

**KONVERSI SELULOSA DALAM KULIT PISANG
MENJADI GLUKOSA MENGGUNAKAN
SELULASE TERAMOBIL DALAM Ca-ALGINAT-KITOSAN**

SKRIPSI

oleh:

Fransisca Natalia Anggraeni

0310920027



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008**

**KONVERSI SELULOSA DALAM KULIT PISANG
MENJADI GLUKOSA MENGGUNAKAN
SELULASE TERAMOBIL DALAM Ca-ALGINAT-KITOSAN**

SKRIPSI

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

oleh:

Fransisca Natalia Anggraeni

0310920027



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008**

LEMBAR PENGESAHAN

**KONVERSI SELULOSA DALAM KULIT PISANG
MENJADI GLUKOSA MENGGUNAKAN
SELULASE TERAMOBIL DALAM Ca-ALGINAT-KITOSAN**

**oleh:
FRANSISCA NATALIA ANGGRAENI
0310920027**

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

**Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

Pembimbing I

Pembimbing II

**Arie Srihardyastuti, S.Si,M.Kes
NIP. 132 300 238**

**Drs. Sutrisno, MSi.
NIP. 131 879 407**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**M. Farid Rahman, S.Si,MSi
NIP. 132 158 726**

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fransisca Natalia Anggraeni

NIM : 0310920027

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

“Konversi Selulosa Dalam Kulit Pisang Menjadi Glukosa Menggunakan Selulase Teramobil Dalam Ca-Alginat-Kitosan”

Dengan ini menyatakan bahwa :

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Februari 2008

Yang menyatakan,

(Fransisca Natalia Anggraeni)

NIM 0310920027

KONVERSI SELULOSA DALAM KULIT PISANG MENJADI GLUKOSA MENGGUNAKAN SELULASE TERAMOBIL DALAM Ca-ALGINAT-KITOSAN

ABSTRAK

Kulit pisang mengandung selulosa dalam jumlah yang cukup besar, yang dapat dimanfaatkan sebagai penghasil glukosa dengan bantuan enzim selulase. Amobilisasi terhadap enzim selulase yang diisolasi dari *Trichoderma viride* dimaksudkan untuk menjaga stabilitas dan efisiensi enzim agar mudah dipisahkan dari produk tanpa mengurangi aktivitas katalitiknya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum (pH, suhu, dan waktu inkubasi) proses konversi selulosa menjadi glukosa menggunakan enzim selulase yang diamobilkan menggunakan Ca-alginat dan kitosan, serta mengetahui efisiensi konversi tersebut. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan jumlah glukosa yang dihasilkan per milligram enzim selulase tiap menit. Konsentrasi glukosa ditentukan secara spektrofotometri menggunakan metode Nelson-Somogyi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum ekstrak kasar selulase amobil dicapai pada pH 5,5, suhu 60°C dan waktu inkubasi 15 menit dengan aktivitas sebesar 0,173 Unit dan dapat mengkonversi selulosa sebesar 1,13 %.

CONVERSION CELLULOSE OF BANANA PEEL BECOME GLUCOSE BY USING IMMOBILIZED CELLULASE IN Ca-ALGINATE-CHITOSAN

ABSTRACT

Banana peel contains cellulose in a large amount enough, that can be used as glucose source with supported by cellulase. The immobilized cellulase that isolated from *Trichoderma viride* is intended to keep the stability and efficiency of enzyme, so can easily separated from the product without decreased its catalytic activity. The aim of this research were to observe the optimum condition (pH, temperature, and incubation time) of the process of cellulose conversion became glucose using immobilized cellulase in Ca-alginate and chitosan. The enzyme activity was calculated based on the number of glucose which was resulted per milligram cellulose per minute. The concentration of glucose was determined spectrofotometrically using Nelson-Somogyi method. The result of this research showed that the optimum condition of this crude immobilized cellulase was reached in pH 5,5, temperature 60°C and incubation time 15 minutes with it's activity as 0,173 Unit and can converted cellulose as 1,13 %.



KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Tuhan atas segala kasih dan karuniaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Konversi Selulosa Dalam Kulit Pisang Menjadi Glukosa Menggunakan Selulase Teramobil Dalam Ca-Alginat-Kitosan”** yang disusun sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya dengan baik.

Penulisan skripsi ini tak lepas dari bantuan berbagai pihak, karena itu penulis juga mengucapkan terima kasih kepada :

1. Arie Srihardyastuti, SSi., Mkes. dan Drs. Sutrisno, MSi., selaku Dosen Pembimbing I dan II, atas bimbingan, pengarahan, kritik dan saran, serta kesabaran yang telah diberikan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
2. Siti Mutrofin, SSi., MSc. selaku Dosen Penasehat Akademik, yang telah memberikan masukan, semangat dan arahan kepada penulis selama masa studi.
3. Dra. Tutik Setianingsih, MSi, Ir. Uswatun Hasanah, MSi, Dr. Ir. H. Chasan Bisri, dan M.Farid Rahman, S.Si, MSi, yang telah memberikan kritik dan saran dalam perbaikan skripsi ini.
4. Seluruh Dosen dan Staf Jurusan Kimia, atas segala ilmu dan bantuan yang telah diberikan
5. Kedua orang tua dan keluarga penulis yang selalu memberikan kasih sayang, doa, semangat, dan dukungan hingga terselesaikannya skripsi ini.
6. Semua teman-teman di Jurusan Kimia, terutama angkatan 2003, dan teman-teman lain yang telah memberikan persahabatan dan persaudaraan, semangat, doa, dan bantuan selama ini.

Dengan keterbatasan pengetahuan, penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Dengan kerendahan hati, penulis berharap semoga skripsi ini dapat mendukung perkembangan ilmu pengetahuan.

Malang, Februari 2008

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH	xiv

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	2
1.3. Batasan Masalah.....	3
1.4. Tujuan Penelitian.....	3
1.5. Manfaat Penelitian.....	3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pisang dan Kulit Pisang	4
2.2. Selulosa.....	4
2.3. Enzim Selulase <i>Trichoderma viride</i>	5
2.4. Amobilisasi Enzim.....	7
2.5. Alginat.....	8
2.6. Kitosan.....	9
2.7. Amobilisasi menggunakan Ca-alginat-Kitosan	9
2.8. Penentuan Kadar Glukosa dengan Metode Nelson-Somogyi.....	10
2.9. Hipotesis.....	12

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.2. Bahan dan Alat Penelitian.....	13
3.2.1. Bahan penelitian	13
3.2.2. Bahan kimia.....	13
3.2.3. Alat penelitian	14
3.3. Metode Penelitian	14
3.4 Cara Kerja.....	15
3.4.1. Penyiapan sampel.....	15
3.4.1.1. Penyiapan substrat kulit pisang.....	15
3.4.1.2. Analisa kadar selulosa dalam kulit pisang ..	15
3.4.2. Isolasi Enzim Selulase	16
3.4.2.1. Penyiapan media pertumbuhan.....	16
a. Media padat.....	16
b. Media cair.....	16
3.4.2.2. Peremajaan biakan murni <i>Trichoderma</i> <i>viride</i>	16
3.4.2.3. Pembuatan kurva pertumbuhan <i>Trichoderma</i> <i>viride</i>	17
3.4.2.4. Pembuatan biakan aktif (Inokulum).....	17
3.4.2.5. Produksi dan isolasi enzim selulase.....	17
3.4.3. Amobilisasi enzim selulase dengan matriks Ca-alginat-kitosan	18
3.4.4. Hidrolisis selulosa	18
3.4.4.1. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan glukosa	18
3.4.4.2. Pembuatan kurva baku larutan glukosa standar.....	19
3.4.4.3. Penentuan kadar glukosa dengan metode Nelson-Somogyi	19
3.4.4.4. Penentuan kondisi optimum enzim selulase.....	20
a. Penentuan pH optimum.....	20
b. Penentuan Suhu optimum.....	20
c. Penentuan Waktu Inkubasi optimum	20
3.4.5. Analisa Hasil Hidrolisis Selulosa.....	21
3.4.5.1. Pembuatan kurva baku Bovin Serum Albumin (BSA).....	21
3.4.5.2. Penentuan kadar protein selulase	21
3.4.5.3. Penentuan kadar protein selulase yang tidak terjebak dalam gel pengamobil.....	22

3.4.5.4. Pengukuran aktivitas enzim selulase amobil	22
3.4.5.5. Penentuan % selulosa yang mengalami biokonversi menjadi glukosa dengan menggunakan selulase amobil.....	22
3.4.6. Analisa data.....	23

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Amobilisasi Enzim Selulase	24
4.2. Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Selulase Amobil.....	24
4.2.1. Penentuan pH optimum.....	24
4.2.2. Penentuan suhu optimum.....	28
4.2.3. Penentuan Waktu inkubasi optimum	29
4.3. Efisiensi konversi glukosa dari selulosa kulit pisang menggunakan enzim selulase amobil	31

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran	33

DAFTAR PUSTAKA	34
-----------------------------	----

LAMPIRAN	39
-----------------------	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur selulosa.....	5
Gambar 2.2	Struktur alginat.....	8
Gambar 2.3	Struktur kitosan.....	9
Gambar 2.4	Interaksi antara Ca-alginat dan kitosan membentuk <i>double layer</i>	10
Gambar 2.5	Struktur molibdenum biru.....	11
Gambar 4.1	Kurva pengaruh pH terhadap aktivitas enzim selulase amobil.....	25
Gambar 4.2	Mekanisme hidrolisis selulosa oleh selulase.....	27
Gambar 4.3	Kurva pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim selulase amobil.....	28
Gambar 4.4	Kurva pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase amobil	30
Gambar 4.5	Struktur tanin dan lignin.....	32
Gambar L.4.1	Kurva pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i> ...	55
Gambar L.5.1	Kurva baku serapan larutan glukosa.....	56
Gambar L.6.1	Kurva baku Bovin Serum Albumin (BSA)	57

DAFTAR TABEL

Tabel L.1.1	Volume larutan yang digunakan untuk membuat larutan buffer asetat.....	44
Tabel L.4.1	Data berat kering sel dalam berbagai waktu.....	55
Tabel L.5.1	Data absorbansi larutan glukosa.....	56
Tabel L.6.1	Data absorbansi larutan BSA.....	57
Tabel L.7.1	Kadar protein ekstrak kasar selulase.....	59
Tabel L.7.2	Jumlah ekstrak kasar selulase yang terlepas setelah amobilisasi.....	61
Tabel L.7.3	Jumlah ekstrak kasar selulase yang terjebak dalam matriks pengamobil.....	62
Tabel L.8.1	Pengaruh pH terhadap serapan glukosa	63
Tabel L.8.2	Pengaruh suhu terhadap serapan glukosa.....	63
Tabel L.8.3	Pengaruh waktu inkubasi terhadap serapan glukosa.....	63
Tabel L.10.1	Pengaruh pH terhadap kadar glukosa...	65
Tabel L.10.2	Pengaruh suhu terhadap kadar glukosa	65
Tabel L.10.3	Pengaruh waktu inkubasi terhadap kadar glukosa.....	65
Tabel L.12.1	Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim selulase amobil.....	67
Tabel L.12.2	Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim selulase amobil.....	67
Tabel L.12.3	Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase amobil.....	67
Tabel L.14.1	Penentuan F_{hitung} pada variasi perlakuan pH.....	69
Tabel L.14.2	Analisis varian pada variasi pH.....	70
Tabel L.14.3	Uji BNT 5 % pada variasi pH.....	71
Tabel L.14.4	Penentuan F_{hitung} pada variasi perlakuan suhu.....	71
Tabel L.14.5	Analisis varian pada variasi suhu.....	73
Tabel L.14.6	Uji BNT 5 % pada variasi suhu.....	73
Tabel L.14.7	Penentuan F_{hitung} pada variasi perlakuan	

LAMPIRAN 1	Preparasi larutan.....	38
LAMPIRAN 2	Diagram alir penelitian.....	45
LAMPIRAN 3	Metodologi penelitian.....	46
LAMPIRAN 4	Kurva pertumbuhan <i>Trichoderma viride</i>	55
LAMPIRAN 5	Kurva baku larutan glukosa.....	56
LAMPIRAN 6	Kurva baku Bovin Serum Albumin (BSA).....	57
LAMPIRAN 7	Penentuan jumlah ekstrak kasar selulase.....	59
LAMPIRAN 8	Data pengukuran serapan glukosa dari berbagai perlakuan.....	63
LAMPIRAN 9	Perhitungan kadar glukosa sampel.....	64
LAMPIRAN 10	Data kadar glukosa hasil konversi oleh enzim selulase amobil dari berbagai perlakuan.....	65
LAMPIRAN 11	Perhitungan aktivitas enzim selulase amobil.....	66
LAMPIRAN 12	Data aktivitas enzim selulase Amobil dari berbagai perlakuan.....	67
LAMPIRAN 13	Perhitungan kadar selulosa dalam kulit pisang.....	68
LAMPIRAN 14	Analisa Statistika.....	69

DAFTAR ISTILAH

<u>Simbol/ singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
β	beta
g	gram
μg	mikrogram
μmol	mikromol
λ	lamda (panjang gelombang)
Bj	Berat jenis
BM	Berat Molekul
BSA	Bovine Serum Albumin
cm	centimeter
CMC	Carboxy Methyl Cellulose
L	Liter
M	Molar
mg	miligram
mL	mili Liter
Mo	Molibdenum
nm	nanometer
N	Normal
pH	power of Hidrogen
ppm	part per million
rpm	radian per minutes
UV-Vis	UltraViolet-Visible
V	volume

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Selulosa merupakan karbohidrat utama yang disintesis oleh tanaman dan menempati hampir 60% komponen penyusun struktur tanaman. Jumlah selulosa di alam sangat berlimpah dalam bentuk limbah pertanian seperti jerami padi, klobot jagung, dan kulit pisang. Nilai ekonomi selulosa pada limbah tersebut sangat rendah karena tidak dapat langsung dimanfaatkan oleh manusia (Salma dan Gunarto, 1999).

Kulit pisang merupakan bagian dari buah pisang yang jumlahnya melimpah, tetapi limbahnya belum dimanfaatkan secara optimal. Di Indonesia, produksi pisang dapat mencapai 45.447,15 hingga 209.603 ton tiap tahunnya (Hajar, 2007). Melimpahnya produk pisang ini menyebabkan limbah kulit pisang juga semakin meningkat. Kulit pisang mengandung karbohidrat seperti selulosa dan pati. Namun, selama ini pemanfaatan kulit pisang masih sangat terbatas, yaitu sebagai cuka, nata dan makanan ternak. Diketahui bahwa dalam kulit pisang mengandung 68,90% air, vitamin B6, dan serotonin (Wayan, 2007), serta 60-65% selulosa, 6-8% hemiselulosa, dan 5-10% lignin (Tarmansyah, 2008). Salah satu pemanfaatan selulosa yang mulai dikembangkan adalah dengan mengubahnya menjadi glukosa menggunakan enzim selulase.

Selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat memutuskan ikatan glukosida β -1,4 dalam selulosa. Enzim ini dapat diproduksi oleh beberapa macam mikroba, di antaranya adalah *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii* dan *Trichoderma viride* (Salma dan Gunarto, 1999). *Trichoderma viride* paling banyak digunakan karena memiliki keaktifan yang tinggi dan mampu mendegradasi selulosa kristalin (Rahman, 1992). Enzim selulase ini terdiri dari tiga komponen, yaitu selobiohidrolase, endoglukanase, dan β -glukosidase yang bekerja secara sinergis memecah selulosa di alam menghasilkan D-glukosa (Goksoyr and Eriksen, 1977). Dalam bidang industri, enzim selulase dapat dimanfaatkan untuk mengolah limbah berserat menjadi gula cair serta dalam pengolahan makanan dari bahan yang mengandung selulosa (Brown dan Fitzpatrick, 1975).

Pada dasarnya, enzim merupakan protein, di mana aktivitasnya dapat berkurang karena faktor kimia, fisika, maupun biologi, sehingga tidak stabil dalam penyimpanannya bila berada dalam bentuk bebasnya. Selain itu, diperlukan biaya isolasi dan pemurnian, serta biaya penggunaannya yang cukup mahal, karena enzim yang telah dipakai dalam bentuk bebasnya tidak dapat dipisahkan untuk kemudian digunakan kembali. Salah satu cara untuk memecahkan masalah ini adalah dengan metode amobilisasi (Fessner, 2000). Proses amobilisasi enzim ini dapat dilakukan dengan menggunakan Ca-alginat-kitosan (Judoamidjojo, dkk, 1992). Konsentrasi kitosan yang digunakan adalah 2 % (w/v), karena pada konsentrasi ini, jumlah enzim dan aktivitas enzim selulase yang terjebak menunjukkan hasil yang optimal, di mana jumlah ekstrak kasar selulase yang terjebak adalah sebesar 0,498 mg/g manik-manik dengan aktivitas sebesar 0,270 Unit (Trisna, 2007).

Keberhasilan proses konversi selulosa menjadi glukosa sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan saat proses tersebut berlangsung, sehingga perlu dilakukan penentuan kondisi optimum proses tersebut. Pada penelitian terdahulu, proses konversi selulosa menjadi glukosa menggunakan selulase bebas pada substrat kulit pisang memiliki efisiensi sebesar 2,17 % pada kondisi kerja optimum pH 4,5, suhu 50°C, dan waktu inkubasi 10 menit (Mahayana, 2007). Karena proses konversi juga dipengaruhi oleh keadaan enzim yang digunakan, maka dalam penelitian ini dipelajari proses konversi selulosa dalam kulit pisang menggunakan enzim selulase hasil isolasi dari *Trichoderma viride* yang terlebih dahulu diamobilkan menggunakan Ca-alginat-kitosan, dengan menentukan kondisi optimum kerja enzim amobil tersebut.

1.2. Perumusan Masalah

Rumusan masalah yang diangkat dalam penelitian ini adalah:

1. bagaimana kondisi optimum (pH, suhu, dan waktu inkubasi) proses konversi selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa dengan menggunakan enzim selulase yang diamobilkan dalam Ca-alginat-kitosan?
2. berapa persen selulosa dalam kulit pisang yang mengalami konversi menjadi menjadi glukosa oleh selulase amobil pada kondisi optimumnya?

1.3. Batasan Masalah

1. Substrat yang digunakan adalah kulit pisang kepok yang sudah matang yang diperoleh dari pasar di daerah Malang
2. Ekstrak kasar selulase yang digunakan diisolasi dari kapang *Trichoderma viride* yang teramobilisasi dalam Ca-alginat-kitosan

1.4. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui kondisi optimum yang meliputi pH, suhu, dan waktu inkubasi pada proses konversi selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa menggunakan enzim selulase yang diamobilkan dalam Ca-alginat-kitosan
2. Mengetahui persentase selulosa dalam kulit pisang yang mengalami konversi menjadi glukosa oleh enzim selulase amobil pada kondisi optimumnya

1.5. Manfaat Penelitian

1. Meningkatkan nilai ekonomis kulit pisang kepok sebagai bahan baku pembuatan glukosa
2. Memberikan informasi tentang kondisi optimum proses konversi selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa dengan menggunakan enzim selulase yang diamobilkan dalam Ca-alginat-kitosan
3. Memberikan informasi tentang persentase selulosa dalam kulit pisang yang mengalami konversi menjadi glukosa oleh enzim selulase amobil pada kondisi optimumnya

BAB II

Tinjauan Pustaka

2.1. Pisang dan Kulit Pisang

Pisang merupakan tanaman buah dari kawasan Asia Tenggara yang memiliki batang semu, bunga berbentuk tabung, tidak bertangkai, dan bakal buahnya berada di bagian bawah. Beberapa jenis pisang antara lain: pisang ambon, pisang raja, pisang kepok, pisang susu, pisang hijau (Sudamadi, 1996).

Klasifikasi dari tanaman pisang (Anonymous, 2007):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Famili	: Musaceae
Genus	: Musa
Species	: Musa spp.

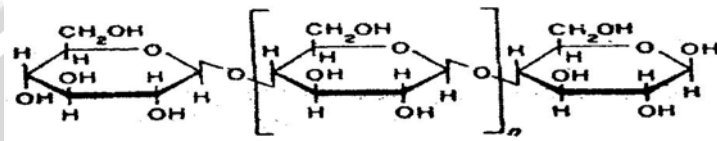
Pisang merupakan buah yang bermanfaat. Hampir seluruh bagiannya dapat dimanfaatkan, baik buah, bunga, serta daunnya (Sudamadi, 1996). Kulit buahnya dapat dimanfaatkan sebagai pupuk dan media tanam, alternatif pakan ternak, bahan pembuat cuka, serta alternatif bahan untuk membuat nata (Sutriyono, 2003). Kulit pisang mengandung 68,90% air, vitamin B6, dan serotonin (Wayan, 2007), serta 60-65% selulosa, 6-8% hemiselulosa, dan 5-10% lignin (Tarmansyah, 2008).

2.2. Selulosa

Selulosa merupakan bagian penyusun utama jaringan tanaman, serta jamur, ganggang, dan lumut (Tarmansyah, 2008). Selulosa bersifat sukar larut, namun dapat dilarutkan pada larutan amoniakal tembaga hidroksida serta asam dan basa kuat seperti NaOH, H₂SO₄, dan HCl (Kalsum, dkk, 2002). Strukturnya dapat menyerupai kristal, dengan persentase sifat kristalinitas bervariasi antara 50-90%, tergantung sumbernya (Roberts, 1996). Struktur selulosa yang berbentuk kristalin ini menyebabkan selulosa sukar larut dalam air (Lehninger, 1995).

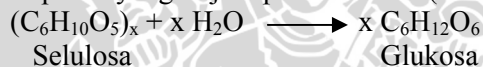
Selulosa dapat ditemukan pada limbah, misalnya pada jerami, klobot jagung, kulit pisang, limbah kayu, serta limbah kertas (Rini, 2006). Struktur selulosa terdiri atas rantai polimer panjang dan lurus dari unit glukosa yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4 (Meyes, dkk, 1992).

Struktur selulosa sebagai residu glukosa dapat digambarkan sebagai berikut (John, 1992):



Gambar 2.1. Struktur Selulosa

Pemecahan (hidrolisis) molekul selulosa yang kompleks menjadi molekul monosakarida mudah dilakukan dengan mendidihkan larutan atau suspensi selulosa tersebut dengan larutan asam. Reaksi hidrolisis sempurna yang terjadi pada selulosa (Keenan, dkk, 1984):



2.3. Enzim Selulase *Trichoderma viride*

Enzim adalah suatu molekul protein yang dapat mempercepat reaksi kimia. Secara umum, aktivitas enzim dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, misalnya temperatur, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH, serta adanya inhibitor dan aktivator (Lehninger, 1993).

Selulase merupakan enzim yang bekerja menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosida pada selulosa dan turunannya. Enzim ini dapat mengubah selulosa tak tersubstitusi menjadi selobiosa yang kemudian dihidrolisis lebih lanjut dengan β -glukosidase (Alexander, dkk, 1992). Pemutusan ikatan ini akan menghasilkan oligosakarida turunan selulosa, yang akhirnya diubah menjadi monomer glukosa (Chaplin, 1994). Nama sistematik dari selulase adalah 1,4- β -D-glukan-glukano hidrolase (Pigman dan Hirton, 1970).

Berdasarkan spesifitasnya, enzim selulase kompleks dapat dibedakan menjadi tiga kelompok, yaitu (Muchtadi, dkk, 1992):

1. Enzim endo- β -1,4-glukanase yang mempengaruhi secara serentak ikatan β -1,4 di dalam makromolekul dan

menghasilkan potongan-potongan besar berbentuk rantai dengan ujung-ujung bebas

2. Enzim ekso- β -1,4-glukanase, yang memotong mulai dari ujung-ujung rantai disakarida selobiosa
3. Enzim β -glukosidase, yang menghidrolisis selobiosa dengan membentuk glukosa

Mikroba penghasil enzim selulase antara lain: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funicolsum*, dan *Cellulomonas* (Fox, 1991).

Trichoderma viride merupakan salah satu spesies kapang jenis *Trichoderma*. Kapang ini memiliki aktivitas selulolitik, karena dapat menghasilkan enzim selulosa yang cukup banyak dan bersifat cukup stabil (Judoamidjojo, dkk, 1992).

Klasifikasi tentang kapang *Trichoderma viride* (Fardiaz, 1992):

Kerajaan	: Plantae
Divisio	: Eumycota
Kelas	: Deuteromycetes
Sub Kelas	: Hypomycetes
Ordo	: Moniliaceae
Genus	: <i>Trichoderma</i>
Spesies	: <i>Trichoderma viride</i>

Trichoderma viride banyak dijumpai dalam tanah dan aktif pada proses amonifikasi serta dekomposisi selulosa. Ciri-ciri spesifiknya antara lain: misellium bersepat, membentuk konidia bulat atau oval, berwarna hijau terang dan berbentuk bola-bola berlendir (Fardiaz, 1992). Jenis kapang ini dapat berkembang biak dengan baik pada kisaran suhu 25-30°C dan pada pH 4,0-4,5 (Waluyo, 2005).

Secara enzimatik, selulosa dapat diubah menjadi glukosa melalui proses hidrolisis, yakni proses pemecahan suatu substrat menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana dengan pertolongan air. Dengan menggunakan *Trichoderma viride*, hidrolisis selulosa menjadi glukosa secara konsisten melewati dua tahap penting dalam sistem enzimatik, yaitu pemecahan ikatan glikosidik pada selulosa menjadi selobiosa oleh β -1,4-glukanase dan pemecahan ikatan β -1,4-glikosidik pada selobiosa menjadi glukosa oleh β -glukosidase (Fox, 1991).

2.4. Amobilisasi Enzim

Untuk menjaga stabilitas dan efisiensi enzim, telah berkembang suatu metode, yaitu amobilisasi enzim. Dengan teknik amobilisasi, enzim dimodifikasi dengan cara tertentu, sehingga dapat dengan mudah dipisahkan dari produk, untuk digunakan secara berulang dan terus-menerus (Worsfold, 1995).

Metode amobilisasi enzim meliputi metode ikatan *carrier*, metode ikatan silang, dan metode penjebakan. Metode ikatan *carrier* dan metode ikatan silang kurang efektif digunakan, karena dapat menyebabkan perubahan konformasi pusat aktif enzim. Selain itu, ikatan antara enzim dengan *carrier* yang lemah dapat menyebabkan enzim terlepas (Sutrisno, 1998).

Cara yang paling sering digunakan adalah metode penjebakan (*entrapping*). Hal ini dimungkinkan dengan pertimbangan bahwa metode penjeratan mudah dilakukan, murah, aktivitas enzim dapat bertahan lama, dan lebih aman dari pengaruh luar (Chibata, dkk, 1983). Pada metode penjebakan ini, enzim dijemak secara fisik dalam suatu matriks polimer, sehingga pergerakan enzim dalam melakukan aktivitasnya hanya terbatas pada kisi-kisi matriks tersebut. Hal ini menyebabkan aktivitas enzim dapat dipertahankan dan tidak terjadi perubahan fungsi katalitik dan struktur alami enzim (Sutrisno, 1998).

Enzim amobil yang aktif dan stabil memiliki beberapa keunggulan daripada enzim dalam larutan, yaitu (Chibata, dkk, 1983) :

1. stabilitas enzim lebih tinggi dalam penyimpanannya
2. macam enzim amobil dapat dibuat sesuai perencanaan untuk pemakaian tertentu
3. enzim dapat dipakai berulang kali tanpa melalui prosedur regenerasi yang nonekonomis
4. pemakaian bahan baku lebih efisien dan polusi diharapkan dapat dikurangi

Namun, di samping memberikan keuntungan, amobilisasi enzim juga memiliki kekurangan. Berbagai jenis perubahan dapat terjadi selama proses amobilisasi, bergantung pada jenis proses yang dipilih. Hal ini dapat mengakibatkan turunnya aktivitas spesifik enzim karena kondisi pori yang terlalu rapat sehingga menyulitkan interaksi antara enzim dengan substrat (Suhartono, 1991).

Matriks polimer yang umum digunakan adalah karagenan, alginat, pati, dan agar. Proses metode penjebakan yang paling banyak dilakukan adalah dengan menggunakan alginat. Salah satu turunan

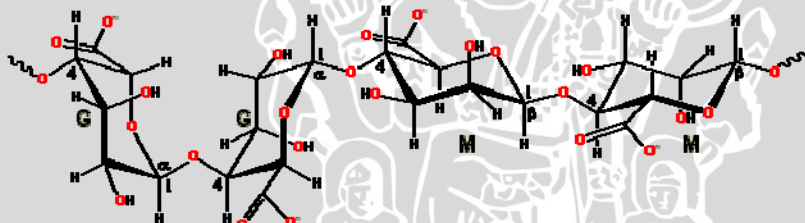
dari alginat adalah Na-alginat, yang akan membentuk ikatan silang dengan kation multivalen seperti Ca^{2+} , yang kemudian akan membentuk matriks polimer Ca-alginat dengan ukuran pori 5-200 nm (Klinkenberg, 2001).

2.5. Alginat

Alginat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) merupakan polisakarida dari asam β -D-Manuronat dan α -L-Guluronat yang dihubungkan oleh ikatan 1,4. Polimer ini mengandung suatu gugus karboksil pada masing-masing gugus gula dan dengan adanya Ca^{2+} atau kation multivalen lainnya dalam larutan air akan membentuk gel. (Brown, dkk, 2004).

Alginat diisolasi dari anggota famili *Fucaceae* dan *Laminariales*. Salah satu senyawa turunan dari alginat adalah Na-alginat yang mempunyai sifat terdispersi dalam air, tetapi bila telah bereaksi dengan garam kalsium akan membentuk Ca-alginat yang tidak larut dalam air, alkohol, eter, dan kloroform (Hawley, 1987).

Struktur alginat (Wang, 1996):

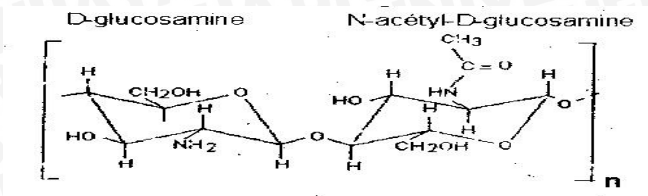


Gambar 2.2. Struktur Alginat

2.6. Kitosan

Kitosan merupakan produk terdeasetilasi dari kitin yang merupakan biopolimer alami kedua terbanyak setelah selulosa. Sampai saat ini, kitosan masih menjadi limbah yang dibuang dan menimbulkan masalah lingkungan (Meidina, dkk, 2002). Polimer ini terdiri atas sebagian besar rantai N-Acetyl-D-Glucosamine tidak bercabang, yang dapat ditemukan dalam jamur, hewan tak bertulang belakang, dan hewan laut, serta dari exoskeleton hewan bertulang keras, seperti ketam dan udang (Anonymous, 2006).

Struktur kitosan adalah sebagai berikut (Anonymous, 2006):



Gambar 2.3. Struktur Kitosan

Kitosan memiliki kelarutan yang rendah dalam air, asam sulfat, larutan basa, dan larutan organik. Dalam larutan asam, gugus amino bebas pada molekul kitosan akan terprotonasi dengan mudah menjadi -NH_3^+ dan dapat berinteraksi membentuk suatu ikatan silang dengan molekul bermuatan negatif, misalnya glutaraldehid dan natrium tripolifosfat (Devika dan Varsha, 2006).

2.7. Amobilisasi Menggunakan Ca-alginat-Kitosan

Amobilisasi dengan menggunakan carrier Na-alginat merupakan salah satu metode yang paling banyak dilakukan, karena murah dan mudah dilakukan. Amobilisasi dilakukan pada suhu kamar dengan meneteskan larutan enzim dan Na-alginat pada larutan CaCl_2 yang digunakan sebagai ion penetral, sehingga diperoleh enzim amobil yang terperangkap dalam Ca-alginat (Klinkenberg, 2001).

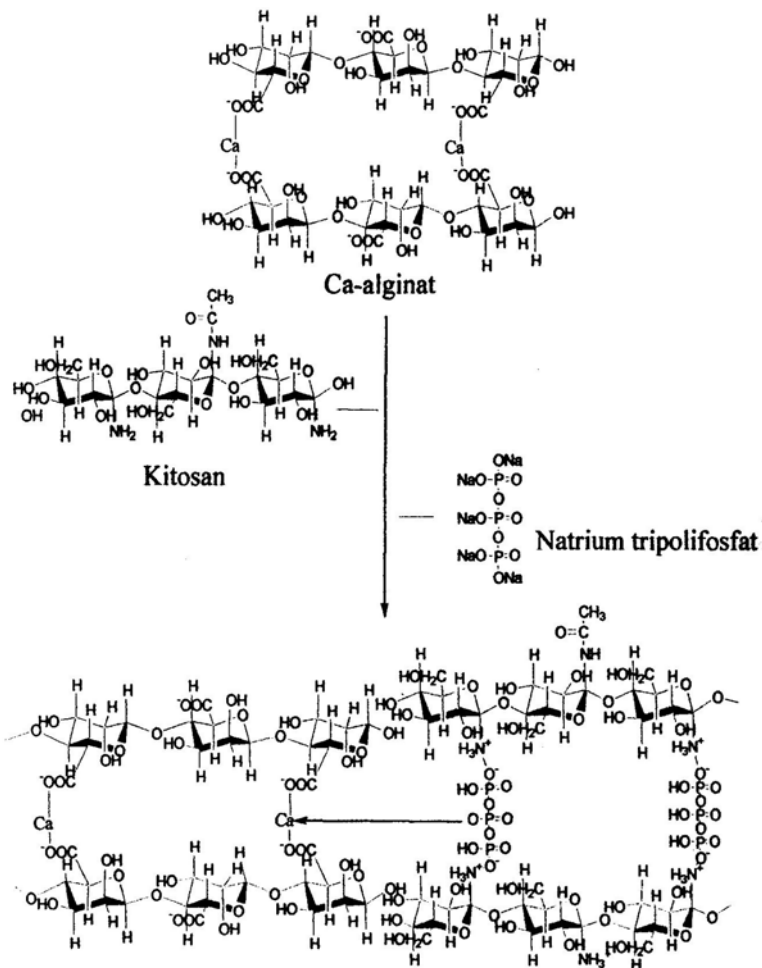
Tingkat porositas dari metode amobilisasi enzim tergantung pada konsentrasi Na-alginat yang digunakan. Kenaikan konsentrasi Na-alginat tersebut menyebabkan gel yang terbentuk semakin rapat, dengan porositas yang semakin rendah, karena air yang terjebak dalam gel semakin rendah, sehingga enzim akan sulit terlepas menuju larutan (Resminingsih, 2005).

Setelah dilakukan penjebakan dengan alginat, enzim dijebak dengan menggunakan kitosan untuk membentuk sistem amobilisasi *double layer*, di mana gel alginat yang terbentuk disuspensikan ke dalam larutan natrium tripolifosfat yang berfungsi sebagai mediator terbentuknya ikatan antara alginat dan kitosan, sehingga inti alginat akan diselubungi oleh lapisan kitosan yang berikatan silang dengan natrium tripolifosfat (Taqieddin, dkk, 2002).

Terbentuknya gel Ca-alginat dan kitosan ini disebabkan karena muatan positif residu amina dari kitosan bereaksi dengan muatan negatif dari tripolifosfat melalui ikatan ionik. Tripolifosfat terdifusi ke dalam Ca-alginat dan khelat ion kalsium. Kekuatan gel ini

semakin meningkat seiring dengan kenaikan konsentrasi kitosan yang digunakan (Deutzenberg, dkk, 1994).

Terbentuknya sistem *double layer* antara Ca-alginat dan kitosan dapat digambarkan (Taqieddin, dkk, 2002):

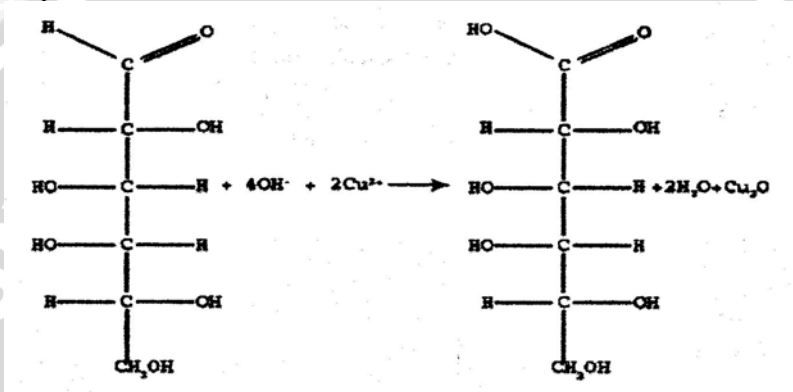


Gambar 2.4. Interaksi antara Ca-alginat dan kitosan membentuk sistem *double layer*

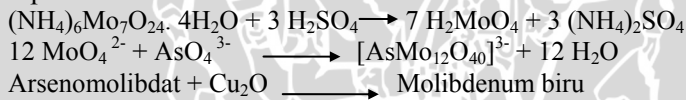
2.8. Penentuan Kadar Glukosa dengan Metode Nelson-Somogyi

Penentuan kadar D-glukosa dengan metode Nelson-Somogyi melibatkan dua tahap reaksi, yaitu reaksi D-glukosa dengan pereaksi Nelson yang menghasilkan endapan merah bata Cu_2O . Kemudian, reaksi kedua adalah reaksi antara Cu_2O dengan pereaksi Arsenomolibdat, di mana reaksinya dapat digambarkan sebagai berikut (Anonymous, 2003):

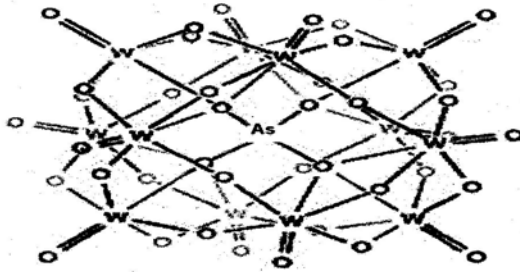
Tahap I:



Tahap II:



Untuk pembuatan pereaksi Arsenomolibdat, ammonium molybdat ditambah dengan asam sulfat untuk menghasilkan asam molibdat (H_2MoO_4) yang akan larut dalam asam dalam jumlah berlebih. Arsenat dengan ammonium molibdat dari asam molibdat bereaksi sehingga menghasilkan arsenomolibdat yang berwarna kuning, yang dapat direduksi oleh tembaga (I) oksida sehingga menghasilkan kompleks berwarna biru, yang dikenal dengan molibdenum biru yang strukturnya dapat digambarkan (Vogel, 1994):



Gambar 2.5. Struktur Molibdenum biru

Untuk penentuan kadar D-glukosa, digunakan persamaan Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot b \cdot C$ (mol/L) yang menyatakan hubungan antara besarnya Absorbansi (A) terhadap konsentrasi D-glukosa, di mana apabila dibuat grafik yang menyatakan hubungan A dan C, akan didapatkan garis lurus dengan kemiringan $\epsilon \cdot b$. Dengan menggunakan kurva baku tersebut, kadar D-glukosa untuk sampel dapat ditentukan (Underwood dan Day, 1993).

2.9. Hipotesis

Kondisi proses konversi selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa yang meliputi pH, suhu, dan waktu inkubasi dapat mempengaruhi aktivitas enzim selulase yang teramobil dalam Ca-alginat-kitosan.

BAB III

Metodologi Penelitian

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Waktu penelitian dari bulan Mei-September 2007.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Kapang *Trichoderma viride* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pusat Antar Universitas (PAU Pangan) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, dan kulit pisang kepok yang sudah matang sebagai substrat diperoleh dari pasar yang berada di wilayah kota Malang.

3.2.2. Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: besi (II) sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), kalsium klorida dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), asam asetat glasial (CH_3COOH), natrium asetat (CH_3COONa), asam klorida (HCl), ammonium molibdat tetrahidrat [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$], asam sulfat pekat (H_2SO_4) 98% ($\rho = 1,8 \text{ kg/L}$), kalium klorida (KCl), kalium natrium tartrat tetrahidrat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), natrium karbonat anhidrat (Na_2CO_3), natrium sulfat anhidrat (Na_2SO_4), natrium hidrogen karbonat (NaHCO_3), natrium nitrat (NaNO_3), natrium hidrogen arsenat heptahidrat ($\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tembaga sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), kalium permanganat (KMnO_4), kalium bifosfat (KH_2PO_4), magnesium sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Bahan-bahan kimia yang digunakan tersebut memiliki derajat kemurnian pro analisa (pa). Selain itu, digunakan pula: CMC-mineral, agarose, tween-80, bacto pepton, glukosa, natrium alginat, natrium tripolifosfat, kitosan, dan akuades.

3.2.3. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: jarum ose, lemari pendingin (merk Bosc), *magnetic stirrer*, pengaduk magnetik (Heidloph MR 2002), neraca analitik Mettler (merk Toledo AL 204), inkubator (merk Herause tipe B 50-42), pH meter (merk Schott Gerate CG 820), *shaker* (merk Edmund Buhler SM 25), seperangkat alat gelas (erlenmeyer, pipet tetes, pipet volum, pipet ukur, gelas ukur, labu ukur, tabung reaksi, gelas arloji, pengaduk gelas, corong, *gelas beaker*), *sentrifuse* dingin (merk Danley BR 401), autoklaf (model No.25X), spektrofotometer UV-Vis 1601 (merk Zhimadzu) dengan kuvet, mantel pemanas, penangas air (merk Memmert NR 900660), oven (merk Memmert), bola hisap, aluminium foil, kapas, dan pembakar spiritus.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode percobaan dalam laboratorium. Dalam penelitian ini terdapat tiga faktor dengan berbagai taraf, yaitu:

- a. pH : 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; dan 6,0
- b. suhu (°C) : 45, 50, 55, 60, dan 65
- c. waktu inkubasi (menit) : 10, 15, 20, 25, dan 30

Setiap perlakuan diulang 3 kali dengan pola Rancangan Acak Lengkap (RAL). Adapun tahap-tahap penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- 1. penyiapan sampel
 - 1.1. penyiapan substrat kulit pisang
 - 1.2. analisa kadar selulosa dalam kulit pisang
- 2. Isolasi enzim selulase
 - 2.1. penyiapan media pertumbuhan
 - a. media padat
 - b. media cair
 - 2.2. peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*
 - 2.3. pembuatan kurva pertumbuhan *Trichoderma viride*
 - 2.4. pembuatan biakan aktif (inokulum)
 - 2.5. produksi dan isolasi enzim selulase
- 3. amobilisasi enzim selulase dengan matriks Ca-alginat-kitosan

4. hidrolisis selulosa
 - 4.1. penentuan panjang gelombang maksimum larutan glukosa
 - 4.2. pembuatan kurva baku larutan glukosa standar
 - 4.3. penentuan kadar glukosa dengan metode Nelson-Somogyi
 - 4.4. penentuan kondisi optimum enzim selulase amobil yang meliputi pH, suhu, dan waktu inkubasi
5. analisa hasil hidrolisis selulosa
 - 5.1. pembuatan kurva baku Boyin Serum Albumin (BSA)
 - 5.2. penentuan kadar protein selulase
 - 5.3. penentuan kadar protein selulase yang tidak terjebak dalam gel pengamobil
 - 5.4. penentuan aktivitas enzim selulase amobil
 - 5.5. penentuan % selulosa yang mengalami konversi dengan enzim selulase amobil
6. analisa data

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Penyiapan sampel

3.4.1.1. Penyiapan substrat kulit pisang 3 %

Kulit pisang dibersihkan, dicuci dengan akuades, dipotong kecil-kecil, ditambahkan 10 mL akuades, dan dihancurkan dengan *blender*. Selanjutnya, ditimbang bubur kulit pisang sebanyak 3,0000 gram dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

3.4.1.2. Analisa Kadar Selulosa dalam Kulit Pisang

Sebanyak 2,16 gram kulit pisang dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambah 150 mL akuades dan dipanaskan selama 2 jam, kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring, dan residu dicuci dengan akuades. Residu yang diperoleh dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, dan ditambah dengan 150 mL H_2SO_4 0,5 M dan direfluks selama 1 jam pada suhu 100°C . Residu disaring kembali menggunakan kertas saring dan dicuci dengan akuades panas, kemudian dikeringkan dalam oven, dan ditimbang (W bahan kering). Bahan kering dipindahkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambah 10 mL H_2SO_4 72% dan dibiarkan selama 4 jam. Setelah itu diencerkan dengan 150 mL larutan H_2SO_4

0,5 M dan direfluks pada suhu 100°C selama 1 jam, kemudian disaring menggunakan kertas saring yang telah diketahui beratnya dan residu dicuci dengan akuades panas dan dikeringkan dalam oven hingga didapatkan berat konstan (W akhir).

3.4.2. Isolasi Enzim Selulase

3.4.2.1. Penyiapan Media Pertumbuhan

a. Media Padat

Ditimbang sebanyak 20 gram kentang, dikupas, dibersihkan, dan dipotong kecil-kecil. Potongan-potongan tersebut dimasukkan ke dalam gelas beaker 500 mL dan ditambah dengan 100 mL akuades, kemudian dididihkan selama 1 jam, dan disaring. Selanjutnya, filtrat yang dihasilkan ditambah dengan 2 gram dekstrosa serta 1,5 gram agarose, dan dididihkan hingga semua bahan larut. Untuk membuat agar miring, dipipet sebanyak 5 mL larutan ke dalam tabung reaksi, lalu ditutup dengan kapas, dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi. Setelah itu, tabung reaksi diletakkan dalam posisi miring dan dibiarkan memadat selama 24 jam.

b. Media cair

Larutan CMC-mineral sebanyak 800 mL dimasukkan dalam gelas beaker 1L dan diatur pH-nya hingga mencapai pH 5 dengan menambahkan larutan asam asetat sedikit demi sedikit (pH awal larutan 5,1). Selanjutnya, larutan campuran ditambah dengan 1 mL buffer asetat pH 5, kemudian diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Larutan ditutup dengan aluminium foil dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 psi, kemudian larutan dibiarkan dingin.

3.4.2.2. Peremajaan Biakan Murni *Trichoderma viride*

Digunakan jarum ose untuk memindahkan kapang *Trichoderma viride* secara aseptis ke dalam media padat, kemudian mulut tabung reaksi dibakar dengan pembakar spiritus dan ditutup dengan kapas steril. Selanjutnya, diinkubasi selama 4 hari pada suhu 30°C dalam inkubator.

3.4.2.3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride*

Diambil spora biakan murni *Trichoderma viride* yang telah berumur 4 hari dari salah satu agar miring percobaan (3.4.2.1.a), kemudian disuspensikan dalam 10 mL akuades steril. Suspensi diambil masing-masing sebanyak 0,1 mL dan ditanam dalam 24 erlenmeyer, di mana tiap tabung telah berisi 10 mL media cair steril percobaan (3.4.2.1.b). Biakan diinkubasi di atas *shaker* pada temperatur kamar. Pengamatan dilakukan selama 0-100 jam. Pada 64 jam pertama, pengamatan dilakukan setiap 12 jam, sedangkan inkubasi pada jam ke 64-84 diamati setiap 4 jam, dengan cara menimbang berat kering sel yang diambil pada masing-masing interval. Selanjutnya dibuat kurva pertumbuhan yang menunjukkan hubungan waktu (sumbu x) dengan berat kering sel (sumbu y).

3.4.2.4. Pembuatan Biakan Aktif (Inokulum)

Pembuatan inokulum dilakukan dengan cara mengambil spora *Trichoderma viride* dari biakan murni yang telah berumur 4 hari dari salah satu agar miring percobaan (3.4.2.1.a), kemudian disuspensikan ke dalam 10 mL akuades steril. Selanjutnya, sebanyak 2 mL suspensi ini ditanamkan ke dalam 3 buah erlenmeyer yang masing-masing berisi 13 mL media cair yang telah disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 psi. Setelah itu, diinkubasi di atas *shaker* pada suhu 28°C sampai mencapai fase logaritma, yaitu pada jam ke-36.

3.4.2.5. Produksi dan Isolasi Enzim Selulase

Untuk memproduksi dan mengisolasi enzim selulase, disediakan 300 mL media cair, kemudian dimasukkan ke dalam tiga buah erlenmeyer 250 mL, yang masing-masing berisi 100 mL, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 psi. Setelah dingin, ditambahkan 10 mL inokulum secara aseptis. Selanjutnya, media tersebut diinkubasi di atas *shaker* pada suhu kamar hingga mencapai fase awal stasioner, yaitu pada jam ke-60.

Untuk mengisolasi enzim, dapat dilakukan proses ekstraksi, di mana masing-masing hasil inkubasi ditambah dengan 10 mL buffer asetat pH 5. Kemudian campuran tersebut disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim selulase.

3.4.3. Amobilisasi Enzim Selulase dengan Matriks Ca-alginat-Kitosan

Amobilisasi enzim diawali dengan membuat larutan Na-alginat konsentrasi 3% (w/v). Dipipet sebanyak 20 mL larutan Na-alginat 3%, dan dicampurkan ke dalam 4 mL larutan enzim dan diaduk dengan *stirer*. Campuran enzim dan larutan Na-alginat ini diteteskan dengan *syringe* 10 mL pada gelas beaker 250 mL yang telah diisi dengan 50 mL larutan CaCl_2 0,15 M sambil diaduk dengan *stirrer*.

Manik-manik yang terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan CaCl_2 0,15 M selama 1 jam agar manik-manik tersebut menjadi keras. Kemudian manik-manik dipisahkan dari larutan dengan penyaringan menggunakan kertas saring, dan diperoleh enzim selulase amobil, serta filtrat yang merupakan campuran antara larutan CaCl_2 serta enzim tidak terjebak. Setelah itu butiran enzim yang telah teramobilisasi dicuci dengan akuades. Kemudian manik-manik tersebut disuspensikan ke dalam 100 mL larutan kitosan 2,0 % (w/v).

Hibrid mikrokapsul terbentuk dengan mengambil media ke dalam pipet plastik yang telah dimodifikasi, kemudian meneteskannya ke dalam larutan Natrium Tripolifosfat 3% (w/v). Kemudian dilakukan penyaringan sehingga didapatkan ekstrak kasar selulase yang terjebak dalam Ca-alginat-kitosan dan filtrate yang mengandung ekstrak kasar selulase yang tidak terjebak dalam gel pengamobil. Selanjutnya, enzim selulase yang teramobil dapat digunakan untuk penentuan kondisi optimum enzim selulase amobil.

3.4.4. Hidrolisis Selulosa

3.4.4.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Glukosa

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan mengukur serapan dari larutan glukosa standar 30 ppm, di mana 1 mL larutan tersebut ditambah dengan 1 mL pereaksi Nelson, dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 20 menit. Setelah itu, larutan didinginkan hingga suhu tabung mencapai 25°C. Selanjutnya ditambahkan 1 mL pereaksi Arsenomolibdat, dikocok hingga homogen, dan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas. Kemudian

larutan tersebut diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada interval panjang gelombang 500-800 nm dengan menggunakan air bebas reduktor yang ditambah dengan pereaksi sebagai blanko.

3.4.4.2. Pembuatan Kurva Baku Larutan Glukosa Standar

Disiapkan 10 buah tabung reaksi, dan masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa standar untuk konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 mg/L, di mana larutan stok awal memiliki konsentrasi 100 mg/L. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi ditambahkan 1 mL pereaksi Nelson. Mulut tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil, kemudian masing-masing tabung dipanaskan di atas penangas air selama 20 menit, lalu didinginkan hingga suhu tabung mencapai 25°C. Kemudian ke dalam masing-masing campuran tersebut ditambahkan 1 mL pereaksi Arsenomolibdat dan dikocok hingga homogen, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi akhir larutan glukosa sebesar 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Selanjutnya, larutan ditentukan serapannya pada panjang gelombang 746,5 nm (percobaan (3.4.4.1)) dengan menggunakan air bebas reduktor yang ditambah pereaksi sebagai blanko.

3.4.4.3. Penentuan Kadar Glukosa Dengan Metode Nelson-Somogyi

Sebanyak 1 mL larutan uji diencerkan dengan air bebas reduktor dalam labu ukur 10 mL, kemudian dipipet 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambah dengan 1 mL pereaksi Nelson. Mulut tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 20 menit, kemudian didinginkan pada suhu kamar. Selanjutnya, ke dalam campuran ditambahkan 1 mL pereaksi Arsenomolibdat dan dikocok hingga homogen, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan hingga tanda batas menggunakan air bebas reduktor. Larutan campuran ditentukan serapannya pada panjang gelombang 746,5 nm (percobaan (3.4.4.1)) dengan menggunakan blanko larutan yang dibuat sama dengan pembuatan larutan uji, namun aktivitas enzim dimatikan dengan melakukan pemanasan terlebih dahulu.

Kadar glukosa dihitung dari nilai absorbansi yang dihasilkan kemudian diplotkan persamaan kurva baku $y = 0,2495 x$ (percobaan (3.4.4.2)) dan dikalikan dengan faktor pengenceran (fp) sebanyak 100 kali. Kadar glukosa dinyatakan dalam mg/L.

3.4.4.4. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Selulase

a. Penentuan pH Optimum

Untuk menentukan pH optimum, dilakukan uji aktivitas menggunakan ekstrak kasar enzim selulase amobil pada kondisi pH yang berbeda, yaitu pada pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; dan 6,0 dengan cara:

Ke dalam tabung reaksi masing-masing diisi dengan 1 mL substrat kulit pisang 3% (w/v). Selanjutnya, tabung reaksi tersebut diinkubasi di atas penangas air pada suhu 50°C selama 15 menit, kemudian ditambah dengan 0,5 gram ekstrak kasar enzim selulase amobil. Setelah itu, masing-masing tabung ditambah dengan 1 mL buffer asetat pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; dan 6,0. Masing-masing tabung diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Untuk menghentikan proses hidrolisis, tabung dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dalam air es hingga suhu tabung mencapai suhu kamar, dan dilakukan uji kadar glukosa dengan metode Nelson-Somogyi.

b. Penentuan Suhu Optimum

Untuk menentukan suhu optimum, dilakukan uji aktivitas ekstrak kasar enzim selulase amobil pada pH 5,5 (pH optimum). Variasi suhu dilakukan pada 45°C, 50°C, 55°C 60°C dan 65°C selama 30 menit. Tahapan kerja yang dilakukan seperti pada percobaan (3.4.4.4.a), dan dilakukan uji kadar glukosa dengan metode Nelson-Somogyi.

c. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan menggunakan ekstrak kasar enzim selulase amobil pada pH 5,5 dan suhu 60°C (pH dan suhu optimum), serta waktu inkubasi yang divariasi menjadi 10, 15, 20, 25, dan 30 menit. Tahapan perlakuan sama seperti percobaan (3.4.4.4.a), dan dilakukan uji kadar gula pereduksinya dengan metode Nelson-Somogyi.

3.4.5. Analisa Hasil Hidrolisis Selulosa

3.4.5.1. Pembuatan Kurva Baku Bovin Serum Albumin (BSA)

Ditimbang sebanyak 1,0000 gram BSA, dilarutkan dalam 50 mL akuades, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas, hingga diperoleh larutan stok BSA 10000 ppm. Selanjutnya, dipipet masing-masing sebanyak 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berbeda. Larutan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas, dan diperoleh larutan BSA 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, dan 9000 ppm. Dari tiap konsentrasi larutan BSA dipipet sebanyak 2 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, ditambah dengan 8 mL pereaksi Biuret dan 2 mL buffer asetat pH 5, lalu dikocok dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit. Larutan standar diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum BSA (550 nm). Hasil pengukuran absorbansi larutan standar pada berbagai konsentrasi dibuat persamaan regresi linier sehingga dihasilkan kurva baku BSA (Trisna, 2007).

3.4.5.2. Penentuan Kadar Protein Selulase

Penentuan kadar protein selulase dilakukan dengan metode Biuret. Dipipet sebanyak 2 mL ekstrak kasar selulase ditambah dengan 2 mL larutan kasein dan 8 mL pereaksi Biuret, kemudian dikocok dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit. Selanjutnya, diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum BSA (550 nm). Larutan campuran yang terdiri atas 2 mL akuades, 2 mL buffer asetat, dan 8 mL pereaksi Biuret digunakan sebagai larutan blanko. Kadar protein selulase ditentukan dengan memplotkan nilai absorbansi enzim terhadap kurva standar BSA.

3.4.5.3. Penentuan Kadar Protein Selulase yang Tidak Terjebak dalam Gel Pengamobil

Untuk menentukan kadar protein selulase yang tidak terjebak dalam gel pengamobil, maka dipipet sebanyak 2 mL filtrat ekstrak

kasar selulase amobil setelah penyaringan, ditambah dengan 2 mL larutan kasein 5000 ppm, dan 8 mL pereaksi Biuret, kemudian dikocok dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Selanjutnya, larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum BSA (550 nm). Larutan campuran yang terdiri atas 2 mL akuades, 2 mL buffer asetat, dan 8 mL pereaksi Biuret digunakan sebagai larutan blanko. Kadar protein selulase ditentukan dengan memplotkan nilai absorbansi enzim terhadap kurva standar BSA.

3.4.5.4. Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase Amobil

Aktivitas selulase amobil dinyatakan dalam satuan Unit, yaitu banyaknya μmol produk yang dihasilkan setiap 1 miligram enzim selulase amobil setiap menitnya. Pengukuran aktivitas enzim selulase amobil ini dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh dan dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{konsentrasi glukosa}}{\text{BM glukosa}} \times \frac{V}{p \cdot q} \times fp$$

di mana: V = volume total sampel (mL)
 p = jumlah enzim (miligram)
 q = waktu inkubasi (menit)
 fp = faktor pengenceran (100 kali)

3.4.5.5. Penentuan % Selulosa yang Mengalami Konversi Menjadi Glukosa dengan Menggunakan Selulase Amobil

Kadar selulosa dalam kulit pisang dapat dihitung melalui rumus:

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{W \text{ bahan kering} - W \text{ akhir}}{W \text{ awal}} \times 100\%$$

di mana : W awal = berat substrat kulit pisang awal
 W bahan kering = berat residu sebelum perendaman dalam H_2SO_4 72 %
 W akhir = berat residu akhir

Sedangkan % selulosa yang mengalami konversi menjadi glukosa dihitung melalui rumus:

$$\% \text{ konversi} = \frac{W \text{ glukosa}}{W \text{ kulit pisang} \times \text{kadar selulosa}} \times 100 \%$$

3.4.6. Analisa Data

Data yang diperoleh dari setiap perlakuan dapat dianalisis secara statistika dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Apabila terdapat perbedaan di antara perlakuan, akan diuji lebih lanjut dengan beda nyata terkecil. Semua data percobaan diuji dengan tingkat kepercayaan 95% atau beda nyata terkecil (BNT) 5%.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Amobilisasi Enzim Selulase

Dalam penelitian ini, amobilisasi enzim dilakukan dengan metode penjebakan menggunakan Ca-alginat, dan dilanjutkan dengan menggunakan kitosan sehingga membentuk sistem *double layer*. Keefektifan metode amobilisasi yang digunakan dipengaruhi oleh kerapatan pori-pori gel yang digunakan. Semakin rapat pori-pori gel, maka enzim semakin banyak terjebak di dalam gel. Akan tetapi, apabila kerapatan pori-pori gel ini rendah, maka enzim dalam gel masih dapat berdifusi ke larutan di sekitarnya, sehingga jumlah enzim yang terjebak di dalam gel pun menurun. Untuk mengantisipasi hal tersebut, dilakukan amobilisasi dengan sistem *double layer* menggunakan kitosan, sehingga kemungkinan difusi enzim ke luar gel akibat kurang rapatnya pori Ca-alginat yang digunakan dapat dikurangi.

Ketika Ca-alginat disuspensikan dalam kitosan dan diteteskan dalam Natrium tripolifosfat, maka Ca-alginat akan diselubungi oleh kitosan yang berikatan silang dengan Natrium tripolifosfat. Ion-ion fosfat akan mengkhelat ion kalsium sehingga terbentuklah sistem *double layer* (Taqieddin, dkk, 2002).

Dari hasil percobaan, didapatkan enzim selulase amobil yang berbentuk manik-manik berwarna putih sebanyak 16,2950 gram. Selanjutnya, dilakukan perhitungan jumlah ekstrak kasar selulase dalam setiap gram manik-manik yang terbentuk, sehingga didapatkan hasil bahwa jumlah ekstrak kasar selulase yang terjebak dalam setiap gram manik-manik (Ca-alginat-kitosan + ekstrak kasar selulase) adalah sebesar 0,453 mg (Lampiran L.7.3).

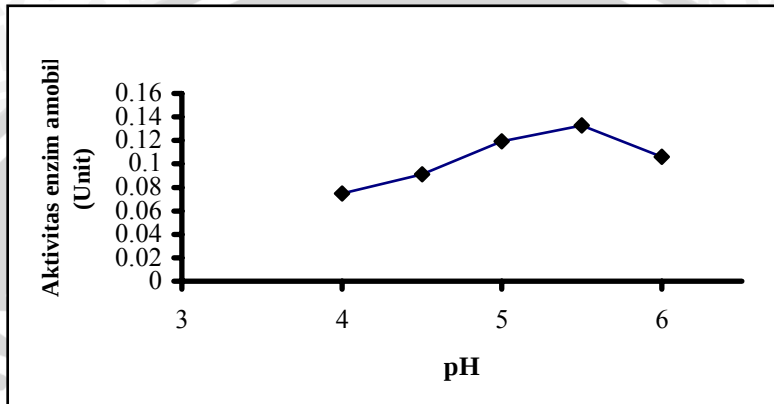
4.2. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Selulase Amobil

4.2.1. Penentuan pH Optimum

Perubahan pH dapat menyebabkan perubahan muatan gugus-gugus yang terkandung dalam protein enzim, sehingga akan mempengaruhi aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena enzim merupakan protein yang tersusun atas asam-asam amino yang mengandung gugus-gugus yang mudah terionisasi, seperti -NH_2 dan -COOH .

Pengaruh perubahan pH terhadap aktivitas enzim selulase amobil dalam menghidrolisis selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa dapat diketahui dengan melakukan pengamatan terhadap absorbansi larutan glukosa yang dihasilkan pada variasi pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5;

dan 6,0, yang dilakukan dengan menambahkan buffer asetat 0,2 M. Kadar glukosa yang dihasilkan ditentukan dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi.



Gambar 4.1. Kurva pengaruh pH terhadap aktivitas enzim selulase amobil

Dari hasil pengukuran yang ditunjukkan pada Gambar 4.1, dapat terlihat bahwa kenaikan aktivitas enzim selulase amobil terjadi dari pH 4,0 hingga 5,5. Aktivitas enzim selulase amobil menurun pada pH 6,0. Kondisi optimum dicapai pada saat pH 5,5 dengan kadar glukosa sampel yang dihasilkan sebesar 81,363 mg/L (Tabel L.10.1) dan aktivitas rata-rata enzim selulase amobil tertinggi, yaitu sebesar 0,133 Unit (Tabel L.12.1).

Enzim selulolitik memiliki sisi aktif pada rantai samping, yang berfungsi sebagai tempat terbentuknya kompleks Enzim-Substrat (ES). Gugus-gugus aktif pada selulase adalah gugus karboksil ($-\text{COOH}$), yang merupakan gugus aktif dari asam amino bermuatan negatif, yaitu asam glutamat dan asam aspartat (Wong, 1995). Gugus-gugus aktif tersebut mudah terionisasi dengan adanya perubahan pH lingkungan, sehingga akan mempengaruhi aktivitas enzim.

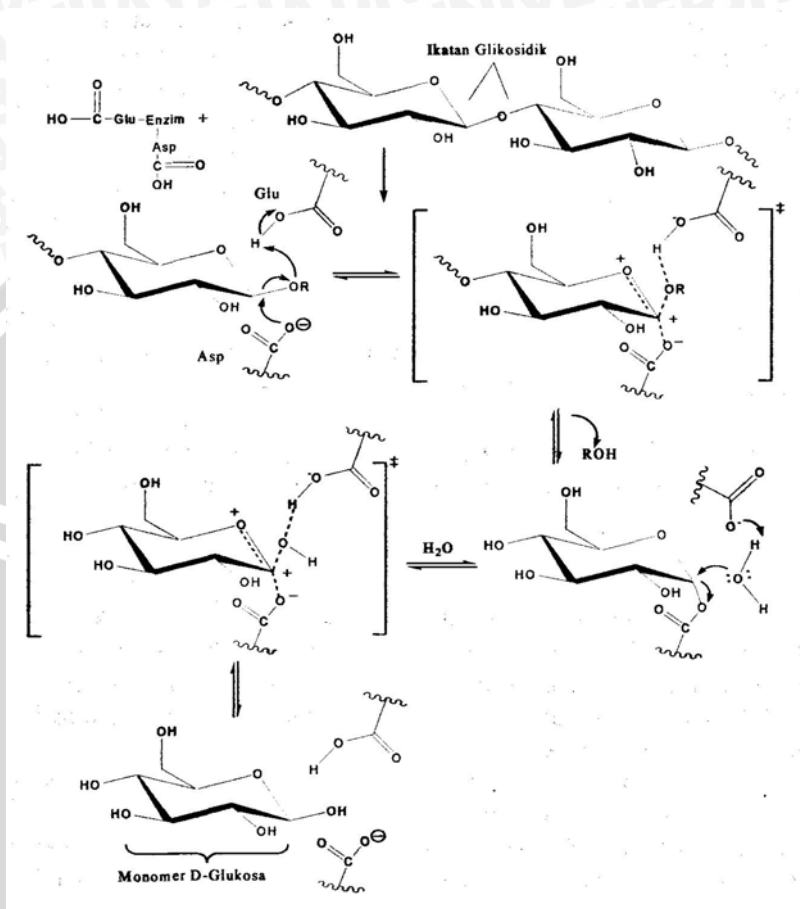
Kenaikan aktivitas enzim selulase amobil terjadi dari pH 4,0 hingga 5,5, sebagai akibat dari adanya ionisasi gugus karboksil ($-\text{COOH}$) dari asam aspartat membentuk ion karboksilat ($-\text{COO}^-$),

sehingga ikatan glikosidik pada substrat yang melibatkan asam aspartat semakin mudah putus. Selain itu, adanya ion H^+ dalam larutan menyebabkan semakin mudahnya pembentukan ROH, dan membuat aktivitas enzim semakin meningkat.

Pada pH 5,5, yang merupakan kondisi pH optimum, terjadi interaksi yang optimal antara enzim selulase amobil dengan substrat, dengan mekanisme reaksi yang dapat digambarkan pada Gambar 4.2. Pada kondisi ini, pasangan elektron bebas pada ion karboksilat dari rantai samping asam aspartat akan mendorong terjadinya protonasi pada atom O glikosidik, dan menyebabkan putusnya ikatan glikosidik. Dengan bantuan H_2O , ion karboksilat dari asam glutamat akan mendorong terjadinya proses hidrolisis, sehingga enzim akan terlepas kembali membentuk monomer glukosa.

Aktivitas enzim amobil mengalami penurunan pada saat kondisi pH di atas pH optimumnya, yaitu pada pH 6,0, karena sisi-sisi aktif enzim telah menjadi bermuatan negatif. Hal ini disebabkan karena jumlah gugus $-COOH$ pada asam glutamat telah mengion membentuk gugus $-COO^-$, sehingga protonasi substrat yang melibatkan gugus karboksil dari asam glutamat menjadi terhambat. Selain itu, penurunan aktivitas ini dapat pula disebabkan karena kondisi larutan yang semakin basa, menyebabkan jumlah ion $-OH^-$ semakin banyak, sehingga menyebabkan terjadinya kompetisi antara OH^- dan atom O glikosidik dalam mengikat H^+ . Hal ini menyebabkan proses hidrolisis tidak berjalan sempurna, yang ditandai dengan jumlah produk yang terbentuk sedikit dan aktivitas enzim menurun.

Berdasarkan analisis ragam (Lampiran L.14.1), didapatkan $F_{hitung} > F_{tabel\ 0,05}$ sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan perlakuan variasi pH terhadap aktivitas enzim selulase amobil. Untuk mengetahui perbedaan perlakuan masing-masing variasi pH, dilakukan uji BNT_{0,05} (Tabel L.14.3) sehingga diketahui bahwa ada perbedaan nyata antar hasil perlakuan variasi pH 4,5; 5,0; 5,5; dan 6,0 terhadap aktivitas enzim selulase amobil.



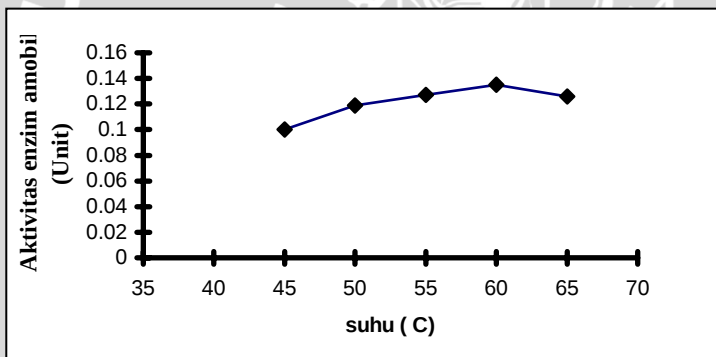
Gambar 4.2. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh selulase

Dalam penelitian ini, diketahui bahwa pH optimum dari enzim selulase yang diamobilkan dalam Ca-alginat dan kitosan adalah pada pH 5,5. Hal ini berbeda dengan pH optimum ekstrak kasar selulase bebas yang menggunakan substrat yang sama yaitu kulit pisang, di mana pH optimumnya dicapai pada pH 4,5 (Mahayana, 2007). Hal ini dapat terjadi karena adanya perbedaan kondisi lingkungan antara di dalam dan di luar gel pengamobil, sehingga dimungkinkan terjadinya pergeseran pH optimumnya.

4.2.2. Penentuan Suhu Optimum

Salah satu faktor lingkungan terpenting yang mempengaruhi laju reaksi adalah suhu. Pada dasarnya, kenaikan suhu akan menyebabkan reaksi dapat berlangsung lebih cepat, karena menyebabkan kenaikan energi kinetik antar molekul reaktan, sehingga kemungkinan tumbukan antar molekul juga semakin besar, dan begitu pula yang terjadi pada reaksi enzimatis, yang menyebabkan terbentuknya kompleks ES lebih cepat. Namun pada suhu yang terlalu tinggi, enzim akan mengalami denaturasi.

Pengaruh perubahan suhu terhadap aktivitas enzim selulase amobil dalam menghidrolisis selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa dibuktikan dengan melakukan pengamatan pada kondisi pH optimum, yaitu pada pH 5,5 dan dilakukan variasi suhu 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, dan 65°C.



Gambar 4.3. Kurva pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim selulase amobil

Melalui Gambar 4.3, dapat diketahui bahwa kenaikan aktivitas enzim selulase amobil terjadi dari suhu 45°C hingga 55°C. Pada suhu 60°C, aktivitas enzim selulase amobil mencapai kondisi optimumnya, di mana kadar glukosa sampel yang dihasilkan sebesar 82,565 mg/L (Tabel L.10.2). Pada kondisi optimum ini diperoleh aktivitas rata-rata enzim selulase amobil tertinggi, yaitu sebesar 0,135 Unit (Lampiran L.12.2).

Kenaikan aktivitas sebelum kondisi suhu optimum terjadi karena molekul reaktan memperoleh energi, sehingga energi kinetiknya

meningkat, dan tumbukan antar molekul lebih sering terjadi, sehingga mempercepat pembentukan produk, dan dapat dihasilkan produk dalam jumlah yang besar.

Pada kondisi suhu optimumnya (suhu 60°C), dicapai aktivitas enzim yang optimal. Setelah mencapai suhu optimumnya, kenaikan temperatur akan menurunkan aktivitas enzim, karena pada dasarnya, enzim merupakan suatu protein, yang akan terdenaturasi ketika mengalami kenaikan suhu yang ekstrim. Ikatan-ikatannya akan terputus dan konformasi enzim mengalami perubahan, terutama pada sisi aktifnya, sehingga kompleks enzim-substrat semakin sulit terbentuk. Karena itulah, pada suhu 65°C, aktivitas enzim selulase amobil mengalami penurunan.

Berdasarkan analisis ragam dan uji BNT_{0,05} (Lampiran L.14.4 dan Tabel L.14.6), dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan nyata pada perlakuan variasi suhu 55°C, 60°C, dan 65°C terhadap aktivitas enzim selulase amobil.

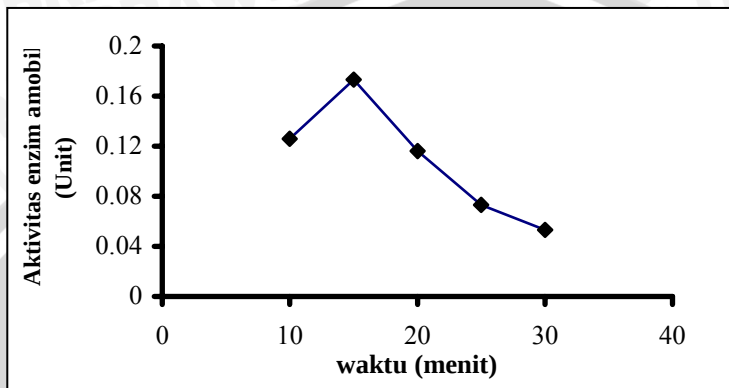
Menurut Mahayana (2007), suhu optimum ekstrak kasar selulase bebas dicapai pada 50°C, sedangkan pada penelitian ini, suhu optimum enzim selulase yang diamobilkan dalam Ca-alginat dan kitosan dicapai pada 60°C. Perbedaan suhu optimum ini dapat disebabkan karena pada penelitian ini, ekstrak kasar selulase terjebak dalam gel pengamobil Ca-alginat-kitosan, sehingga dalam proses pembentukan kompleks enzim-substrat dibutuhkan energi tumbukan yang lebih besar daripada saat enzim berada dalam bentuk bebasnya.

4.2.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum enzim selulase amobil dalam menghidrolisis selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa dilakukan pada kondisi optimum yang telah ditentukan sebelumnya, yaitu pada pH 5,5 dan suhu 60°C dengan melakukan variasi waktu inkubasi untuk mengadakan ikatan antara enzim dengan substrat selama 10, 15, 20, 25, dan 30 menit.

Melalui Gambar 4.4, dapat diketahui bahwa kenaikan aktivitas enzim selulase amobil terjadi dari waktu inkubasi 10 hingga 15 menit. Pada waktu inkubasi 20, 25, dan 30 menit, aktivitas enzim selulase amobil mengalami penurunan. Waktu inkubasi optimum dicapai pada saat 15 menit, di mana kadar glukosa sampel yang dihasilkan sebesar 52,906 mg/L (Tabel L.10.3), dengan aktivitas

rata-rata enzim selulase amobil tertinggi, yaitu sebesar 0,173 Unit (Tabel L.12.3)



Gambar 4.4. Kurva pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase amobil

Pada inkubasi yang dilakukan selama 10 menit, diperoleh aktivitas yang besarnya lebih kecil daripada aktivitas pada waktu inkubasi 15 menit, yang menunjukkan bahwa lamanya waktu inkubasi untuk terjadinya reaksi pembentukan kompleks ES masih kurang, sehingga produk yang dihasilkan juga masih sedikit pada saat reaksi dihentikan. Hal ini disebabkan kontak antara substrat dengan enzim hanya sebagian, sehingga ikatan antara substrat dengan sisi aktif enzim kurang maksimal. Dengan meningkatkan waktu inkubasi, diharapkan kontak antara enzim dengan substrat akan semakin lama, sehingga kompleks ES dan produk yang terbentuk akan semakin meningkat.

Waktu inkubasi optimum dicapai pada 15 menit, yang menunjukkan waktu yang optimum untuk mengadakan ikatan antara enzim dengan substrat. Pada kondisi optimum inilah substrat mampu diikat dengan sesuai oleh sisi aktif dari enzim, sehingga pembentukan kompleks ES lebih mudah, dan lebih mudah pula dalam pembentukan produk.

Akan tetapi, semakin lama waktu inkubasi ini, maka aktivitas enzim akan semakin menurun, yang terjadi mulai 20, 25, hingga 30 menit. Meskipun jumlah produk semakin bertambah, namun

aktivitasnya semakin menurun, yang menunjukkan bahwa penambahan produk tersebut relatif lebih kecil bila dibandingkan dengan penambahan waktu inkubasi. Hal ini terjadi karena sisi aktif enzim telah jenuh oleh substrat, dan jumlah substrat semakin berkurang, sedangkan waktunya semakin bertambah, sehingga produk yang dihasilkan tiap menitnya akan makin menurun.

Berdasarkan analisis ragam dan uji BNT_{0,05} (Lampiran L.14.7 dan Tabel L.14.9), dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan nyata pada perlakuan variasi waktu inkubasi 10, 15, 20, 25, dan 30 menit terhadap aktivitas enzim selulase amobil.

Waktu inkubasi enzim selulase amobil dalam penelitian ini dicapai pada 15 menit. Hasil ini berbeda dengan waktu inkubasi ekstrak kasar selulase bebas, yang dicapai pada 10 menit (Mahayana, 2007). Perbedaan ini disebabkan karena pada penelitian ini terdapat gel pengamobil yang menyebabkan perlunya waktu yang lebih lama bagi substrat untuk berdifusi ke dalam gel Ca-alginat-kitosan untuk menghidrolisis selulosa.

4.3.Efisiensi Konversi Glukosa dari Selulosa Kulit Pisang Menggunakan Enzim Selulase Amobil

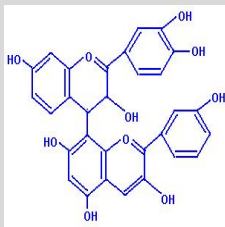
Ekstrak kasar selulase yang diisolasi dari *Trichoderma viride* yang kemudian diamobilkan menggunakan Ca-alginat dan kitosan dapat bekerja menghidrolisis selulosa dalam kulit pisang pada kondisi optimumnya (pH 5,5; suhu 60°C; dan waktu inkubasi 15 menit). Melalui perhitungan, diperoleh hasil selulosa yang terkonversi menjadi glukosa adalah sebesar 1,132 % (Lampiran 13). Menurut Mahayana (2007), efisiensi biokonversi selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa oleh ekstrak kasar selulase bebas hasil isolasi dari *Trichoderma viride* adalah sebesar 2,17 % pada kondisi optimum pH 4,5; suhu 50°C; dan waktu inkubasi 10 menit.

Adanya perbedaan pada besarnya persentase selulosa kulit pisang yang terkonversi menjadi glukosa beserta kondisi optimumnya disebabkan karena diduga adanya pengganggu proses konversi yang berupa lignin dan tanin dalam substrat yang digunakan, sebab dalam kulit pisang terkandung tanin sebesar 30-40 % (Mackay, 2001).

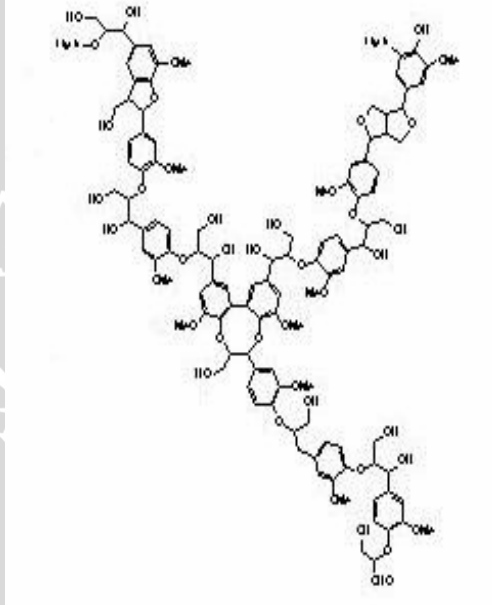
Tanin merupakan senyawa polifenol yang memiliki berat molekul yang besar. Senyawa ini mengandung gugus hidroksil dan beberapa gugus lain seperti karboksil, sehingga dapat membentuk kompleks

yang kuat dengan protein dan beberapa makromolekul (Kinsey, 2004), dan sukar dihidrolisis (Etherington, 2002).

Lignin merupakan senyawa aromatik yang berbentuk amorf, bersifat kaku dan biasanya terdapat pada dinding sel yang berfungsi sebagai perekat antar sel pada tanaman. Senyawa ini dapat larut dalam antrakinon yang merupakan katalisator pemercepat proses delignifikasi sekaligus dapat menjadi senyawa yang dapat meningkatkan stabilitas karbohidrat dan meminimalkan dampak negatif terhadap lingkungan akibat pencemaran zat kimia beracun (Tarmansyah, 2008).



Tanin



Lignin

Gambar 4.5. Struktur tanin dan lignin

Keberadaan tanin dan lignin yang cukup besar dalam substrat yang digunakan ini akan menyebabkan pori-pori matriks enzim amobil akan tertutupi, sehingga menghalangi penetrasi enzim ke dalam substrat, sehingga menghalangi proses hidrolisis selulosa dan produk glukosa yang dihasilkan juga semakin sedikit.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Enzim selulase yang diamobilkan dalam Ca-alginat-kitosan memiliki aktivitas dalam mengkonversi selulosa dalam kulit pisang menjadi glukosa sebesar 0,173 Unit pada kondisi optimum pH 5,5; suhu 60°C; dan waktu inkubasi 15 menit
2. Enzim selulase yang diamobilkan dalam Ca-alginat-kitosan dapat mengkonversi selulosa pada kulit pisang menjadi glukosa sebesar 1,13 % pada kondisi optimumnya

5.2. Saran

Untuk meningkatkan persentase konversi selulosa menjadi glukosa menggunakan enzim selulase amobil, perlu dilakukan perlakuan pendahuluan untuk menghilangkan tanin yang dapat mengganggu proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M., D.A. Hopwood, B.H. Iglewski, and A.I. Laskin, 1992, **Encyclopedia of Microbiology**, vol 1 , Academic Press, Inc., New York.
- Annonymous, 2003, “**Biochemistry 521**”, http://www.psla.umd.edu/courses/plsc474/F2003_PLSC474_Lab11.pdf, tanggal akses : 14 Januari 2007.
- Annonymous, 2006, “**Chitosan**”, http://www.pdrhealt.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/chi_0067.shtm, tanggal akses : 15 Januari 2007.
- Annonymous, 2007, “**Pisang**”, http://www.rusnasbuah.or.id/template.php?1=db_menu.php&m=com_home.php&com_id=6, tanggal akses : 17 Desember 2007.
- Brown, D.E. and Fitzpatrick, P.E., 1975, **Food from Waste Paper**, Applied Science Publisher Ltd, London.
- Brown, P., Phaneuf, M., Bide.,M., Burg, K., 2004, **Cellular Encapsulation Into Porous Alginate Fibers**, Project M04-C113, National Textile Center Annual Report, Clemson University.
- Chaplin,M., 1994, “**Glucose from Cellulose**”, <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/cellulose.html>, tanggal akses : 22 Februari 2007.
- Chibata, I., Horitsu, H., Adachi, S., Takasiho, Y., 1983, **Immobilized Enzymes**, John Willey and Sons Inc., New York, hal 191-197.
- Deutzenberg, H., Jaeger, W., Kotz, J., Phillip, B., Seidel, and Sischerbina, 1994, **D. Polyelectrolytes-Formation, Characterization and Application**, Card Hanser Verlag, Munich, Chapter 2, Chapter 7.

Devika, R.B., dan Varsha, D.R., 2006, **Studies on Effect of pH on Cross-linkung of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note**, AAPS PharmSciTech, 7 (2):1-10.

Etherington, R., 2002, “**A Dictionary of Descriptive Terminology : Vegetable Tanins**”, <http://palimpsest.stanford.edu/don/dt/dt.3686.html>, tanggal akses: 17 Januari 2008.

Fardiaz, 1992, **Mikrobiologi Pangan**, P.A.U. Pangan dan Gizi IPB, Bogor, hal 203-207.

Fessner, W.D., 2000, **Biocatalysis from Discovery to Application**, Springer-Verlag, Germany.

Fox, P.F., 1991, **Food Enzymology**, vol 1, Elsevier Applied Science Ltd., New York.

Goyksoyr, J., Eriksen, J., 1977, **Cellulases, Economic Microbiology : Microbial Enzymes and Bioconversions**, Academic Press, New York.

Hajar, 2007, “**Berita Pariwisata Dinas Informasi dan Komunikasi**”, <http://www.jatim.go.id/news.php>, tanggal akses : 28 Desember 2007.

Hawley, G., 1987, **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**, 5th edition, Van Nostrand Reinhold, New York, hal 143.

John, P., 1992, **Biosynthesis of The Major Crop Products**, John Willey and Sons, New York.

Judoamidjojo, M. Darwis, G.E. Said, 1992, **Teknologi Fermentasi**, Rajawali Press, Jakarta, hal 35-37.

Kalsum, S., Rismiati, Rochayati, 2002, **Kimia**, PT Rosdakarya, Bandung, hal 214.

Keenan, C.W., Kleinfelter, D.C., Wood, J.H., 1984, **Ilmu Kimia untuk Universitas jilid 2**, edisi keenam, alih bahasa: A.H. Pudjaatmaka, Erlangga, Jakarta, hal 418.

- Kinsey, M., 2004, "**Natural Phenol-menon: Appreciation Grows for Healthy Organic Tanins**", <http://www.jvi.org/volumes/volume11/issue6/features/kinsey.php>, tanggal akses : 4 Januari 2008.
- Klinkenberg, G., 2001, **Cell Release from Alginate Immobilized *Lactococcus lactis* ssp.** In **Chitosan and Alginate Coated Beads**. J. Dairy Science 84: 1118-1127.
- Lehninger, 1993, **Dasar-Dasar Biokimia**, Alih bahasa: Thenawijaya, Erlangga, Jakarta, hal 86-88.
- Mackay, B. Estates, 2001, "**Food Uses**", <http://www.mackays.com>, tanggal akses: 10 Desember 2007.
- Mahayana, A.S., 2007, **Penentuan Kondisi Optimum Reaksi Hidrolisis Selulosa pada Kulit Pisang Menjadi Glukosa Secara Enzimatis**, Skripsi, Kimia FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang, hal 33.
- Meidina, Sugiyono, Jenie, S.L., Suhartono, M.T., 2002, "**Aktivitas Antibakteri Oligomer Kitosan yang Diproduksi Menggunakan Kitonase dari Isolat *B. licheniformis* MB-2**", http://www.iptek.net.id/ind/pustaka_pangan/index.php?ch=pupa&id=44&hal=1, tanggal akses: 10 Juni 2007.
- Meyes, P.A., D.M. Martin, V.W. Rodwell, 1992, **Harpers Review of Biochemistry**, 19th edition, Lange Medical Publication Meruzen Asia, Singapura, hal 234-235.
- Muchtadi, D., N.S. Palupi, M. Astawan, 1992, **Enzim dalam Industri Pangan**, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
- Pigman, W., dan D. Hirton, 1970, **The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry**, 2nd edition, Academic Press, London.
- Rahayu, K., 1989, **Enzim Mikrobial**, PAU Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta.

Rahman, A., 1992, **Teknologi Fermentasi Industrial Produksi Metabolit Primer**, Arcan, Jakarta, hal 156.

Resminingsih, E., 2005, **Amobilisasi *Bacillus subtilis* dalam Ca-alginat**, Skripsi, Kimia FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang.

Rini, D.S., 2006, “**Minimasi Limbah dalam Industri Pulp dan Paper**”, <http://www.terranet.or.id/tulisandetil.php?id=1306>, tanggal akses: 4 Januari 2007.

Roberts, J.C., 1996, **The Chemistry of Paper**, The Royal Society of Chemistry, UK.

Salma, S., dan Gunarto, L., 1999, “**Enzim Selulase dari *Trichoderma* spp.**”, http://www.indobiogen.or.id/terbitan/agrobio/abstrak/agrobio_vol2_no2_1999_Salma.php, tanggal akses: 15 Maret 2007.

Sudamadi, H., 1996, **Tumbuhan Monokotil**, PT Penebar Swadaya, Jakarta.

Suhartono, 1991, **Enzim dan Bioteknologi**, PAU Bioteknologi IPB, Bogor, hal 142-150.

Sutrisno, 1998, **Teknik Amobilisasi Enzim**, Diktat kuliah, Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang, hal 2-12.

Sutriyono, 2003, “**Kulit Pisang, Dibuang Sayang**”, artikel dalam majalah Intisari edisi November 2003, PT Gramedia, Jakarta.

Taqieddin, E., Carolin, L., Mansoor, A., 2002, **Perm-Selective Chitosan Alginate Hybrid Microcapsules for Enzyme Immobilization Technology**, The Off Journal of ISPE 22(6):1-3.

Tarmansyah, U.S., 2008, “**Pemanfaatan Serat Rami Untuk Pembuatan Selulosa**”, <http://buletinlitbang.dephan.go.id/index.asp?vnomor=18&mnurutisi=3>, tanggal akses : 13 Januari 2008.

Trisna, N.H., 2007, **Pengaruh Konsentrasi Kitosan dalam Amobilisasi Selulase *Trichoderma viride* Menggunakan Calginat-Kitosan Terhadap Aktivitas Selulase**, Skripsi, Kimia FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang, hal 13-23, 64.

Underwood, A.L., dan Day, R.A., 1993, **Analisa Kimia Kuantitatif**, edisi keempat, cetakan keempat, Alih bahasa: Iis Sopyan, Penerbit Erlangga, Jakarta, hal 394.

Vogel, A.L., 1994, **A Textbook of Macro and Semimicro Qualitative Inorganic Analysis**, 4th edition, Longmans Green and Co. Ltd, London, hal 214-242.

Waluyo, L., 2005, **Mikrobiologi Umum**, UMM Press, Malang.

Wang, N.S., 1996, **“Enzyme Immobilization Protocol Entrapment in Alginate Gel”**, <http://www.glue.umd.edu/~NSW/ench485/lab7b.htm>, tanggal akses : 5 Juni 2007.

Wayan, 2007, **“Manfaat Kulit Pisang”**, http://www.lokankubo.multiply.com/journal/item/40/manfaat_kulit_pisang, tanggal akses : 13 Januari 2008.

Wong, D.W.S., 1995, **Food Enzyme Structure and Mechanism**, Chapman & Hall, New York, hal 104-107.

Worsfold, P.J., 1995, **Classification and Chemical Characteristic of Immobilized Enzymes**, Pure and Applied.Chem, 67 (4): 59.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. Preparasi Larutan

L.1.1. Pembuatan Pereaksi Nelson

Pereaksi Nelson terdiri dari campuran pereaksi Nelson A dan pereaksi Nelson B dengan perbandingan 25:1.

Pereaksi Nelson A : dilarutkan 2,5000 gram KNa-tartrat; 2,5000 gram Na_2CO_3 anhidrat; 2,0000 gram NaHCO_3 , dan 20,0000 gram Na_2SO_4 anhidrat ke dalam 50 mL akuades, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

Pereaksi Nelson B : dilarutkan 7,5000 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 50 mL akuades, kemudian ditambahkan 1 tetes (0,05 mL) H_2SO_4 pekat dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas.

L.1.2. Pembuatan Pereaksi Arsenomolibdat

Dilarutkan 25,0000 gram ammonium molibdat ke dalam 450 mL akuades, ditambahkan 25 mL H_2SO_4 pekat. Dilarutkan pada wadah yang lain 3,0000 gram $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ke dalam 25 mL akuades, kemudian larutan ini dituangkan ke dalam larutan pertama dan disimpan dalam botol berwarna gelap lalu diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam.

L.1.3. Pembuatan Larutan H_2SO_4 0,5 M (1 N)

H_2SO_4 98% (v/v), $\rho = 1,8 \text{ kg/L}$; BM $\text{H}_2\text{SO}_4 = 98 \text{ g/mol}$

Dalam 1 L larutan, berat $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1,8 \text{ kg} = 1800 \text{ g}$

$$\begin{aligned}\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 98\%} &= \frac{98}{100} \times 1800 \text{ g} \\ &= \frac{98 \times 18 \text{ g}}{\text{BM (98g / mol)}} = 18 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\frac{\text{mol ekivalen}}{\text{volume (L)}} = N, \text{ mol ekivalen } \text{H}_2\text{SO}_4 = \text{mol } \text{H}_2\text{SO}_4 \times \Sigma \text{H}^+$$

$$\text{mol ekivalen } \text{H}_2\text{SO}_4 = 18 \text{ mol} \times 2 = 36 \text{ mol ekivalen}$$

$$36 \text{ mol ekivalen} = 36 \text{ N} = 18 \text{ M}$$

$$\text{Larutan } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 1 N} = \text{Larutan } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 0,5 M}$$

Untuk membuat konsentrasi 0,5 M, maka dilakukan pengenceran dengan rumus sebagai berikut :

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

$$V_1 \times 18 = 250 \times 0,5$$

$$V_1 = 6,94 \text{ mL}$$

Diambil 6,94 mL H_2SO_4 98%, kemudian diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 250 mL hingga tanda batas.

L.1.4. Pembuatan Air Bebas Reduktor

Akuades ditambah dengan 6 tetes KMnO_4 0,1 N kemudian didistilasi hingga diperoleh air bebas reduktor.

L.1.5. Pembuatan Larutan Stok Glukosa 1000 mg/L

Ditimbang 0,1000 g glukosa anhidrat, dilarutkan dalam akuades dalam gelas beaker, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.6. Pembuatan Larutan Baku Glukosa

Dipipet sebanyak 10,00 mL larutan stok glukosa 1000 mg/L dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan baku glukosa 100 mg/L. Kemudian diambil berturut-turut 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; dan 5,0 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas, hingga diperoleh larutan baku glukosa dengan konsentrasi 0, 10, 20, 30, 40, dan 50 mg/L.

L.1.7. Pembuatan Larutan Na-alginat 3% (w/v)

Ditimbang sebanyak 3,0000 gram Na-alginat dan dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas beaker 100 mL, kemudian dipanaskan dalam penangas air hingga semua larut homogen. Setelah larutan dingin, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.8. Pembuatan Larutan Kitosan 2% (w/v)

Ditimbang sebanyak 2,0000 gram polimer kitosan dan dilarutkan dalam 100 mL asam asetat 0,1 M sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*.

L.1.9. Pembuatan Larutan Natrium Tripolifosfat 3% (w/v)

Ditimbang sebanyak 3,0000 gram natrium tripolifosfat dan dilarutkan dalam 50 mL akuades, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.10. Pembuatan CMC-mineral (Rahayu, 1989):

Ditimbang sebanyak 6 gram NaNO_3 ; 2 gram KH_2PO_4 ; 1 gram KCl ; 0,02 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 gram bacto pepton ; dan 10 gram CMC, kemudian ditambah dengan 2 mL Tween-80. Semua bahan dicampur dan dilarutkan dengan akuades hingga volume 1000 mL.

L.1.11. Pembuatan Pereaksi Biuret

Ditimbang sebanyak 0,1500 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 0,6000 gram KNa-tartrat , kemudian dilarutkan dengan akuades, kemudian ditambah dengan larutan NaOH 10 %, dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.12. Pembuatan Larutan Stok Bovin Serum Albumin (BSA)

Ditimbang 1,0000 gram BSA, dilarutkan dengan 50 mL akuades, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas, sehingga didapatkan larutan stok BSA 10.000 ppm

L.1.13. Pembuatan Larutan BSA standar

Dipipet larutan stok BSA 10.000 ppm masing-masing sebanyak 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 mL ke dalam labu ukur 10 mL yang berbeda, kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan BSA standar 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, dan 9000 ppm.

L.1.14. Pembuatan Larutan Kasein 5000 ppm

Ditimbang 0,5000 gram kasein, kemudian dilarutkan dengan NaOH 10 %, dan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.15. Pembuatan Larutan CaCl_2 0,15 M

BM CaCl_2 = 147 g/mol. Larutan CaCl_2 dibuat sebanyak 100 mL.

$$\begin{aligned}\text{mol } \text{CaCl}_2 &= [\text{CaCl}_2] \times V \text{ larutan} \\ &= 0,15 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,015 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{g } \text{CaCl}_2 &= \text{mol } \text{CaCl}_2 \times \text{BM } \text{CaCl}_2 \\ &= 0,015 \text{ mol} \times 147 \text{ g/mol} \\ &= 2,205 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan CaCl_2 0,15 M sebanyak 100 mL, mula-mula ditimbang sebanyak 2,205 gram CaCl_2 , dilarutkan dalam 50 mL akuades, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.16. Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,2 M

Asam asetat 0,2 M dibuat dari asam asetat glasial 100% ($B_j = 1,05 \text{ g/mL}$; $\text{BM} = 60 \text{ g/mol}$), dengan cara:

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

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

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 17,5 &= 250 \times 0,2 \\ V_1 &= 2,86 \text{ mL}\end{aligned}$$

Diambil 2,86 mL asam asetat dengan pipet ukur 5 mL, kemudian diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 250 mL hingga tanda batas.

L.1.17. Pembuatan Larutan Na-asetat 0,2 M

Ditimbang 1,6400 gram Na-asetat dan dilarutkan dalam 50 mL akuades, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.18. Pembuatan Larutan H_2SO_4 72%

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 98\% &= 10 \times 72\% \\ V_1 &= 7,35 \text{ mL} \end{aligned}$$

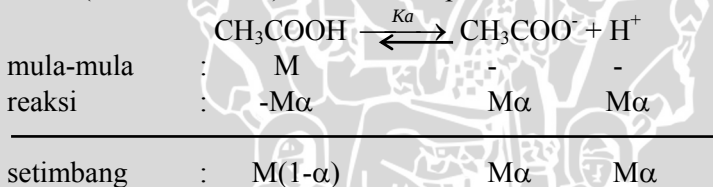
Diambil 7,35 mL H_2SO_4 98%, kemudian diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL hingga tanda batas.

L.1.19. Pembuatan Pereaksi Biuret

Ditimbang 0,1500 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 0,6000 gram KNa-tartrat ($\text{KNaC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dan dilarutkan dengan akuades, kemudian ditambahkan 1 mL larutan NaOH 10%, dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.20. Perhitungan Harga pH Buffer Asetat 0,2 M

Untuk mendapatkan larutan buffer dengan pH yang diharapkan, dilakukan pencampuran larutan asam asetat dan larutan natrium asetat (L.1.3 dan L.1.4), berdasarkan persamaan:



Untuk elektrolit lemah, harga derajat ionisasi (α) adalah kecil dan mendekati nol, sehingga $1-\alpha$ dianggap = 1, yang berarti $M(1-\alpha) = M$, sehingga persamaan dapat dituliskan dalam:

$$K_a = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$
$$[\text{H}^+] = K_a \cdot \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}$$
$$-\log [\text{H}^+] = -\log K_a - \log \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}$$

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

Misalkan untuk membuat larutan buffer asetat pH 4, maka 50 mL larutan asam asetat ditambah dengan 9,1 mL larutan Na-asetat dengan perhitungan sebagai berikut :

($\text{pK}_a \text{ CH}_3\text{COOH} = 4,74$)

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

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

$$4 = 4,74 + \log \frac{V}{50}$$

$$v = 9,099 \text{ mL}$$

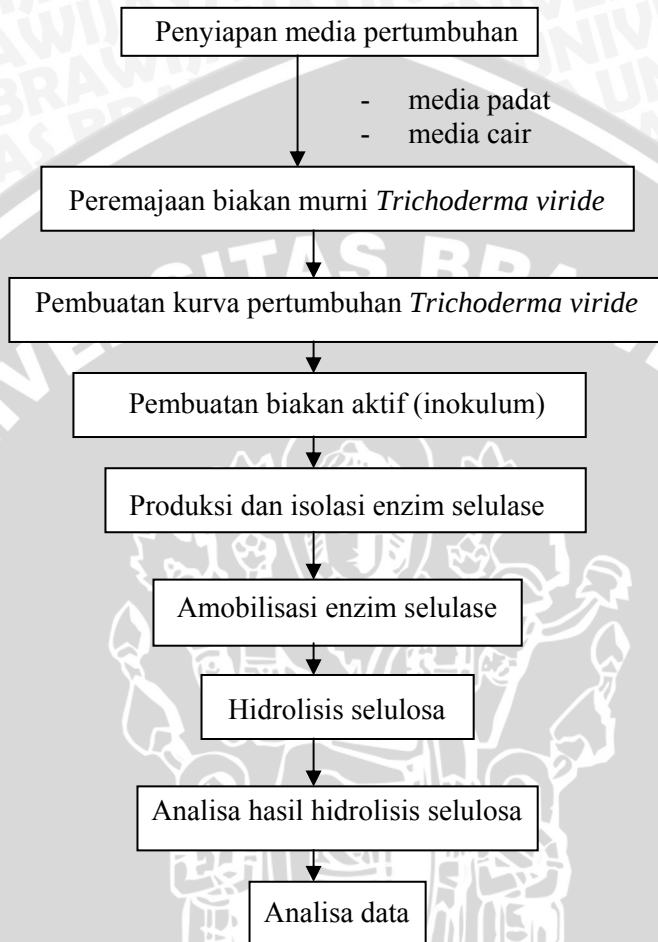
Tabel L.1.1. Volume larutan yang digunakan untuk membuat larutan buffer asetat

pH buffer	Volume larutan (mL)	
	Asam asetat	Na-asetat
4,0	50	9,1
4,5	25	14,4
5,0	10	18,2
5,5	10	57,5
6,0	5	91

LAMPIRAN 2. Diagram Alir Penelitian

Analisa kadar selulosa dalam kulit pisang



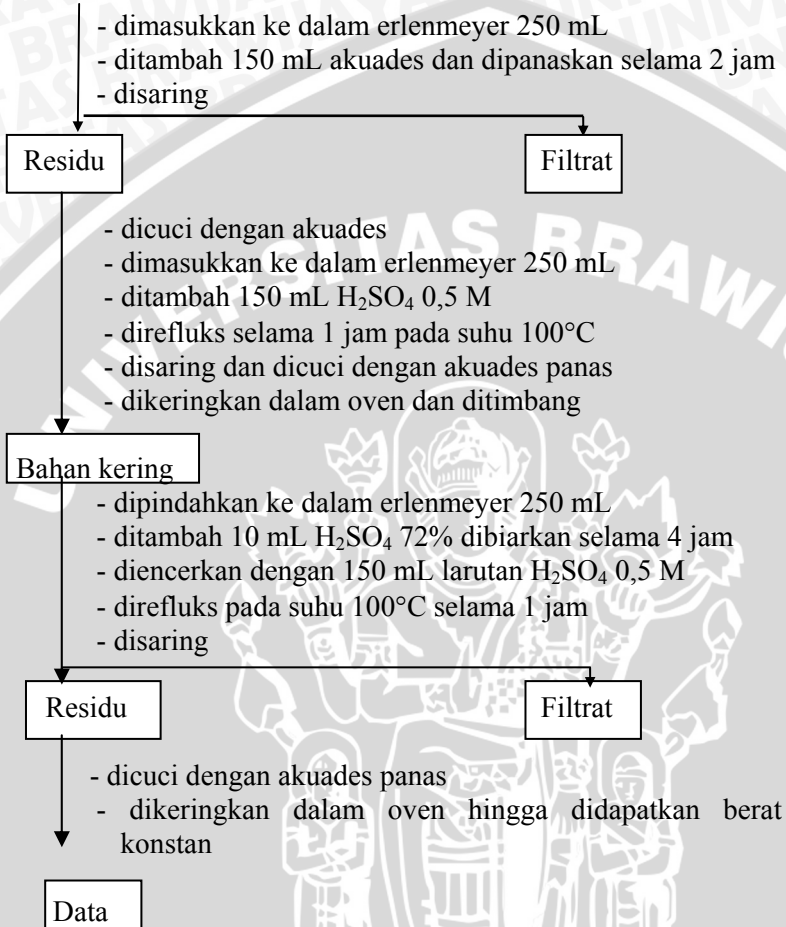


LAMPIRAN 3. Metodologi Penelitian

L.3.1. Analisa Kadar Selulosa dalam Kulit Pisang



2,16 gram kulit pisang



L.3.2. Penyiapan Media Pertumbuhan

L.3.2.1. Media Padat

20 gram kentang

- dikupas, dibersihkan dan dipotong kecil-kecil
- dimasukkan ke dalam gelas beaker 500 mL
- ditambah 100 mL akuades
- dididihkan selama 1 jam
- disaring

Filtrat

Residu

- ditambah 2 gram dekstrosa
- ditambah 1,5 gram agarose
- dididihkan hingga semua larut
- dipipet 5 mL ke dalam tabung reaksi
- ditutup dengan kapas
- disterilkan dalam autoklaf suhu 121°C, tekanan 15 psi
- diletakkan dalam posisi miring
- dibiarkan memadat selama 24 jam

Media padat

L.3.2.2. Media cair

800 mL CMC-mineral 1%

- dimasukkan ke dalam gelas beaker 1 L
- diatur pH larutan hingga mencapai pH 5
- ditambah 1 mL buffer asetat pH 5
- diaduk dan dipanaskan hingga mendidih
- ditutup dengan aluminium foil
- disterilkan dalam autoklaf suhu 121°C, tekanan 15 psi
- dibiarkan dingin

Media cair

L.3.3. Peremajaan Biakan Murni *Trichoderma viride*

Kultur murni *Trichoderma viride*

- dipindahkan secara aseptis ke dalam media padat

- ditutup mulut tabung reaksi dengan kapas steril
- diinkubasi selama 4 hari pada suhu 30°C dalam inkubator

Hasil biakan

L.3.4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride*

Spora biakan *Trichoderma viride*

- disuspensikan ke dalam 10 mL akuades steril
- diambil masing-masing sebanyak 0,1 mL
- ditanam dalam 24 erlenmeyer masing-masing berisi 10 mL media cair steril
- diinkubasi di atas *shaker* pada temperatur kamar selama 0-100 jam
- ditimbang berat kering sel pada masing-masing interval

Kurva pertumbuhan *Trichoderma viride*

L.3.5. Pembuatan Biakan Aktif (Inokulum)

Kapang *Trichoderma viride* dari media padat

- disuspensikan ke dalam 10 mL akuades steril

Suspensi

- dipipet 2 mL
- ditanam dalam 3 erlenmeyer masing-masing berisi 10 mL media cair steril
- diinkubasi di atas *shaker* pada suhu ruang sampai mencapai fase logaritma

Larutan inokulum

L.3.6. Produksi Enzim Selulase

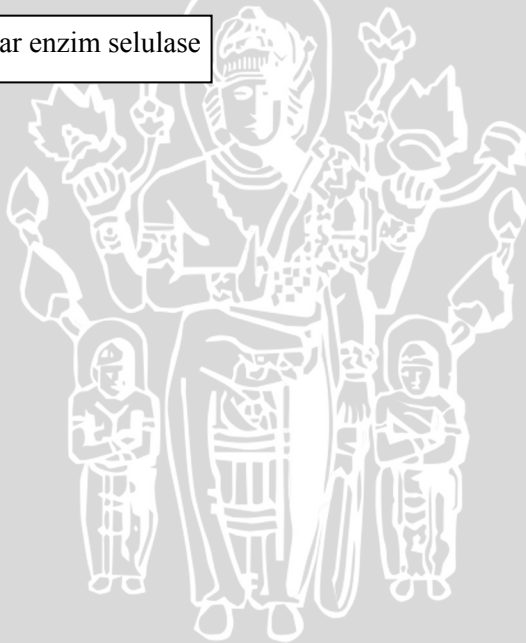
300 mL media cair

- dimasukkan ke dalam 3 erlenmeyer 250 mL, masing-masing berisi 100 mL
- disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 psi
- ditambah 10 mL inokulum secara aseptis
- diinkubasi di atas *shaker* pada suhu kamar hingga mencapai fase awal stasioner

Hasil inkubasi

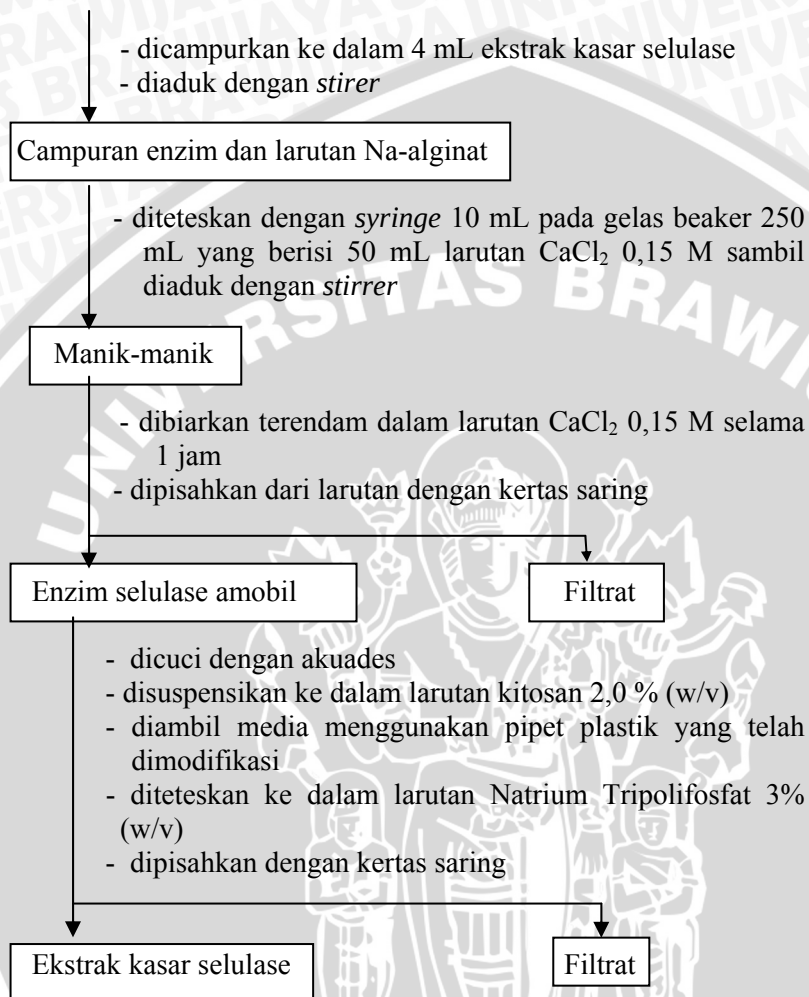
- ditambah 10 mL buffer asetat pH 5
- disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C

Ekstrak kasar enzim selulase



L.3.7. Amobilisasi Enzim Selulase dengan Matriks Ca-alginat-Kitosan

20 mL larutan Na-alginat 3% (w/v)



L.3.8. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Glukosa

1 mL larutan baku glukosa 30 ppm

- ditambah dengan 1 mL pereaksi Nelson
- dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 20 menit
- didinginkan hingga suhu tabung mencapai 25°C
- ditambah 1 mL pereaksi Arsenomolibdat
- dikocok hingga homogen
- dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas
- diukur serapannya pada interval panjang gelombang 400-800 nm dengan air bebas reduktor ditambah pereaksi sebagai blanko

Panjang gelombang maksimum

L.3.9. Pembuatan Kurva Baku Larutan Glukosa Standar

1 mL larutan glukosa (0, 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm)

- ditambah 1 mL pereaksi Nelson
- dipanaskan di atas penangas air selama 20 menit
- didinginkan hingga suhu tabung mencapai 25°C
- ditambah 1 mL pereaksi Arsenomolibdat
- dikocok hingga homogen
- dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas
- diukur serapannya pada panjang gelombang 746,5 nm dengan air bebas reduktor ditambah pereaksi sebagai blanko

Kurva standar

L.3.10. Pengukuran Kadar Glukosa dengan Metode Nelson-Somogyi

1 mL larutan uji

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambah dengan 1 mL air bebas reduktor
- ditambah 1 mL pereaksi Nelson
- ditutup dengan aluminium foil
- dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 20 menit
- didinginkan pada suhu kamar

Campuran

- ditambah 1 mL pereaksi Arsenomolibdat
- dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan air bebas reduktor hingga tanda batas
- ditentukan serapannya pada panjang gelombang 746,5 nm dengan blanko larutan yang dibuat sama dengan pembuatan larutan sampel, namun aktivitas enzim dimatikan dengan melakukan pemanasan

Data

L.3.11. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Selulase Amobil

L.3.11.1. Penentuan pH Optimum



1 mL substrat kulit pisang 3%

- dipipet ke dalam tabung reaksi
- diinkubasi di atas penangas air pada suhu 50°C selama 15 menit
- ditambah 0,5 g enzim selulase amobil
- ditambah 1 mL larutan buffer asetat pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; dan 6,0
- diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit
- dihentikan proses hidrolisis dengan memasukkan tabung ke dalam penangas air mendidih selama 15 menit
- didinginkan dalam air es hingga suhu tabung mencapai suhu kamar
- dipipet 1 mL dan diencerkan sampai 10 mL
- dilakukan uji kadar gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi

Data

L.3.11.2. Penentuan Suhu Optimum

0,5 gram selulase amobil

- ditentukan suhu optimumnya pada pH optimum dan waktu inkubasi 30 menit dengan mengukur aktivitasnya pada variasi suhu 45°C; 50°C; 55°C; 60°C; dan 65°C

Data

L.3.11.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

0,5 gram enzim selulase amobil

- ditentukan waktu inkubasi optimumnya pada pH dan suhu optimum dengan mengukur aktivitasnya pada variasi waktu inkubasi 10, 15, 20, 25, dan 30 menit

Data

L.3.12. Penentuan Kadar Protein Selulase

2 mL larutan ekstrak kasar selulase

- ditambah 2 mL larutan kasein 5000 ppm
- ditambah 8 mL pereaksi Biuret
- dikocok dan didiamkan 30 menit
- diukur absorbansinya pada λ 550 nm
- diplotkan pada kurva standar BSA

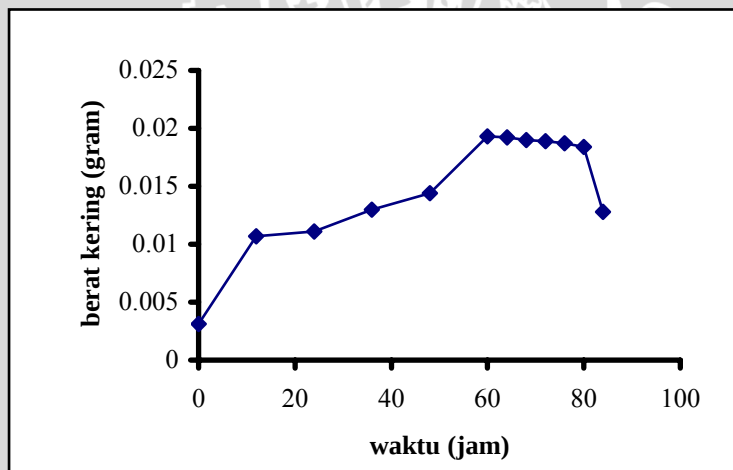
Hasil



LAMPIRAN 4. Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride*

Tabel L.4.1. Data Berat Kering Sel dalam Berbagai Waktu

Waktu (jam ke-)	Berat Kering Sel		
	(I)	(II)	Rata-rata
0	0,0026	0,0036	0,0031
12	0,0106	0,0108	0,0107
24	0,0109	0,0112	0,0111
36	0,0139	0,0121	0,0130
48	0,0157	0,0131	0,0144
60	0,0194	0,0192	0,0193
64	0,0193	0,0190	0,0192
68	0,0192	0,0188	0,0190
72	0,0190	0,0187	0,0189
76	0,0186	0,0187	0,0187
80	0,0183	0,0184	0,0184
84	0,0126	0,013	0,0128

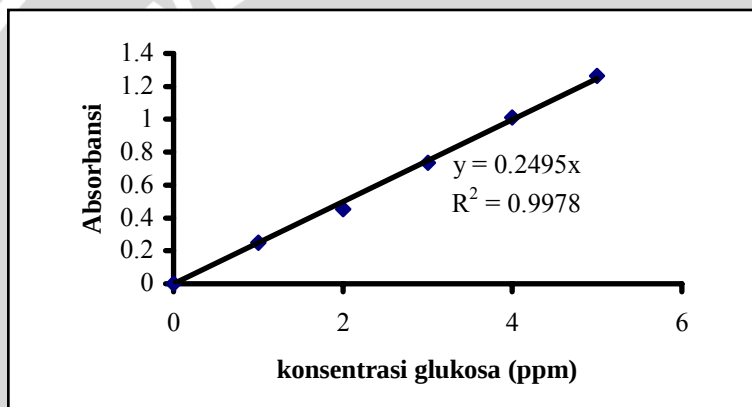


Gambar L.4.1. Kurva Pertumbuhan *Trichoderma viride*

LAMPIRAN 5. Kurva Baku Larutan Glukosa

Tabel L.5.1. Data Absorbansi Larutan Glukosa ($\lambda = 746,5 \text{ nm}$)

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		
	A1	A2	Rata-rata
0	0	0	0
10	0,272	0,226	0,249
20	0,474	0,436	0,455
30	0,759	0,713	0,736
40	1,033	0,987	1,010
50	1,306	1,220	1,263

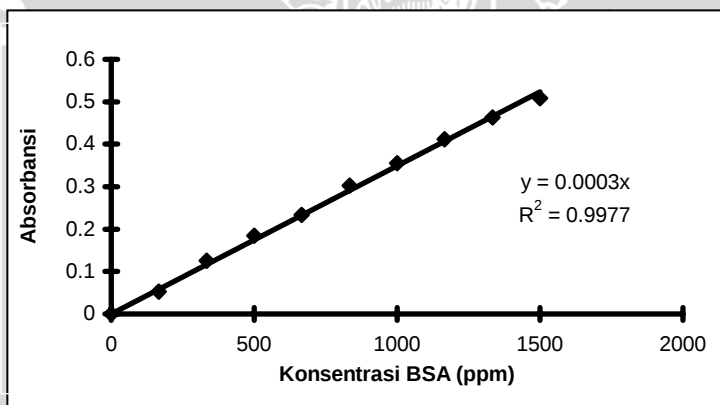


Gambar L.5.1. Kurva Baku Serapan Larutan Glukosa

LAMPIRAN 6. Kurva Baku Bovin Serum Albumin (BSA)

Tabel L.6.1. Data Absorbansi Larutan BSA ($\lambda = 550 \text{ nm}$)

[BSA] (ppm)	Absorbansi			
	(1)	(2)	(3)	Rata-rata
0	0	0	0	0
166,667	0,055	0,051	0,052	0,053
333,333	0,125	0,124	0,125	0,125
500,000	0,187	0,180	0,1875	0,184
666,667	0,237	0,229	0,233	0,233
833,333	0,301	0,301	0,303	0,302
1000,000	0,356	0,356	0,354	0,355
1166,667	0,415	0,409	0,413	0,412
1333,333	0,469	0,456	0,464	0,463
1500,000	0,509	0,506	0,508	0,508



Gambar L.6.1. Kurva Baku Bovin Serum Albumin (BSA)

Dalam penelitian ini, digunakan larutan kasein 5000 ppm sebagai pengganti larutan BSA dengan mempertimbangkan hasil konversi absorbansi larutan kasein 5000 ppm setelah pengenceran, terhadap

kurva baku BSA, yang memiliki kadar yang sama dengan larutan BSA 5000 ppm setelah pengenceran, yaitu 833,333 ppm.

Diketahui persamaan regresi BSA : $y = 3.10^{-4} x$

Volume kasein yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan Biuret yang ditambahkan = 8 mL

Volume buffer asetat yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

Dari hasil pengukuran, diperoleh absorbansi larutan kasein yaitu sebesar 0,250. Maka perhitungan kadar larutan kasein dengan mengkonversikannya pada kurva baku BSA adalah :

$$y = 3.10^{-4} x$$

$$0,250 = 3.10^{-4} x$$

$$x = 833,333 \text{ ppm}$$

Kadar larutan kasein 5000 ppm setelah pengenceran sebanding dengan kadar larutan BSA 5000 ppm setelah pengenceran yaitu sebesar 833,333 ppm. Maka untuk seterusnya digunakan larutan kasein 5000 ppm (Trisna, 2007).

LAMPIRAN 7. Penentuan Jumlah Ekstrak Kasar Selulase

L.7.1. Jumlah Ekstrak Kasar Selulase Sebelum Amobilisasi

L.7.1.1. Kadar Protein Ekstrak Kasar Selulase Sebelum Amobilisasi

Kadar protein ekstrak kasar selulase sebelum amobilisasi ditentukan melalui konversi nilai absorbansi ekstrak kasar selulase pada kurva baku Bovin Serum Albumin (BSA).

Diketahui persamaan regresi BSA : $y = 3 \cdot 10^{-4} x$

Volume enzim yang digunakan untuk penentuan mL = 2

Volume larutan standar kasein 5000 ppm yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$2 \text{ mL} \times 5000 \text{ ppm} = 12 \text{ mL} \times C_2$$

$$C_2 = 833,333 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total = konsentrasi protein enzim + konsentrasi kasein
(833,333 ppm)

Contoh perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,423 adalah:

$$y = 3 \cdot 10^{-4} x$$

$$0,423 = 3 \cdot 10^{-4} x$$

$$x = 1410 \text{ ppm}$$

maka konsentrasi enzim = konsentrasi total - konsentrasi kasein

$$= 1410 \text{ ppm} - 833,333 \text{ ppm}$$

$$= 576,667 \text{ ppm}$$

$$= 0,577 \text{ mg/mL}$$

$$\text{sehingga kadar protein} = 0,577 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} = 3,462 \text{ mg/mL}$$

Tabel L.7.1. Kadar Protein ekstrak kasar selulase

Protein	Absorbansi			[Protein] (mg/mL)			
	1	2	3	1	2	3	Rata-rata
Ekstrak kasar selulase	0,423	0,431	0,422	3,462	3,620	3,440	3,507

L.7.1.2. Penentuan Jumlah Ekstrak Kasar Selulase Sebelum Amobilisasi

Diketahui bahwa jumlah enzim bebas sebelum amobilisasi adalah 3,507 mg/mL ekstrak kasar selulase, sehingga jumlah ekstrak kasar selulase sebelum amobilisasi dapat ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

$$W = 3,507 \text{ mg/mL} \times V \text{ mL ekstrak kasar selulase}$$

di mana:

V = volume ekstrak kasar selulase yang dicuplik = 5 mL

W = jumlah ekstrak kasar selulase sebelum amobilisasi (mg)

Maka jumlah ekstrak kasar selulase sebelum amobilisasi adalah:

$$W = 3,507 \text{ mg/mL} \times 5 \text{ mL} = 17,535 \text{ mg}$$

L.7.2. Jumlah Ekstrak Kasar Selulase Setelah Amobilisasi dalam Ca-alginat-Kitosan

Jumlah ekstrak kasar selulase setelah amobilisasi ditentukan dengan cara mengkonversikan nilai absorbansi ekstrak kasar selulase yang tidak terjebak dengan persamaan regresi BSA.

Diketahui persamaan regresi BSA: $y = 3.10^{-4} x$

Volume filtrat 1 = 19,1 mL
(setelah amobilisasi dalam Ca-alginat)

Volume filtrat 2 = 13,0 mL
(setelah amobilisasi dalam Ca-alginat dan kitosan)

Volume filtrat yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan standar kasein _{5000 ppm} yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

Maka perhitungan jumlah ekstrak kasar selulase setelah dilakukan amobilisasi, dimana absorbansi larutan yang terukur = 0,268 adalah:

$$\begin{aligned} y &= 3.10^{-4} x \\ 0,268 &= 3.10^{-4} x \\ x &= 893,333 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Konsentrasi total = konsentrasi protein enzim + konsentrasi kasein
(833,333 ppm)

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi total - konsentrasi kasein

$$\begin{aligned}
 &= 893,333 \text{ ppm} - 833,333 \text{ ppm} \\
 &= 60 \text{ ppm} \\
 &= 0,06 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

Diketahui volume filtrat setelah amobilisasi dalam Ca-alginat adalah 19,1 mL, sehingga jumlah ekstrak kasar selulase setelah amobilisasi

$$= 0,06 \text{ mg/mL} \times \frac{12 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 19,1 \text{ mL} = 6,876 \text{ mg}$$

Tabel L.7.2. Jumlah ekstrak kasar selulase yang terlepas setelah amobilisasi

Amobilisasi dalam	Absorbansi			Jumlah ekstrak kasar selulase (mg)			
	1	2	3	1	2	3	Rata-rata
Ca-alginat	0,268	0,273	0,271	6,876	8,786	8,022	7,895
Ca-alginat-kitosan	0,258	0,257	0,261	2,080	1,820	2,860	2,253

L.7.3. Penentuan Jumlah Ekstrak Kasar Selulase yang Terjebak dalam Ca-alginat-Kitosan

$$W \text{ terjebak} = W \text{ dalam Ca-alginat} - W \text{ yang terlepas}$$

di mana:

W dalam Ca-alginat = jumlah ekstrak kasar selulase dalam Ca-alginat (mg)

= jumlah ekstrak kasar selulase bebas - jumlah ekstrak kasar selulase yang terlepas dari Ca-alginat (mg)

W yang terlepas = jumlah ekstrak kasar selulase yang terlepas setelah amobilisasi dalam Ca-alginat-Kitosan (mg)

Tabel L.7.3. Jumlah Ekstrak Kasar Selulase yang Terjebak dalam Matriks Pengamobil

Jumlah ekstrak kasar selulase sebelum amobilisasi (mg)	Jumlah ekstrak kasar selulase yang terjebak dalam Ca-alginat (mg)			Jumlah ekstrak kasar selulase yang terjebak dalam Ca-alginat-Kitosan (mg)			
	1	2	3	1	2	3	Rata-rata
17,535	10,659	8,749	9,513	8,579	6,929	6,653	7,387

Jumlah ekstrak kasar selulase yang terjebak dalam setiap gram manik-manik (Ca-alginat-Kitosan + ekstrak kasar selulase) dapat ditentukan melalui rumus:

$$\text{jumlah} = \frac{W \text{ terjebak}}{W \text{ manik - manik}}$$

di mana:

W terjebak = jumlah ekstrak kasar selulase yang terjebak dalam Ca-alginat-Kitosan (mg)

W manik-manik = berat manik-manik (Ca-alginat-Kitosan + ekstrak kasar selulase) setelah amobilisasi (gram)

sehingga, jumlah ekstrak kasar selulase yang terjebak dalam setiap gram manik-manik (Ca-alginat-Kitosan + ekstrak kasar selulase) dengan berat total manik-manik yang terbentuk = 16,2950 gram adalah:

$$\text{jumlah} = \frac{7,387 \text{ mg}}{16,2950 \text{ g}} = 0,453 \text{ mg/g}$$

Berat manik-manik (Ca-alginat-Kitosan + ekstrak kasar selulase) yang digunakan dalam pengukuran aktivitas adalah 0,5 gram, sehingga jumlah ekstrak kasar selulase dalam 0,5 gram manik adalah:

$$\text{jumlah} = 0,5\text{g} \times 0,453 \text{ mg/g} = 0,2265 \text{ mg}$$

LAMPIRAN 8. Data Pengukuran Serapan Glukosa dari Berbagai Perlakuan

Tabel L.8.1. Pengaruh pH terhadap Serapan Glukosa

pH	Serapan			
	(I)	(II)	(III)	Rata-rata
4,0	0,107	0,121	0,118	0,115
4,5	0,137	0,142	0,139	0,139
5,0	0,183	0,180	0,182	0,182
5,5	0,198	0,208	0,204	0,203
6,0	0,159	0,162	0,164	0,162

Tabel L.8.2. Pengaruh Suhu terhadap Serapan Glukosa

suhu (°C)	Serapan			
	(I)	(II)	(III)	Rata-rata
45	0,149	0,152	0,158	0,153
50	0,180	0,184	0,185	0,183
55	0,190	0,198	0,192	0,193
60	0,197	0,217	0,205	0,206
65	0,189	0,193	0,195	0,192

Tabel L.8.3. Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Serapan Glukosa

waktu (menit)	Serapan			
	(I)	(II)	(III)	Rata-rata
10	0,055	0,075	0,063	0,064
15	0,130	0,132	0,134	0,132
20	0,119	0,116	0,120	0,118
25	0,096	0,088	0,093	0,092
30	0,079	0,083	0,081	0,081

Keterangan : bilangan yang tercetak tebal menunjukkan absorbsi maksimum larutan glukosa

LAMPIRAN 9. Perhitungan Kadar Glukosa Sampel

Kadar glukosa sampel yang dihasilkan dari berbagai variasi perlakuan (pH, suhu, dan waktu inkubasi) dinyatakan dalam mg/L. Perhitungan kadar glukosa ini didasarkan pada hasil serapan glukosa

sampel yang diplotkan pada persamaan kurva baku $y = 0,2495 x$ dan dikalikan dengan faktor pengenceran (fp), di mana:

y = serapan

x = konsentrasi/ kadar glukosa yang dihitung

fp = faktor pengenceran (100 kali)

Contoh:

Serapan glukosa pada pH optimum = 0,203 ; fp = 100 kali

$$y = 0,2495 x$$

$$0,203 = 0,2495 x$$

$$x = 0,81363 \cdot fp$$

$$x = 0,81363 \cdot 100$$

$$x = 81,363 \text{ mg/L}$$

Dengan cara perhitungan yang sama, akan diperoleh kadar glukosa sampel secara keseluruhan.



LAMPIRAN 10. Data Kadar Glukosa Hasil Konversi oleh Enzim Selulase Amobil dari Berbagai Perlakuan

Tabel L.10.1. Pengaruh pH terhadap Kadar Glukosa

pH	Kadar glukosa (mg/L)			
	(I)	(II)	(III)	Rata-rata
4,0	42,886	48,497	47,295	46,092
4,5	54,910	56,914	55,711	55,711
5,0	73,347	72,144	72,946	72,946
5,5	79,359	83,367	81,764	81,363
6,0	63,727	64,930	65,731	64,930

Tabel L.10.2. Pengaruh Suhu terhadap Kadar Glukosa

suhu (°C)	Kadar glukosa (mg/L)			
	(I)	(II)	(III)	Rata-rata
45	59,719	60,922	63,327	61,323
50	72,144	73,747	74,148	73,347
55	76,152	79,359	76,954	77,355
60	78,958	86,974	82,164	82,565
65	75,752	77,355	78,156	77,088

Tabel L.10.3. Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Kadar Glukosa

waktu (menit)	Kadar glukosa (mg/L)			
	(I)	(II)	(III)	Rata-rata
10	22,044	30,060	25,251	25,651
15	52,104	52,906	53,707	52,906
20	47,695	46,493	48,096	47,295
25	38,477	35,271	37,275	36,874
30	31,663	33,267	32,465	32,465

LAMPIRAN 11. Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase Amobil

Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan Unit. Satu Unit aktivitas enzim amobil adalah banyaknya μmol glukosa yang terbentuk oleh 1 miligram enzim amobil setiap 1 menit. Kadar glukosa ($\mu\text{g/mL}$) dapat

ditentukan dari kurva baku dengan persamaan regresi $y = 0,2495 x$, sedangkan pengukuran aktivitas enzim selulase amobil dapat dihitung melalui persamaan :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{konsentrasi glukosa}}{\text{BM}} \times \frac{V}{p \cdot q} \times fp$$

di mana: V = volume total sampel dalam tiap tabung (mL)
 p = jumlah enzim selulase amobil (mg)
 q = waktu reaksi (menit)
 fp = faktor pengenceran (100 kali)
 BM = Berat Molekul glukosa ($180 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$)

Contoh Perhitungan:

Pengukuran aktivitas enzim selulase amobil pada pH 4,0:

Absorbansi = 0,107
 p = 0,2265 mg
 V = volume substrat + volume buffer asetat
 = 1 mL + 1 mL = 2 mL
 q = 30 menit
 fp = 100 kali

Karena $y = 0,2495 x$, maka : $0,107 = 0,2495 x$
 $x = 0,4289 \mu\text{g}/\text{mL}$

$$\text{AE} = \frac{0,4289 (\mu\text{g} / \text{mL})}{180 (\mu\text{g} / \mu\text{mol})} \times \frac{2 \text{ mL}}{0,2265 \text{ mg} \cdot 30 \text{ menit}} \times 100$$

AE = 0,070 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ menit

AE = 0,070 Unit

Dengan cara perhitungan yang sama, akan diperoleh aktivitas enzim selulase amobil secara keseluruhan.

LAMPIRAN 12. Data Aktivitas Enzim Selulase Amobil dari Berbagai Perlakuan

Tabel L.12.1 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Selulase Amobil

pH	Aktivitas Enzim Amobil (unit)
----	-------------------------------

	(I)	(II)	(III)	Rata-rata
4,0	0,070	0,079	0,077	0,075
4,5	0,089	0,093	0,091	0,091
5,0	0,119	0,118	0,119	0,119
5,5	0,129	0,136	0,134	0,133
6,0	0,104	0,106	0,107	0,106

Tabel L.12.2 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Selulase Amobil

suhu (°C)	Aktivitas Enzim Amobil (unit)			
	(I)	(II)	(III)	Rata-rata
45	0,098	0,099	0,104	0,100
50	0,118	0,121	0,121	0,119
55	0,125	0,129	0,126	0,127
60	0,129	0,142	0,134	0,135
65	0,124	0,126	0,128	0,126

Tabel L.12.3 Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Selulase Amobil

waktu (menit)	Aktivitas Enzim Amobil (unit)			
	(I)	(II)	(III)	Rata-rata
10	0,108	0,147	0,124	0,126
15	0,170	0,173	0,176	0,173
20	0,117	0,114	0,118	0,116
25	0,076	0,069	0,073	0,073
30	0,052	0,054	0,053	0,053

Keterangan : bilangan yang tercetak tebal menunjukkan aktivitas maksimum enzim selulase amobil.

LAMPIRAN 13. Perhitungan Kadar Selulosa dalam Kulit Pisang

W kulit pisang awal = 2,1648 gram

W bahan kering = 1,5830 gram

W kulit pisang akhir = 0,9082 gram

Perhitungan kadar selulosa (prosedur 3.4.1.2) adalah:

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar selulosa} &= \frac{W \text{ bahan kering} - W \text{ akhir}}{W \text{ awal}} \times 100\% \\
 &= \frac{1,5830 - 0,9082 \text{ gram}}{2,1648 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 31,17 \%
 \end{aligned}$$

Pada kondisi optimum selulase amobil (pH 5,5; suhu 60°C; waktu inkubasi 15 menit), didapatkan kadar glukosa sebesar 52,906 mg/L dari 2 mL larutan uji yang terdiri dari 1 mL substrat kulit pisang 3 % dan 1 mL buffer, yang mengandung arti bahwa dalam 1 mL substrat mengandung 30 mg kulit pisang. Dari hasil ini, maka persentase selulosa yang terkonversi menjadi glukosa dapat dihitung melalui rumus :

$$\% \text{ konversi} = \frac{W \text{ glukosa}}{W \text{ kulit pisang} \times \text{kadar selulosa}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ konversi} = \frac{2 \cdot 10^{-3} \times 52,91 \text{ mg}}{30 \text{ mg} \times 31,17 \%} \times 100 \%$$

$$\% \text{ konversi} = 1,132 \%$$

LAMPIRAN 14. Analisa Statistika

Data aktivitas enzim selulase amobil dianalisa dengan menggunakan pola Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang menghasilkan data sebagai berikut :

Tabel L.14.1. Penentuan F_{hitung} pada Variasi Perlakuan pH

Ulangan	Aktivitas Selulase Amobil pada pH
---------	-----------------------------------

	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
I	0,070	0,089	0,119	0,129	0,104
II	0,079	0,093	0,118	0,136	0,106
III	0,077	0,091	0,119	0,134	0,107
Jumlah	0,226	0,273	0,356	0,399	0,317
Rataan	0,075	0,091	0,119	0,133	0,106

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap aktivitas enzim selulase amobil, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{2,468041}{15} = 0,165$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. JK_{Total} (JKT)

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

$$JKT = [0,070^2 + \dots + 0,107^2] - 0,165 = 5,761 \cdot 10^{-3}$$

b. $JK_{\text{Perlakuan}}$ (JKP)

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

$$JKP = \frac{[(0,226)^2 + \dots + (0,317)^2]}{3} - 0,165$$

$$JKP = 5,677 \cdot 10^{-3}$$

c. $JK_{\text{Galat Percobaan}}$ (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 5,761 \cdot 10^{-3} - 5,677 \cdot 10^{-3} = 8,4 \cdot 10^{-5}$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$a. \quad K_{T\text{Perlakuan}} = \frac{JKP}{db \text{ perlakuan}} = \frac{5,677.10^{-3}}{4} = 1,419.10^{-3}$$

$$b. \quad K_{T\text{Galat Percobaan}} = \frac{JKG}{db \text{ percobaan}} = \frac{8,4.10^{-5}}{10} = 8,4.10^{-6}$$

4. Menghitung Nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{1,419.10^{-3}}{8,4.10^{-6}} = 168,929$$

$$5. \quad F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05;4,10) = 3,48$$

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$, maka H_0 ditolak, yang artinya variasi pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim selulase amobil. Untuk mengetahui variasi pH mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim amobil, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$

$$BNT_{5\%} = t_{(\alpha/2; dB)} \times (2 \text{ KTG}/n)^{0,5}$$

$$BNT_{5\%} = t_{(0,025;10)} \times (2 \times 8,4.10^{-6}/3)^{0,5}$$

$$BNT_{5\%} = 2,228 \times 2,366.10^{-3} = 5,27.10^{-3}$$

Tabel L.14.2. Analisis Varian pada Variasi pH

$$FK = 0,165$$

$$BNT_{5\%} = 5,27.10^{-3}$$

Sumber varian	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	$5,677.10^{-3}$	$1,419.10^{-3}$	168,929	3,48
Galat Percobaan	10	$8,4.10^{-5}$	$8,4.10^{-6}$		
Total	14	$5,761.10^{-3}$			

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari kelima variasi pH yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut :

Tabel L.14.3. Uji BNT 5% pada Variasi pH

pH	Rataan	4,0	4,5	6,0	5,0	5,5
		0,075	0,091	0,106	0,119	0,133
4,0	0,075	0	0,016*	0,031*	0,044*	0,058*
4,5	0,091		0	0,015*	0,028*	0,042*

6,0	0,106			0	0,013*	0,027*
5,0	0,119				0	0,014*
5,5	0,133					0

Keterangan : * = berbeda nyata dengan uji BNT 5% ($\alpha=0,05$)

Tabel L.14.4. Penentuan F_{hitung} pada Variasi Perlakuan Suhu

Ulangan	Aktivitas Selulase Amobil pada Suhu				
	45	50	55	60	65
I	0,098	0,118	0,125	0,129	0,124
II	0,099	0,121	0,129	0,142	0,126
III	0,104	0,121	0,126	0,134	0,128
Jumlah	0,301	0,360	0,380	0,405	0,378
Rataan	0,100	0,119	0,127	0,135	0,126

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap aktivitas enzim selulase amobil, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{3,326976}{15} = 0,222$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. JK_{Total} (JKT)

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

$$JKT = [(0,098)^2 + \dots + (0,128)^2] - 0,222$$

$$JKT = 1,966 \cdot 10^{-3}$$

b. $JK_{Perlakuan}$ (JKP)

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

$$JKP = \frac{[(0,301)^2 + \dots + (0,378)^2]}{3} - 0,222$$

$$JKP = 1,837.10^{-3}$$

c. $JK_{\text{Galat Percobaan}} (JKG)$

$$JKG = JKT - JKP$$

$$JKG = 1,966.10^{-3} - 1,837.10^{-3} = 1,29.10^{-4}$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

a. $KT_{\text{Perlakuan}}$

$$KTP = \frac{JKP}{db \text{ perlakuan}} = \frac{1,837.10^{-3}}{4} = 4,593.10^{-4}$$

b. $KT_{\text{Galat Percobaan}}$

$$KTG = \frac{JKG}{db \text{ percobaan}} = \frac{1,29.10^{-4}}{10} = 1,29.10^{-5}$$

4. Menghitung Nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{4,593.10^{-4}}{1,29.10^{-5}} = 35,605$$

5. $F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05;4,10) = 3,48$

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$, maka H_0 ditolak, yang artinya variasi suhu berpengaruh terhadap aktivitas enzim selulase amobil. Untuk mengetahui variasi suhu mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim amobil, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$

$$BNT_{5\%} = t_{(\alpha/2;db)} \times (2 KTG/n)^{0,5}$$

$$BNT_{5\%} = t_{(0,025;10)} \times (2 \times 1,29.10^{-5}/3)^{0,5}$$

$$BNT_{5\%} = 2,228 \times 2,933.10^{-3} = 6,535.10^{-3}$$

Tabel L.14.5. Analisis Varian pada Variasi Suhu

$$FK = 0,222$$

$$BNT_{5\%} = 6,535.10^{-3}$$

Sumber varian	dB	JK	KT	F hitung	F tabel 5%
Perlakuan	4	$1,837.10^{-3}$	$4,593.10^{-4}$	35,605	3,48

Galat Percobaan	10	$1,29.10^{-4}$	$1,29.10^{-5}$
Total	14	$1,966.10^{-3}$	

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-ran dari kelima variasi suhu yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut :

Tabel L.14.6. Uji BNT 5% pada Variasi Suhu

suhu	Rataan	45	50	65	55	60
		0,100	0,119	0,126	0,127	0,135
45	0,100	0	0,019*	0,026*	0,027*	0,035*
50	0,119		0	0,007*	0,008*	0,016*
65	0,126			0	0,001	0,009*
55	0,127				0	0,008*
60	0,135					0

Keterangan : * = berbeda nyata dengan uji BNT 5% ($\alpha=0,05$)

Tabel L.14.7. Penentuan F_{hitung} pada Variasi Perlakuan Waktu Inkubasi

Ulangan	Aktivitas Selulase Amobil pada Waktu				
	10	15	20	25	30
I	0,108	0,170	0,117	0,076	0,052
II	0,147	0,173	0,114	0,069	0,054
III	0,124	0,176	0,118	0,073	0,053
Jumlah	0,379	0,519	0,349	0,218	0,159
Rataan	0,126	0,173	0,116	0,073	0,053

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap aktivitas enzim selulase amobil, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n \cdot p} = \frac{2,637376}{15} = 0,176$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

a. $JK_{\text{Total}} (JKT)$

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

$$JKT = [(0,108)^2 + \dots + (0,053)^2] - 0,176 = 0,0274$$

b. $JK_{\text{Perlakuan}} (JKP)$

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

$$JKP = \frac{[(0,379)^2 + \dots + (0,159)^2]}{3} - 0,176$$

$$JKP = 0,0265$$

c. $JK_{\text{Galat Percobaan}} (JKG)$

$$JKG = JKT - JKP = 0,0274 - 0,0265 = 9.10^{-4}$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$a. \quad KT_{\text{Perlakuan}} = \frac{JKP}{db \text{ perlakuan}} = \frac{0,0265}{4} = 6,625.10^{-3}$$

$$b. \quad KT_{\text{Galat Percobaan}} = \frac{JKG}{db \text{ percobaan}} = \frac{9.10^{-4}}{10} = 9.10^{-5}$$

4. Menghitung Nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{6,625.10^{-3}}{9.10^{-5}} = 73,611$$

5. $F_{\text{tabel } 5\%} = F(0,05;4,10) = 3,48$

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$, maka H_0 ditolak, yang artinya variasi waktu inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas enzim selulase amobil. Untuk mengetahui variasi waktu inkubasi mana saja yang

berpengaruh terhadap aktivitas enzim amobil, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$

$$\text{BNT}_{5\%} = t_{(\alpha/2; \text{dB})} \times (2 \text{ KTG/n})^{0,5}$$

$$\text{BNT}_{5\%} = t_{(0,025; 10)} \times (2 \times 9.10^{-5}/3)^{0,5}$$

$$\text{BNT}_{5\%} = 2,228 \times 7,746.10^{-3} = 1,726.10^{-2}$$

Tabel L.14.8. Analisis Varian pada Variasi Waktu Inkubasi
FK = 0,176 BNT_{5%} = 1,726.10⁻²

Sumber varian	dB	JK	KT	F hitung	F tabel 5%
Perlakuan	4	0,0265	$6,625.10^{-3}$	73,611	3,48
Galat	10	9.10^{-4}	9.10^{-5}		
Percobaan					
Total	14	0,0274			

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari kelima variasi waktu inkubasi yang disusun dari nilai terkecil sampai nilai terbesar sebagai berikut :

Tabel L.14.9. Uji BNT 5% pada Variasi Waktu Inkubasi

Waktu	Rataan	30	25	20	10	15
		0,044	0,060	0,096	0,104	0,144
30	0,044	0	0,016*	0,052*	0,060*	0,100*
25	0,060		0	0,036*	0,044*	0,084*
20	0,096			0	0,008	0,048*
10	0,104				0	0,040*
15	0,144					0

Keterangan : * = berbeda nyata dengan uji BNT 5% ($\alpha=0,05$)