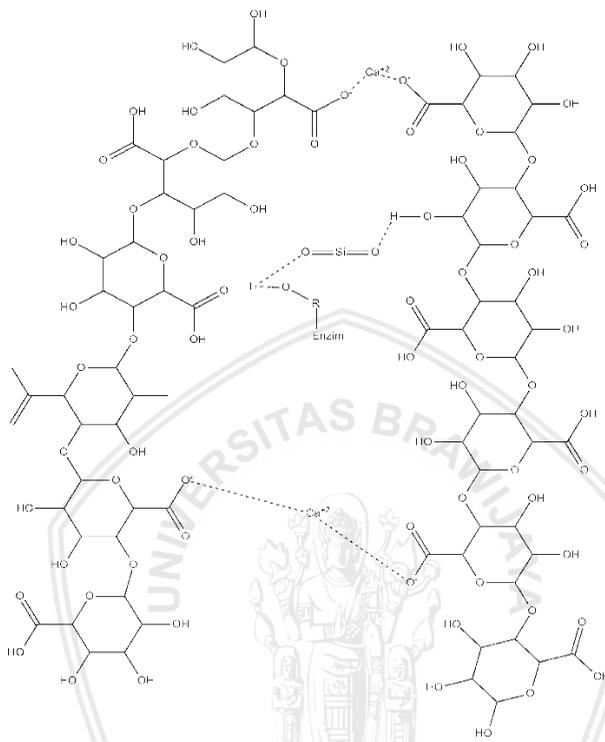
Matriks yang digunakan pada penelitian kali ini ialah mineral zeolit alam. Zeolit secara umum memiliki pori-pori yang didalamnya terdapat pengotor dengan luas permukaan kecil. Sehingga pemanfaatan zeolit sebagai matriks perlu ditingkatkan kemampuan adsorpsinya dengan cara aktivasi. Beberapa pengotor zeolit yang berada di rongga zeolit diantaranya kation Na, Ca, Fe

dan Mg serta terdapat pula molekul air. Zeolit yang masih berikatan dengan pengotor diaktivasi dengan HCl 0,4 M. Aktivasi zeolit akan memperbaiki karakter zeolit sebagai adsorben dan meningkatkan luas permukaan zeolit. Proses aktivasi mengakibatkan terjadinya pertukaran ion  $H^+$  dari HCl dengan kation pengotor zeolit, ion  $H^+$  tersebut kemudian akan mengisi rongga-rongga zeolit yang telah terbebas dari pengotor. Kemudian untuk mengurangi kandungan kristal hidrat pada zeolit dilakukan kalsinasi pada temperatur tinggi namun masih dibawah titik leleh zeolit. Setelah dilakukan aktivasi dan kalsinasi, luas permukaan zeolit menjadi lebih besar dan pori-porinya terbebas dari pengotor, sehingga zeolit bisa digunakan sebagai matriks.

#### 4.3.2 Amobilisasi Enzim

Enzim xilanase apabila dalam bentuk bebas memiliki karakter yang kurang stabil terhadap lingkungan. Stabilitas enzim dapat ditingkat dengan cara amobilisasi. Pada penelitian ini, amobilisasi yang digunakan ialah metode adsorpsi fisik menggunakan zeolit yang teraktivasi kemudian digunakan Ca-alginat sebagai penjebak. Ekstrak kasar yang dihasilkan dari isolasi yang ditambahkan buffer asetat dan padatan zeolit teraktivasi dishaker agar terjadi kontak yang sempurna. Proses ini menjadikan enzim teradsorpsi di pori-pori zeolit. Terbentuk ikatan hidrogen antara zeolit dan enzim yang berasal dari salah satu rantai samping enzim yang tidak aktif dan mengandung gugus karboksil ( $OH^-$ ) berikatan dengan atom hidrogen dari zeolit hasil aktivasi. Setelah dilakukan amobilisasi dengan adsorpsi fisik, dilakukan penjebakan dengan Na-Alginat. Enzim yang teradsorpsi didalam zeolit dicampur dengan Na-alginat, kemudian campuran tersebut ditetaskan dengan syringe kedalam larutan  $CaCl_2$ . Terjadi pertukaran kation antara  $Ca^{2+}$  dengan  $Na^+$  ketika campuran direndam  $CaCl_2$  dan menghasilkan manik-manik gel. Filtrat yang diperoleh dari proses pencampuran buffer asetat, ekstrak xilanase dan zeolit diukur total volumenya kemudian diukur kadar protein sisanya. Setelah itu, manik-manik yang terbentuk ditimbang seluruh massa manik-manik dan diperoleh massa total sebesar 3.5 gram dengan filtrat 3.5 mL untuk amobil pertama dan 3 gram manik-manik dengan filtrat 3 mL untuk

amobil kedua. Diperoleh kadar protein sisa sebesar 2450  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  untuk amobil pertama dan kadar protein sisa sebesar 600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  untuk amobil kedua.

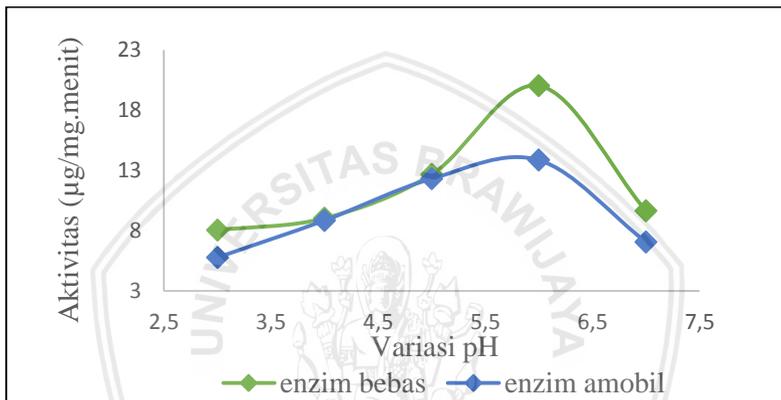


**Gambar 4.3:** Enzim Xilanase Terjebak pada Matriks Zeolit Ca-alginat

**4.4 Karakterisasi Xilanase Amobil**  
**4.4.1 Penentuan pH Optimum**

Enzim memiliki pH optimum spesifik yang menyebabkan aktivitas dan stabilitas enzim tinggi. Secara umum enzim xilanase menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH 3,5-8 [2]. Kondisi pH optimum enzim adalah nilai pH optimum dari enzim untuk beraktivitas maksimum. Perubahan pH akan berpengaruh terhadap aktivitas enzim, hal ini disebabkan muatan gugus aktif pada enzim mengalami perubahan tingkat ionisasi.

Penelitian kali ini dilakukan pengamatan perubahan aktivitas xilanase bebas dan amobil pada variasi pH 3, 4, 5, 6, 7 dan hasilnya dapat dilihat pada gambar 4.3. Berdasarkan gambar tersebut, menunjukkan bahwa enzim xilanase amobil mencapai kondisi optimum pada pH 6 dengan aktivitas sebesar  $13,8596 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$ , sedangkan xilanase bebas mencapai kondisi optimum pada pH 6 dengan aktivitas sebesar  $20,0458 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$ . Berdasarkan hasil uji analisis statistika *one-way* ANOVA diperoleh F hitung ( $66,373$ ) > F tabel ( $5,19$ ) sehingga perlakuan variasi pH mempengaruhi aktivitas enzim xilanase.



**Gambar 4.4:** Kurva Pengaruh Variasi pH Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Amobil

Berdasarkan kurva diatas, pada pH 3, 4 dan 5 aktivitas xilanase amobil cenderung mengalami kenaikan. Hal ini disebabkan karena bentuk aktif dari asam amino enzim xilanase belum tercapai maksimal. Aktivitas xilanase amobil paling tinggi dicapai pada pH 6, dimana keberadaan dari gugus rantai asam amino tersedia dalam jumlah yang banyak untuk membantu proses pemutusan ikatan glikosidik pada rantai xilan. Namun pada pH 7, aktivitas xilanase amobil mengalami penurunan karena terjadi perubahan intramolekuler enzim.

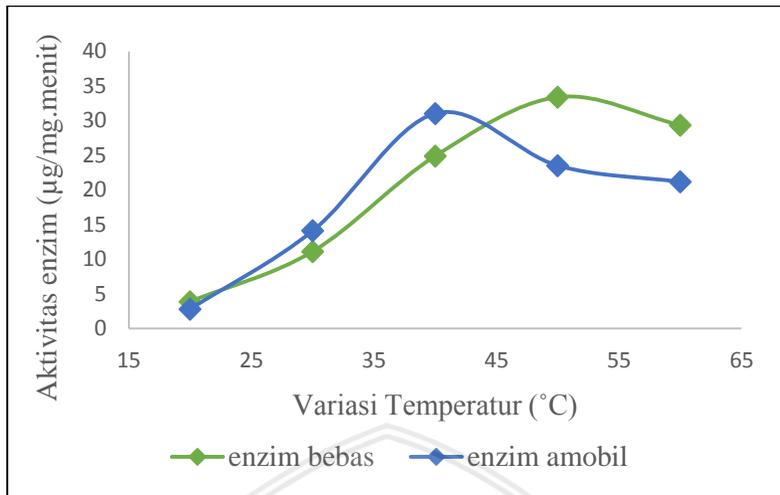
Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya pergeran pH optimum antara xilanase bebas dan xilanase amobil. Artinya pada xilanase yang diamobilkan pada zeolit Ca-alginat, komposisi

antara ion  $\text{OH}^-$  dan  $\text{H}^+$  jumlahnya sama dengan xilanase bebas. Namun aktivitas xilanase amobil lebih rendah dari xilanase bebas karena difusi substrat dengan enzim terbatas. Jika dibandingkan dengan peneliti Setiawan [27] yang menggunakan matriks zeolit, diperoleh kondisi pH optimum yang sama yaitu pada pH 6. Adanya penjabakan menggunakan alginat menunjukkan bahwa xilanase amobil tidak perlu membutuhkan kondisi pH optimum yang berbeda jauh dengan xilanase bebas, justru alginat ikut membantu substrat untuk berikatan dengan enzim dalam menghasilkan produk.

#### 4.4.2 Penentuan Temperatur Optimum

Aktivitas dan stabilitas enzim selain dipengaruhi oleh pH juga dipengaruhi oleh temperatur. Enzim akan mengalami denaturasi dan kehilangan aktivitasnya apabila temperatur yang diberikan terlalu tinggi disebabkan rusaknya sisi aktif enzim [23]. Kondisi temperatur optimum enzim adalah nilai temperatur optimum enzim untuk beraktivitas maksimum. Perubahan temperatur pada enzim mempengaruhi energi kinetik yang dibutuhkan untuk bereaksi mencapai aktivitas maksimum enzim.

Penelitian kali ini dilakukan pengamatan pengaruh variasi temperatur terhadap perubahan aktivitas xilanase bebas dan amobil dengan variasi temperatur (20, 30, 40, 50, 60) $^{\circ}\text{C}$  dan diperoleh hasil seperti pada gambar 4.4. Pada gambar 4.4 menunjukkan perbedaan temperatur optimum dan aktivitas maksimum enzim pada xilanase bebas dan amobil. Kondisi temperatur optimum dari xilanase amobil dicapai pada 40 $^{\circ}\text{C}$  dengan aktivitas sebesar 31,0559  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$  sedangkan pada xilanase bebas dicapai kondisi temperatur optimum pada 50 $^{\circ}\text{C}$  dengan aktivitas sebesar 33,4097  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$ . Berdasarkan uji analisis statistika *one-way* ANOVA diperoleh hasil F hitung (24,038) > F tabel (5,19), sehingga bisa disimpulkan perlakuan variasi temperatur mempengaruhi aktivitas dari enzim xilanase.



**Gambar 4.5 :** Kurva Pengaruh Variasi Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Amobil

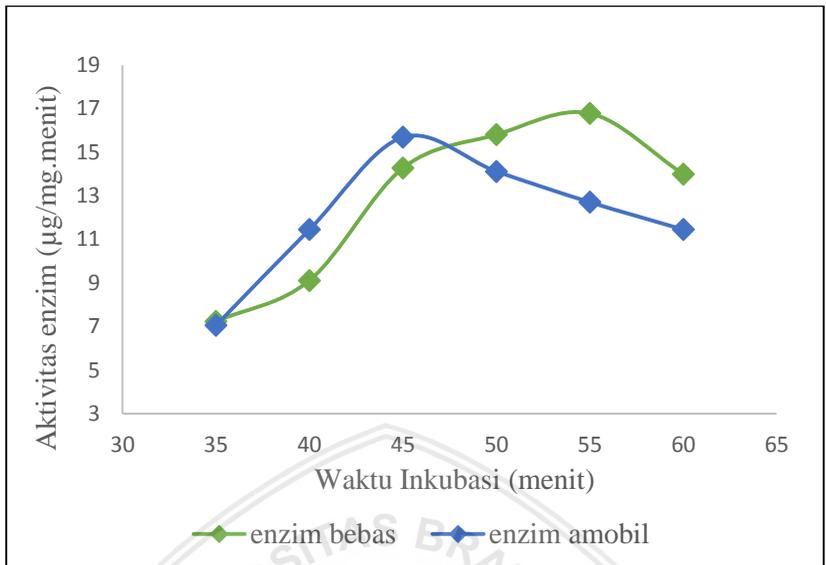
Aktivitas dari xilanase amobil cenderung naik pada temperatur 20 dan 30°C meskipun nilai aktivitasnya masih rendah. Hal ini disebabkan energi yang dibutuhkan untuk menghasilkan produk masih belum mencukupi. Temperatur optimum xilanase amobil dicapai pada temperatur 40°C. Pada temperatur ini, konformasi enzim sudah terbentuk sempurna untuk berikatan dengan substrat, selain itu energi yang dibutuhkan untuk menghasil produk sudah mencukupi. Aktivitas xilanase amobil mulai menurun pada temperatur 50-60°C. Hal ini disebabkan, terjadi perubahan konformasi enzim oleh temperatur yang tinggi sehingga kemampuannya untuk berikatan dengan substrat menurun.

Hasil penelitian menunjukkan adanya pergeseran temperatur optimum antara xilanase bebas dan amobil. Temperatur xilanase amobil untuk menghasilkan aktivitas yang maksimum lebih rendah dari pada xilanase bebas. Hal ini disebabkan setelah dilakukannya amobilisasi, enzim lebih mudah untuk berinteraksi dengan substrat. Matriks membantu enzim berikatan dengan substrat untuk menghasilkan produk yang maksimum tanpa membutuhkan energi yang lebih. Selain itu,

metode amobilisasi yang dipilih, memudahkan substrat untuk berikatan dengan enzim. Apabila dibandingkan dengan kondisi temperatur optimum peneliti Setiawan [27] yang memperoleh kondisi temperatur optimum pada 50°C dengan menggunakan matriks zeolit tanpa dilapisi dengan Ca-alginat, penggunaan alginat menurunkan kondisi temperatur optimum xilanase amobil. Pelapisan dengan alginat membuat ruang diberikan antara enzim dan substrat untuk bertumbukan semakin sempit sehingga mudah untuk berikatan.

#### 4.4.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Waktu inkubasi merupakan waktu yang dibutuhkan enzim untuk berikatan dengan substrat [23]. Kondisi waktu inkubasi optimum enzim sendiri merupakan nilai waktu inkubasi optimum dari enzim untuk beraktivitas maksimum. Penelitian kali dilakukan pengamatan pengaruh variasi waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim xilanase amobil. Variasi waktu inkubasi yang diberikan selama (35, 40, 45, 50, 55) menit dan diperoleh hasil seperti pada gambar 4.5. Diperoleh waktu inkubasi optimum untuk xilanase amobil pada 45 menit dengan aktivitas sebesar 15,6848  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$ , sedangkan waktu inkubasi optimum untuk xilanase bebas pada 55 menit dengan aktivitas sebesar 16,7744  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$ . Berdasarkan uji analisis statistika *one-way ANOVA* diperoleh hasil dimana  $F$  hitung (7,246) >  $F$  tabel (5,19) sehingga variasi waktu inkubasi yang dilakukan mempengaruhi aktivitas dari enzim xilanase.



**Gambar 4.6 :** Kurva Pengaruh Variasi Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase Amobil

Aktivitas xilanase amobil pada waktu inkubasi 35 dan 40 menit mengalami kenaikan meskipun nilainya masih rendah. Hal ini disebabkan konformasi enzim untuk berikatan dengan substrat belum terbentuk sempurna dan energi untuk menghasilkan produk yang optimum belum mencukupi. Namun pada waktu inkubasi ke 45 menit, dicapai kondisi waktu inkubasi optimum dengan aktivitas yang maksimum. Sisi aktif enzim keseluruhan telah berikatan dengan substrat, sehingga produk yang dihasilkan mencapai maksimum. Kemudian pada menit selanjutnya terjadi penurunan aktivitas, hal ini disebabkan konformasi enzim mulai mengalami kerusakan.

Hasil penelitian menunjukkan adanya pergeseran kondisi optimum xilanase bebas dan amobil. Hal ini dikarenakan, setelah dilakukan amobilisasi tumbukan antara enzim dan substrat lebih mudah. Matriks membantu enzim untuk berikatan dengan substrat tanpa membutuhkan energi yang lebih, waktu kontak yang lama dan ruang tumbukan yang sesuai sehingga lebih efisien dalam menghasilkan produk. Apabila dibandingkan dengan peneliti

Setiawan [27], diperoleh kondisi waktu inkubasi optimum yang sama. Sehingga bisa disimpulkan penggunaan matriks zeolit meningkatkan kecepatan enzim berinteraksi dengan substrat. Meskipun peneliti Setiawan [27] tidak menggunakan alginat sebagai penjebak, namun adanya penjebakan dengan alginat membuat ruang antara enzim dan substrat untuk bertumbukan lebih efisien sehingga lebih cepat untuk berikatan dan tidak terlalu membutuhkan energi yang besar.





## BAB V

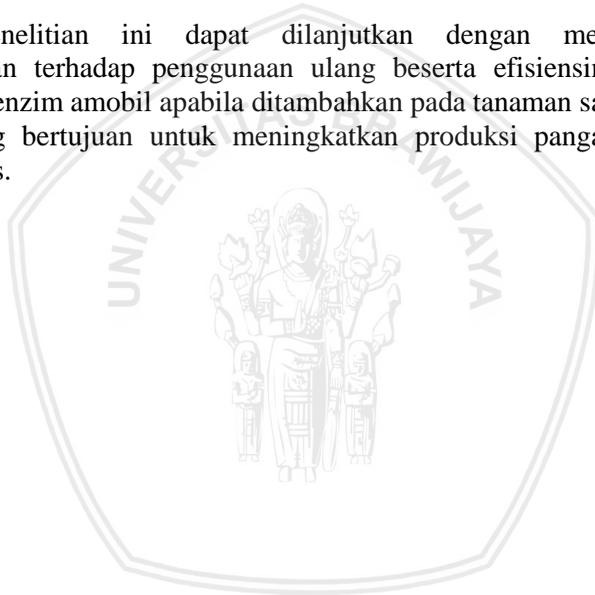
### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum enzim xilanase yang diamobilkan pada matriks zeolit Ca-alginat dicapai pada pH 6 dengan aktivitas sebesar  $13,8596 \mu\text{g.mg}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ , temperatur  $40^{\circ}\text{C}$  dengan aktivitas sebesar  $31,0559 \mu\text{g.mg}^{-1}.\text{menit}^{-1}$  dan waktu inkubasi 45 menit dengan aktivitas sebesar  $15,6848 \mu\text{g.mg}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ .

#### 5.2 Saran

Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan melakukan pengamatan terhadap penggunaan ulang beserta efisiensinya dan pengaruh enzim amobil apabila ditambahkan pada tanaman sayur dan buah yang bertujuan untuk meningkatkan produksi pangan yang berkualitas.





## DAFTAR PUSTAKA

- [1] 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.
- [2] Sawhney, S., K., dan Singh R. (2008). *Introduction Practical Biochemistry: 2<sup>nd</sup> Edition*. New Delhi: Narosa Publishing House Pvt Ltd.
- [3] Poedjiadi, A., dan Titin, S. (2006). *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia-Press.
- [4] Muawanah, A. (2006). *Produksi Enzim Xilanase Termostabil dari Thermomyces lanuginosus IFO 150 pada Bagasse Tebu*. (Tesis). Institut Pertanian Bogor. Bogor. Indonesia.
- [5] 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.
- [6] Trismilah, dan Waltam D.R. (2009). *Produksi Xilanase Menggunakan Media Limbah Pertanian dan Perkebunan*. *Jurnal Teknik Lingkungan*. 10(2). 137-144.
- [7] Soewoto, H. (2001). *Biokimia Eksperimen Laboratorium*. Jakarta: Widya Medika.
- [8] Tribak, M., Ocampo, J.A. and Garcia-Romera, I. (2002). *Production of Xyloglucanolytic Enzymes by Trichoderma viride, Paecilomyces farinosus, Wardomyces inflatus, and Pleurotus ostreatus*. *Mycologia*. 94. 404.

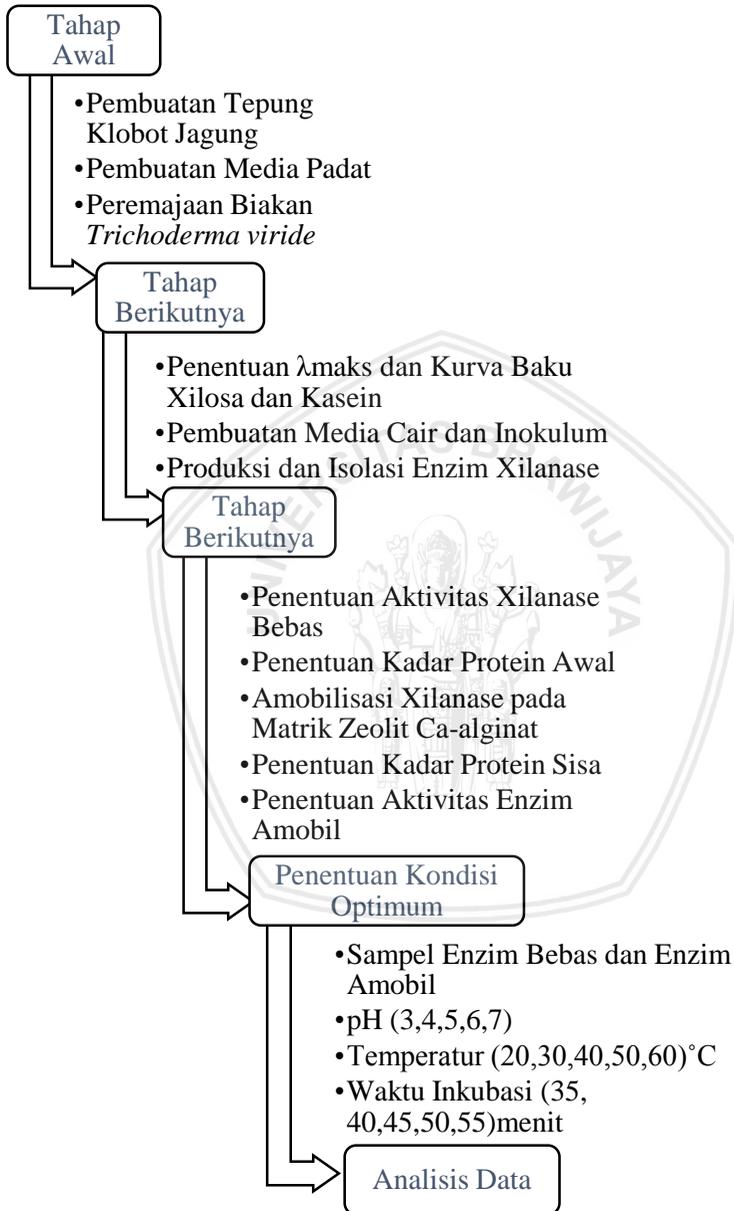
- [9] Frazier, W.C., dan D.C. Westhoff. (1977). *Food Microbiology 4th ed.* New York: McGraw-Hill Book. Publishing.
- [10] Beg QK, Kapoor M., Mahajan L., Hoondal GS. (2001). *Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microbiol Biotechnol.* 56:26-38.
- [11] Meryandini, A., Widhyastuti, N. and Lestari, Y. (2008). *Pemurnian dan Karakterisasi Xilanase Streptomyces sp. Skk1-8. Jurnal Makara Sains.* 12. 55–60.
- [12] Poliana J., and MacCabe A.P. (2007). *Industrial Enzymes; Structure, Function, and Applications.* Dordrecht. Springer.
- [13] Richana, N., Irawadi, T.T., Nur, A. dan Syamsu, K. (2008). *Isolasi Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase Serta Karakterisasi Enzimnya. Jurnal AgroBiogen.* 4. 24–34.
- [14] 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.
- [15] Judoami, Djodjo, R. M., Darwis, A., dan Said, E. G. (1992). *Teknologi Fermentasi.* Jakarta: Rajawali Press.
- [16] Lehninger, A. L. (1999). *Principles of Biochemistry.* New York: Warth Publisher.
- [17] S. C. Vermelho. And Alane B. (2013). *Methods to Determine Enzymatic Activity.* Brazil: Bentham Science.

- [18] Minovska, V., Winkelhausen, E. and Kuzmanova, S. (2005). *Lipase Immobilized by Different Techniques on Various Support Materials Applied in Oil Hydrolysis. Journal of the Serbian Chemical Society.* 70. 609–24.
- [19] Mohammad. Nur Royhaila, Nur Haziqah Che Marzuki, Nur Aziah Buang, Fahrul Huyop and Roswanira Abdul Wahab. (2014). *An Overview of Technologies For Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques. Journal Biotechnology and Biotechnological Equipment.* 29(2). 205-220.
- [20] Meryandini, A., Sunarti, T., Mutiara, F., Gusmawanti, N., dan Lestari, Y. (2009). *Penggunaan Xilanase Streptomyces sp. 451-3 Amobil Untuk Hidrolisis Xilan dari Tongkol Jagung.* Pusat Penelitian Sumber Daya Hayati Dan Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. 10. 9–16.
- [21] Haryati, T., Marbun, P.A. dan Purwadaria, T. (2014). *Preservasi Xilanase Bacillus pumilus Pu4-2 dengan Teknik Imobilisasi pada Pollard dan Penambahan Kation. JITV.* 19.
- [22] Brena, B.M. and Batista-Viera, F. (2006). *Immobilization of enzymes.* Immobilization of Enzymes and Cells. 15–30.
- [23] Sadikin, M. (2002). *Biokimia Enzim.* Jakarta: Widya Medika.
- [24] Ibrahim, H.S., Jamil, T.S. and Hegazy, E.Z. (2010). *Application of Zeolite Prepared from Egyptian Kaolin for the Removal of Heavy Metals: II. Isotherm Models. Journal of Hazardous Materials.* 182. 842–7.
- [25] 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.

- [26] Lestari, Fatma. (2007). *Bahaya Kimia: Sampling & Pengukuran Kontaminan Kimia di Udara*. Jakarta: Buku Kedokteran. EGC.
- [27] Setiawan, Feri. (2016). *Karakterisasi Enzim Xilanase Hasil Isolasi dari Trichoderma viride yang Diamobilkan pada Matriks Zeolit Teraktivasi Asam*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- [28] Tanduwinata, Anggun. (2016). *Karakterisasi Xilanase Hasil Isolasi dari Trichoderma viride yang Diamobilkan pada Matriks Ca-alginat Kitosan*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- [29] Day, R.A., dan A.L Underwood. (1999). *Analisis Kimia Kuantitatif – Edisi Keenam*. Jakarta: Erlangga.
- [30] Worsfold. (1995). *Classification and Chemical Characteristic of Immobilized Enzymes. Pures and Application Chemistry*. 67(4). 597-600.
- [31] Chibatta I. (1978). *Immobilized Enzymes*. New York: John Wiley and Sons.
- [32] Rosewood Drive. (1997). *Advances in Applied Microbiology: Volume 44*. New York: Academic Press.

## LAMPIRAN

### Lampiran A. Skema Kerja Penelitian



## Lampiran B. Preparasi Larutan

### B.1 Akuades Steril

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

### B.2 Larutan Asam Asetat 0,2 M

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

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

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

### B.4 Buffer Asetat pH 5

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

### B.5 Larutan Stok Glukosa 1500 µg/mL

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

### B.6 Larutan Baku Gula Pereduksi

Larutan stok glukosa 1500 µg/mL dipipet (2; 2,7; 3; 3,3; 3,7; 4; 4,3; dan 5) mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan gula pereduksi dengan konsentrasi 300, 400, 450, 500, 550, 600, 650, dan 750 µg/mL.

## **B.7 Reagen DNS**

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

## **B.8 Substrat Xilan 1%**

Xilan sebanyak 1 g xilan dimasukkan ke dalam beaker glass 100 mL dan dilarutkan dengan buffer asetat pH5 secukupnya. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan buffer asetat pH 5 hingga tanda batas.

## **B.9 Larutan NaOH 10%**

NaOH ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam beaker glass 100 mL. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambah akuades hingga tanda batas.

## **B.10 Reagen Biuret**

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,15 g; NaKC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>H<sub>4</sub> 0,6 g dilarutkan dengan akuades sebanyak 30 mL dalam beaker glass 100 mL. Larutan NaOH 10% ditambahkan sebanyak 30 mL sambil diaduk dengan magnetik stirer. Larutan campuran dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas.

## **B.11 Larutan HCl 0,4 M**

Dipipet 3,84 mL larutan HCl 37%, dimasukkan ke dalam beaker glass 100 mL yang telah berisi akuades, dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambah akuades hingga tanda batas.

## **Lampiran C. Perhitungan Preparasi Larutan**

### **C.1 Larutan Asam Asetat 0,2 M**

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

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi asam asetat glasial} &= \frac{\text{Berat Jenis}}{\text{Berat Molekul}} \\ &= \frac{1,05 \times 1000 \text{ g/L}}{60 \text{ g/mol}} \\ &= 17,5 \text{ M} \end{aligned}$$

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

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

### C.2 Larutan Natrium Asetat 0,2 M

Larutan natrium asetat 0,2 M dibuat sebanyak 100 mL (BM: 82,02 g/mol) dengan cara:

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

$$\begin{aligned} \text{massa CH}_3\text{COONa} &= \text{mol CH}_3\text{COONa} \times \text{BM CH}_3\text{COONa} \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 82,02 \text{ g/mol} \\ &= 1,6 \text{ g} \end{aligned}$$

### C.3 Pembuatan Buffer Asetat (0,2 M) pH 5

Ka asam asetat =  $1,8 \times 10^{-5}$

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{pKa} - \log \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COONa}]} \\ 5 &= 4,74 - \log \frac{25 \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}}{(25 + v) \text{ mL}} \\ &= 4,74 - \log \frac{v \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}}{(25 + v) \text{ mL}} \end{aligned}$$

$$5 - 4,74 = - \log \frac{25}{v}$$

$$V = 45,495 \text{ mL}$$

Jadi perbandingan volume CH<sub>3</sub>COOH : CH<sub>3</sub>COONa adalah 25 mL : 45,495 mL.

#### C.4 Larutan NaOH 0,1 M

Larutan NaOH 0,1 M (BM: 40 g/mol) dibuat sebanyak 100 mL

$$\text{mol NaOH} = [\text{NaOH}] \times V \text{ larutan}$$

$$= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L}$$

$$= 0,01 \text{ mol}$$

$$\text{massa NaOH} = \text{mol NaOH} \times \text{BM NaOH}$$

$$= 0,01 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol}$$

$$= 0,4 \text{ g}$$

Jadi untuk membuat larutan NaOH 0,1 M sebanyak 100 mL dibutuhkan 0,4 gram padatan NaOH.

#### C.5 Larutan HCl 0,4 M

Larutan HCl 0,4 M dibuat dari larutan HCl 37% (37 g/100 mL)

$$M = \frac{\text{massa}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{100}$$

$$= \frac{37}{35,5} \times 10 = 10,423 \text{ M}$$

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

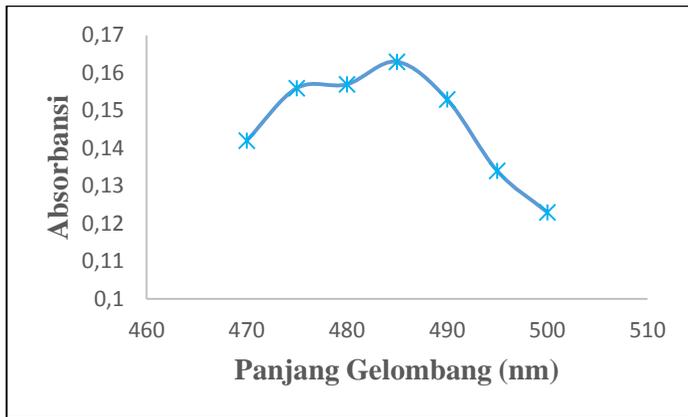
$$10,423 \text{ M} \times V_1 = 0,4 \text{ M} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 3,84 \text{ mL}$$

#### Lampiran D. Grafik Larutan Standar Xilosa

**Tabel D.1:** Data Absorbansi Larutan Xilosa pada  $\lambda$  470-500 nm

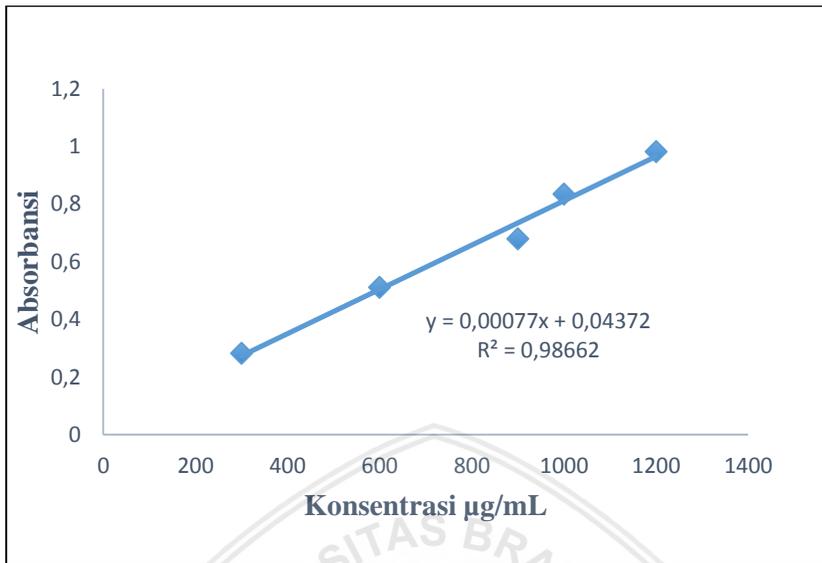
Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi (A)			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>rata-rata</sub>
470	0.141	0.143	0.143	0.142
475	0.156	0.155	0.156	0.156
480	0.156	0.159	0.158	0.157
<b>485</b>	<b>0.163</b>	<b>0.164</b>	<b>0.164</b>	<b>0.163</b>
490	0.154	0.155	0.157	0.153
495	0.135	0.134	0.133	0.134
500	0.123	0.123	0.124	0.123



**Gambar D.1:** Kurva Baku Larutan Standart Xilosa

**Tabel D.2 :** Data Absorbansi Larutan Standart Xilosa pada  $\lambda$  maks 485nm

Konsentrasi Xilosa ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Absorbansi			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	Arata-rata
0	0	0	0	0
300	0.257	0.258	0.258	0.258
600	0.512	0.512	0.511	0.512
900	0.679	0.680	0.680	0.680
1000	0.835	0.834	0.835	0.835
1200	0.983	0.982	0.983	0.983

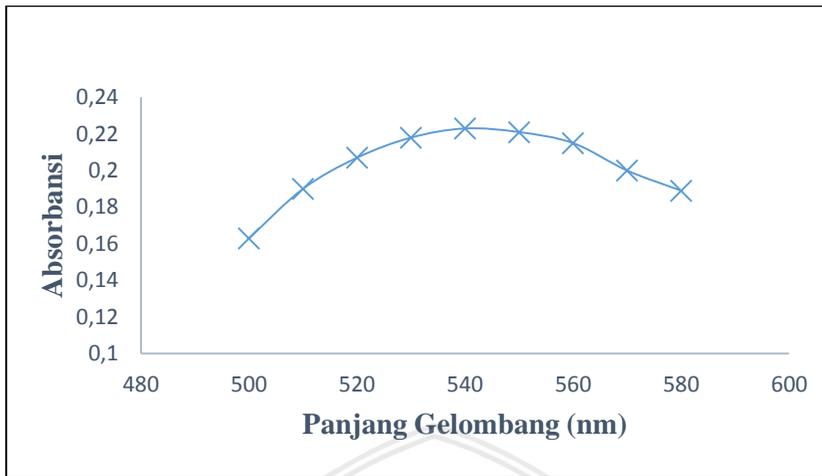


**Gambar D.2:** Kurva Baku Larutan Standart Xilosa pada  $\lambda$  maks 485nm

**Lampiran E. Grafik Larutan Standar Kasein**

**Tabel E.1 :** Data Absorbansi Larutan Kasein (5000  $\mu\text{g/mL}$ ) pada  $\lambda$  500-580 nm

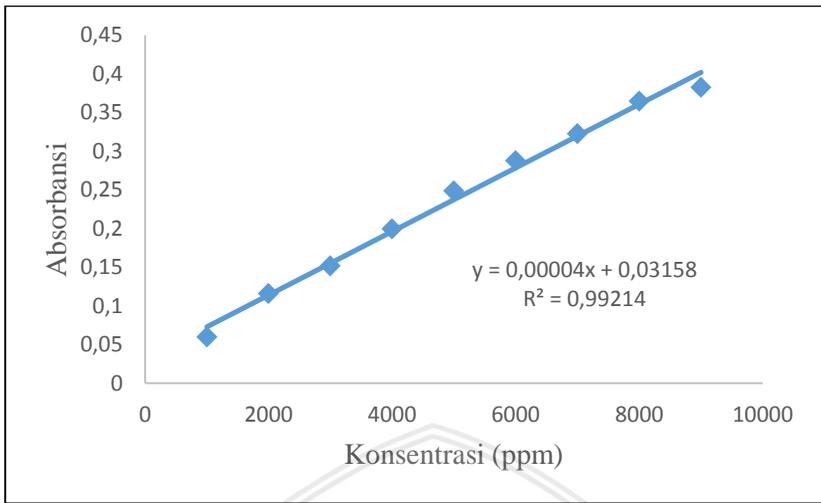
Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi (A)			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>rata-rata</sub>
500	0.167	0.161	0.165	0.163
510	0.190	0.192	0.189	0.190
520	0.209	0.202	0.207	0.207
530	0.218	0.219	0.219	0.218
<b>540</b>	<b>0.223</b>	<b>0.223</b>	<b>0.223</b>	<b>0.223</b>
550	0.223	0.221	0.221	0.221
560	0.215	0.215	0.215	0.215
570	0.200	0.201	0.201	0.200
580	0.189	0.189	0.190	0.189



**Gambar E.1:** Kurva Baku Larutan Standart Kasein

**Tabel E.2 :** Data Absorbansi Larutan Standar Kasein pada  $\lambda_{maks}$  540 nm

Konsentrasi Kasein (ppm)	Absorbansi			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>rata-rata</sub>
0	0	0	0	0
1000	0.061	0.060	0.061	0.060
2000	0.116	0.116	0.116	0.116
3000	0.152	0.152	0.152	0.152
4000	0.201	0.200	0.201	0.200
5000	0.249	0.250	0.249	0.249
6000	0.289	0.289	0.288	0.288
7000	0.323	0.324	0.323	0.323
8000	0.363	0.365	0.365	0.365
9000	0.383	0.383	0.389	0.383



**Gambar E.2:** Data Absorbansi Larutan Standar Kasein pada  $\lambda_{maks}$  540 nm

### Lampiran F. Aktivitas Xilanase Bebas

Larutan uji untuk menentukan aktivitas xilanase bebas diukur absorbansinya pada  $\lambda_{maks}$  485nm. Kemudian nilai absorbansinya tersebut diplotkan pada persamaan kurva baku xilosa  $y = 0.00077x$ . Sehingga dapat diketahui konsentrasi xilosa. Misal untuk nilai absorbansi 0.112, maka konsentrasi xilosa dapat dihitung sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
 y &= 0.00077x \\
 0.112 &= 0.00077x \\
 x &= 145.4545 \mu\text{g/mL}
 \end{aligned}$$

kemudian aktivitas xilanase bebas dapat dihitung melalui persamaan berikut ini :

$$\begin{aligned}
 \text{AE} &= \frac{x \times v \times fp}{p \times q} \\
 &= \frac{145.4545 \mu\text{g/mL} \times 6 \text{ mL} \times 25/6}{1 \text{ mL} \times 55 \text{ menit}} \\
 &= 65.0578 \mu\text{g/mL.menit}
 \end{aligned}$$

**Tabel F.1 : Aktivitas Xilanase Enzim Bebas**

Pengukuran	Absorbansi (A)	Konsentrasi Xilosa ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Aktivitas Enzim ( $\mu\text{g}/\text{mL.menit}$ )
1	0.089	63.6363	28.4628
2	0.149	193.5064	86.5501
3	0.112	145.4545	65.0578
<b>Rata-rata</b>		134.1991	60.0236

**Lampiran G. Konsentrasi Protein Xilanase Bebas**

Larutan uji untuk menentukan konsentrasi protein xilanase bebas diukur absorbansinya pada  $\lambda_{\text{maks}}$  540 nm. Kemudian nilai absorbansi tersebut diplotkan pada persamaan kurva baku kasein,  $y = 0.00004x$ . sehingga dapat diketahui konsentrasi protein total. Misal untuk nilai absorbansi sebesar 0.238, maka konsentrasi protein total dapat dihitung sebagai berikut :

$$y = 0.00004x$$

$$0.238 = 0.00004x$$

$$x = 5925 \mu\text{g}/\text{mL}$$

Konsentrasi Protein Enzim = Konsentrasi (Protein Total-Protein yang ditambah)

$$= (5925-5000) \mu\text{g}/\text{mL}$$

$$= 925 \mu\text{g}/\text{mL}$$

**Tabel G.1 : Konsentrasi Protein Xilanase Bebas**

Pengukuran	Absorbansi (A)	Konsentrasi Protein Enzim $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	0.237	925
2	0.280	2025
3	0.236	875
<b>Rata-rata</b>		1275

Kadar Protein Awal = 1275  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Massa Protein Awal= 1275  $\mu\text{g}/\text{mL}$  x 12 mL = 15300  $\mu\text{g}$

Kadar Protein Awal (dalam 2 mL) =  $15300 \mu\text{g} : 2 \text{ mL} = 7650 \mu\text{g/mL}$   
 Massa Protein Awal (dalam 1 mL) =  $7650 \mu\text{g/mL} \times 1 \text{ mL} = 7650 \mu\text{g}$   
 p.enzim bebas =  $7650 \mu\text{g} = 7.650 \text{ mg}$

### Lampiran H. Jumlah Enzim Xilanase Terjebak Zeolit Ca-Alginat

Filtrat ke 1 dan ke 2 dari hasil amobilisasi digunakan untuk menentukan jumlag xilanase yang tidak terjebak dalam matrik Zeolit Ca-alginat. Masing-masing filtrat diukur pada  $\lambda_{\text{maks}}$  540 nm. Kemudian nilai absorbansinya tersebut diplotkan pada persamaan kurva baku kasein  $y = 0.00004x$ . Sehingga dapat diketahui konsentrasi protein total. Misal untuk absorbansi sebesar 0.207 maka konsentrasi protein total dapat dihitung sebagai berikut:

$$\begin{aligned} y &= 0.00004x \\ 0.228 &= 0.00004x \\ x &= 5700 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi Enzim Tidak Terjebak} &= \text{Konsentrasi (Protein Total-} \\ &\quad \text{Protein yang ditambah)} \\ &= (5700-5000) \mu\text{g/mL} \\ &= 700 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa Enzim Tidak Terjebak} &= \text{Konsentrasi Enzim Tidak Terjebak} \times \\ &\quad \text{V. filtrat} \\ &= 700 \mu\text{g/mL} \times 3.5 \text{ mL} = 2450 \mu\text{g} \end{aligned}$$

**Tabel H.1 Massa Enzim Tidak Terjebak**

Filtrat	Absorbansi	Volume Filtrat (mL)	Massa Enzim Tidak Terjebak ( $\mu\text{g}$ )	Massa Manik-manik (gram)
1	0.228	3.5	2450	3.3566
2	0.208	3.0	600	3.1888
<b>Total</b>		6.5	3050	6.5454

Sehingga massa enzim yang terjebak di dalam matrik Zeolit Ca-alginat dapat ditentukan sebagai berikut

$$\begin{aligned} \text{Massa Enzim Terjebak} &= \text{Massa (Enzim Bebas-Enzim Tidak Terjebak)} \\ &= (7650 - (2450+600)) \mu\text{g} \\ &= 4600 \mu\text{g} \\ \text{p. amobil} &= 4.600\text{mg} \end{aligned}$$

## Lampiran I. pH Optimum Xilanase Amobil

Larutan uji untuk menentukan aktivitas xilanase amobil diukur absorbansinya pada  $\lambda_{\text{maks}}$  485nm. Kemudian nilai absorbansi tersebut diplotkan pada persamaan kurva baku xilosa  $y = 0.00077x$ . perhitungan sama seperti lampiran sebelumnya, sehingga diperoleh data sebagai berikut :

**Tabel I. 1 :** Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variasi pH

Variasi pH	Absorbansi			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>rata-rata</sub>
3	0.053	0.045	0.045	0.045
4	0.080	0.069	0.069	0.069
5	0.089	0.096	0.096	0.096
<b>6</b>	<b>0.264</b>	<b>0.188</b>	<b>0.108</b>	<b>0.108</b>
7	0.146	0.055	0.042	0.042

**Tabel I.2 :** Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi pH

Variasi pH	Konsentrasi Rata-rata Gula Pereduksi $\mu\text{g/mL}$	Aktivitas Rata-rata Xilanase Amobil ( $\mu\text{g/mg.menit}$ )
3	58.4416	5.7748
4	89.6104	8.8547
5	124.6753	12.3196
<b>6</b>	<b>140.2597</b>	<b>13.8596</b>
7	54.5454	5.3898

## Lampiran J. Temperatur Optimum Xilanase Amobil

**Tabel J.1:**Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variasi Temperatur

Variasi Temperatur	Absorbansi			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>rata-rata</sub>
20	0.012	0.012	0.012	0.012
30	0.060	0.060	0.060	0.060
<b>40</b>	<b>0.132</b>	<b>0.132</b>	<b>0.132</b>	<b>0.132</b>
50	0.100	0.100	0.100	0.100
60	0.090	0.090	0.090	0.090

**Tabel J.2 :** Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi Temperatur

Variasi Temperatur	Konsentrasi Rata-rata Gula Pereduksi $\mu\text{g/mL}$	Aktivitas Rata-rata Xilanase Amobil ( $\mu\text{g/mg.menit}$ )
20	15.5844	2.8232
30	77.9221	14.1163
<b>40</b>	<b>171.4286</b>	<b>31.0559</b>
50	129.8701	23.5272
60	116.8831	21.1744

**Lampiran K.** Waktu Inkubasi Optimum Xilanase Amobil

**Tabel K.1:**Data Absorbansi Xilanase Amobil pada Variasi Waktu Inkubasi

Variasi Waktu Inkubasi	Absorbansi			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>rata-rata</sub>
35	0.046	0.045	0.045	0.045
40	0.073	0.072	0.073	0.073
<b>45</b>	<b>0.100</b>	<b>0.100</b>	<b>0.100</b>	<b>0.100</b>
50	0.090	0.090	0.090	0.090
55	0.080	0.081	0.081	0.081

**Tabel K.2:**Aktivitas Xilanase Amobil pada Variasi Waktu Inkubasi

Variasi Temperatur	Konsentrasi Rata-rata Gula Pereduksi $\mu\text{g/mL}$	Aktivitas Rata-rata Xilanase Amobil ( $\mu\text{g/mg.menit}$ )
35	58.4415	7.0582
40	94.8052	11.4499
<b>45</b>	<b>129.8701</b>	<b>15.6848</b>
50	116.8832	14.1163
55	105.1948	12.7046

## Lampiran L. Analisa Statistika

### L.1 Tabel ANOVA Penentuan pH Optimum Xilanase Amobil

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel (5%)
Perlakuan	4	0.0377	0.09425	66.373	5.19
Galat	5	0.0071	0.00142		
Total	9	0.0448			

**Keputusan:** F hitung > F tabel dimana  $66.373 > 5.19$ , maka Tolak  $H_0$ . Sehingga dapat dikatakan bahwa variasi pH yang diterapkan berpengaruh terhadap aktivitas xilanase amobil.

### L.2 Tabel ANOVA Penentuan Temperatur Optimum Xilanase Amobil

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel (5%)
Perlakuan	4	0.01481	0.037025	1424.038	5.19
Galat	5	0.00013	0.000026		
Total	9	0.01494			

**Keputusan:** F hitung > F tabel dimana  $1424.038 > 5.19$ , maka Tolak  $H_0$ . Sehingga dapat dikatakan bahwa variasi Temperatur yang diterapkan berpengaruh terhadap aktivitas xilanase amobil.

### L.3 Tabel ANOVA Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Xilanase Amobil

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel (5%)
Perlakuan	4	0.006226	0.0015565	7.246	5.19
Galat	5	0.001074	0.0002148		
Total	9	0.0073			

**Keputusan:** F hitung > F tabel dimana  $7.246 > 5.19$ , maka tolak  $H_0$ . Sehingga dapat dikatakan bahwa variasi Waktu Inkubasi yang diterapkan berpengaruh terhadap aktivitas xilanase amobil.