



**STUDI KINETIKA REAKSI ENZIMATIS ENDO- $\beta$ -1,4-D-XILANASE  
TERHADAP SUBSTRAT XILAN AMPAS SINGKONG**

**SKRIPSI**

Oleh

**Melia Dwi Rahmawati**

**101810301052**

**JURUSAN KIMIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2016**



**STUDI KINETIKA REAKSI ENZIMATIS ENDO- $\beta$ -1,4-D-XILANASE  
TERHADAP SUBSTRAT XILAN AMPAS SINGKONG**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Melia Dwi Rahmawati**  
**NIM 101810301052**

**JURUSAN KIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2016**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada :

1. Ibunda Eny Winarti, Ayahanda Djoko Sumedi, Yiyin Eka Wulandari serta Alfian Chandra Yuhda Prasetya tercinta atas do'a, dukungan dan motivasi yang diberikan selama ini
2. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi
3. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

**MOTTO**

Sesungguhnya beserta kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai maka tegaklah.

(terjemahan Surat Al-Insyirah ayat 6-7)\*

Cukuplah Allah menjadi penolong bagi kami dan Dia sebaik-baiknya pelindung.

(terjemahan Surat Ali Imran 173)\*

Apabila anda berbuat kebaikan kepada orang lain, maka anda telah berbuat baik terhadap diri sendiri.

(Passing time in the loo 185)\*\*

---

\*) Departemen Agama Proyek Pengadaan Kitab Suci Al-Qur'an 1975. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Jakarta: PT. Bumi Restu.

\*\*\*) Compact Classics 1999. *Passing time in the loo* . Amerika Serikat

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Melia Dwi Rahmawati

NIM : 101810301052

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul "*Studi Kinetika Reaksi enzimatis Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase Terhadap Substrat Xilan Ampas Singkong*" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari ini tidak benar.

Jember, 8 Juni 2016

Yang menyatakan,



Melia Dwi Rahmawati  
101810301052

**SKRIPSI**

**STUDI KINETIKA REAKSI ENZIMATIS ENDO- $\beta$ -1,4-D-XILANASE  
TERHADAP SUBSTRAT XILAN AMPAS SINGKONG**

Oleh

**Melia Dwi Rahmawati**

**NIM 101810301052**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : drh. Wuryanti Handayani M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “*Studi Kinetika Reaksi Enzimatis Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase Terhadap Substrat Xilan Ampas Singkong*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

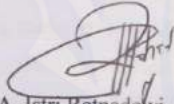
hari : JUM' AT

tanggal: 17 JUN 2016

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji

Ketua (DPU),



Dr. A.A. Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si  
NIP. 197012251997022001

Sekretaris (DPA),



drh. Wuryanti Handayani, M.Si.  
NIP. 196008221985032002

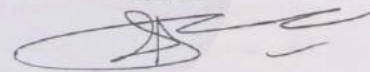
Anggota Tim Penguji

Penguji I,



Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si  
NIP. 197104301998031003

Penguji II,



Dr. D. Setiawan Purwohandoko, S.Si., M.Si  
NIP. 196808021994021001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Jember



Drs. Sujito, Ph.D  
NIP. 196102041987111001

## RINGKASAN

**Studi Kinetika Reaksi Enzimatis Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase Terhadap Substrat Xilan Ampas Singkong;** Melia Dwi Rahmawati, 101810301052; 2016; 58 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Enzim adalah biomolekul berupa protein yang diproduksi sel hidup, berfungsi untuk mengkatalisis reaksi kimia secara spesifik. Laju reaksi dari suatu enzim dapat diukur dengan cara mengetahui reaksi kinetika enzimatis serta faktor-faktor yang mempengaruhi seperti suhu, pH, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi. Enzim xilanase yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida dan xilosa. Enzim xilanase terdiri atas beberapa jenis enzim yang memiliki fungsi berbeda-beda, salah satunya enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase menghidrolisis ikatan glikosida dengan posisi  $\beta$ -1,4 pada rantai xilan untuk menghasilkan xilooligosakarida. Xilan banyak terkandung dalam umbi-umbian seperti tanaman singkong. Kandungan hemiselulosa pada tanaman singkong yang diperoleh peneliti sebelumnya sebesar 21.8% dan rendemen xilan sebesar 32.14%. Pemanfaatan ampas singkong yang mengandung xilan dapat ditingkatkan dengan memproduksi xilooligosakarida secara enzimatis menggunakan enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Oleh karena itu diperlukan aktivitas tertinggi dari enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase untuk menghidrolisis xilan ampas singkong menjadi xilooligoskarida (gula reduksi). Aktifitas enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase sangat berhubungan dengan kinetika enzim. Kinetika enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase yang dilakukan pada penelitian ini ditinjau dari pengaruh konsentrasi substrat xilan ampas singkong terhadap kondisi optimumnya.

Penelitian ini diawali dengan memproduksi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase dan purifikasi. Aktivitas spesifik dari enzim diketahui dengan menggunakan metode Miller dan Bradford. Aktivitas spesifik diketahui dengan menentukan konsentrasi optimum dari variasi konsentrasi substrat xilan ampas singkong dan enzim endo- $\beta$ -1,4-D-



xilanase dalam memproduksi gula reduksi yang optimal. Komponen penyusun xilooligosakarida yang diperoleh diuji menggunakan Kromatografi Lapis tipis (KLT). Penentuan nilai  $K_M$  dan  $V_{MAX}$  dari reaksi enzim dilakukan setelah konsentrasi optimum substrat diketahui.

Hasil yang diperoleh dari purifikasi menunjukkan bahwa aktifitas spesifik meningkat seiring dengan meningkatnya kemurnian enzim. Selanjutnya berdasarkan hasil variasi konsentrasi substrat xilan ampas singkong dan enzim diperoleh total gula reduksi optimum pada konsentrasi 1.1% dengan konsentrasi enzim 11.812U/ml. Komponen xilooligosakarida yang terbentuk dapat terlihat dari terbentuknya noda-noda pada plat KLT. Berdasarkan kromatogram diketahui bahwa hidrolisis xilan 1.1% dengan aktivitas endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase sebesar 11.812U/ml menghasilkan xilooligosakarida jenis X3, X4, dan X5. Nilai nilai  $V_{MAX}$  dan  $K_M$  diperoleh dari hasil perhitungan menggunakan gabungan persamaan Michaelis-Menten dan Lineweaver-Burk terhadap data pengukuran. Persamaan linier  $y = 0.0007x + 0.1718$  diperoleh menunjukkan nilai  $V_{MAX}$  sebesar 5.8207 ppm/jam dengan nilai  $K_M$  sebesar 0.00407%. Nilai  $K_M$  yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase berinteraksi kuat oleh substrat xilan ampas singkong. Dengan mengetahui nilai  $K_M$  dan  $V_{MAX}$  suatu enzim maka dapat dilakukan optimalisasi penggunaan enzim tersebut sebagai biokatalisator reaksi pemecahan substrat menjadi produk.

## PRAKATA

Puji syukur Alhamdulillah ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Studi Kinetika Reaksi Enzimatis Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase Terhadap Substrat Xilan Ampas Singkong”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Drs. Sujito, Ph.D selaku Dekan Fakultas MIPA Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Pluharto, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Kepala Laboratorium Kimia Fisik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
4. Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si. dan drh. Wuryanti Handayani, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Anggota, Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si. dan Dr. Dontus Setiawan Purwohandoko, S.Si., M.Si. selaku penguji I dan penguji II;
5. Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi dalam penyelesaian studi di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
6. Dosen-dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember umumnya serta Dosen-dosen Jurusan Kimia khususnya yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan;
7. Teknisi-teknisi laboratorium Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;

8. Tante Ve, Nadya, Arya dan seluruh anggota keluarga yang selalu memberikan semangat selama penulis menyelesaikan masa studi.
9. Rekan kerja penelitian: Siti Nur Afida, Dewanti Oktaviana K, Fita Kurnia Firdausa, Okky Santi dan Wardatul Baedho yang selalu memberikan semangat untuk terselesaikannya penelitian dengan baik.
10. Teman-teman Rumpi 2010 tanpa terkecuali yang selalu memberikan semangat sehingga studi penulis terselesaikan dengan baik, khususnya sahabat-sahabatku, Lena, Maya, Rani , Cinde, Umi, Anita, Dany dan Dede.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Besar harapan penulis, semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk semua pihak. Amin.

Jember, Juni 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	ii
HALAMAN MOTTO .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN .....	vi
RINGKASAN .....	vii
PRAKATA .....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Batasan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Tujuan Penelitian.....</b>	<b>3</b>
<b>1.5 Manfaat.....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Enzim .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Kinetika reaksi enzimatis.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Endo-<math>\beta</math>-1,4-D-Xilanase .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4 Xilan .....</b>	<b>10</b>
<b>2.5 Ampas singkong .....</b>	<b>11</b>
<b>2.6 Xilooligosakarida .....</b>	<b>12</b>
<b>2.7 Gula reduksi .....</b>	<b>13</b>

2.8 Kromatografi Lapis Tipis.....	13
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>16</b>
3.1 Tempat dan waktu penelitian .....	16
3.2 Alat penelitian .....	16
3.3 Bahan penelitian.....	17
3.4 Diagram alir .....	18
3.5 Persiapan media, <i>buffer</i> dan reagen .....	19
3.5.1 Pembuatan media LB padat.....	19
3.5.2 Pembuatan media inokulum cair .....	19
3.5.3 Pembuatan reagen Miller .....	20
3.5.4 Pembuatan reagen Bradford .....	20
3.5.5 Pembuatan larutan substrat <i>xilan oat</i> .....	20
3.5.6 Pembuatan larutan stok xilosa.....	20
3.5.7 Pembuatan larutan <i>buffer</i> fosfat-sitrat .....	20
3.7 Peremajaan bakteri pensекреksi enzim endo- $\beta$ -1,4-D <i>xilanase</i> .....	21
3.7 Produksi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	21
3.8 Isolasi ekstrak kasar enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	21
3.9 Pemurnian enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase.....	21
3.9.1 Fraksinasi ammonium sulfat .....	21
3.9.2 Dialisis.....	22
3.10 Penentuan aktifitas enzim.....	22
3.10.1 Kurva standart xilosa.....	22
3.10.2 Pengujian enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	23
3.10.1 Perhitungan aktifitas .....	23
3.11 Penentuan kadar protein (Crude, Hasil fraksinasi dan dialisat) .....	24
3.11.1 Kurva standart BSA .....	24
3.11.2 Perhitungan kadar protein enzim endo- $\beta$ -1,4-D-	

Xilanase .....	24
3.11.1 Perhitungan aktifitas spesifik .....	24
<b>3.12 Optimasi konsentrasi substrat xilan ampas singkong dan produk hidrolisat .....</b>	<b>25</b>
<b>3.13 Optimasi konsentrasi enzim endo-<math>\beta</math>-1,4-D-Xilanase dan deteksi produk pemurnian hidrolisat.....</b>	<b>25</b>
<b>3.14 Kinetika reaksi enzimatik endo-<math>\beta</math>-1,4-D-Xilanase terhadap substrat xilan ampas singkong .....</b>	<b>26</b>
<b>3.15 Deteksi produk hidrolisis .....</b>	<b>26</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Endo-<math>\beta</math>-1,4-D-Xilanase dari <i>Bacillus sp</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Aktifitas spesifik enzim endo-<math>\beta</math>-1,4-D-Xilanase .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Xilooligosakarida produk hidrolisis endo-<math>\beta</math>-1,4-D-Xilanase dengan substrat xilan ampas singkong .....</b>	<b>33</b>
4.3.1 Produksi xilooligosakarida dengan variasi konsentrasi substrat xilan ampas singkong .....	33
4.3.2 Produksi xilooligosakarida dengan variasi konsentrasi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	36
4.3.3 Kinetika reaksi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase terhadap substrat xilan ampas singkong .....	38
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>41</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>42</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>47</b>

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Mekanisme kerja enzim .....	4
2.2 Pengaruh konsentrasi substrat pada laju aktifitas enzim .....	7
2.3 Grafik hubungan antara $1/V$ dengan $[S]$ .....	9
2.4 Struktur xilan dan lokasi pemotongan okeh enzim endo-xilanase .....	11
2.5 Struktur dasar xilooligosakarida .....	13
3.1 Diagram alir .....	18
4.1 Koloni bakteri tumbuh pada media LB padat .....	28
4.2 Koloni bakteri tumbuh pada media cair .....	29
4.3 Koloni bakteri tumbuh pada media produksi .....	30
4.4 Reaksi antara perubahan warna pada uji aktifitas enzim .....	30
4.5 Pengaruh variasi konsentrasi substrat xilan ampas singkong terhadap total gula reduksi .....	34
4.6 Reaksi visualisasi kromatogram .....	34
4.7 Kromatogram konsentrasi optimum substrat xilan ampas singkong .....	35
4.8 Pengaruh variasi konsentrasi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase terhadap substrat xilan ampas singkong .....	36
4.9 Kromatogram konsentrasi optimum enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	37
4.10 Hubungan konsentrasi substrat dengan total gula reduksi .....	38
4.11 Grafik hubungan $1/V_0$ dengan $1/[S]$ berdasarkan persamaan Lieneweaver -Burk .....	39

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Kandungan nutrisi ampas singkong .....	12
2.2 Fase diam untuk kromatografi lapis tipis .....	15
4.1 Data aktifitas enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase .....	31



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran A. Kurva Hasil Penelitian.....	47
A.1. Kurva standar xilosa dibaca pada panjang gelombang 550 nm ..	47
A.2 Kurva standar BSA .....	48
Lampiran B. Fraksinasi Amonium Sulfat .....	49
B.1 Perhitungan penambahan amonium sulfat (fraksinasi seri) .....	49
B.2 Optimasi konsentrasi amonium sulfat .....	49
B.3 Data hasil fraksinasi .....	50
B.4 Data fraksinasi seri dengan pengukuran protein .....	50
Lampiran C. Data Hasil Pengamatan .....	51
C.1. Pengukuran aktivitas endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase dengan metode Miller .....	51
A.2 Pengukuran kadar protein endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase dengan metode Bradford dan aktivitas spesifik .....	52
Lampiran D. Optimasi Variasi Konsentrasi Substrat xilan ampas singkong ....	53
Lampiran E. Optimasi Variasi Konsentrasi enzim endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase.....	56
Lampiran F. Penentuan nilai $K_M$ dan $V_{MAX}$ dari enzim terhadap substrat xilan ampas singkong.....	57
F.1 Tabel $1/[S]$ dengan $1/V_0$ .....	58
F.2 Grafik hubungan $1/[S]$ dengan $1/V_0$ .....	59
F.1 Grafik hubungan $[S]$ dengan waktu (jam) .....	60

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim adalah biomolekul berupa protein yang diproduksi dari sel hidup. Enzim tersusun atas rantai polipeptida yang berfungsi untuk mengkatalisis reaksi kimia secara spesifik. Enzim bekerja menstimulasi laju reaksi dengan cara membentuk kompleks substrat sehingga menekan energi aktivasi yang diperlukan dalam reaksi kimia. Laju reaksi dari suatu enzim dapat diukur dengan cara mengetahui reaksi kinetika enzimatis serta faktor-faktor yang mempengaruhi laju tersebut seperti suhu, pH, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi (Ngili, 2010).

Enzim xilanase bekerja dengan menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida dan xilosa. Enzim xilanase termasuk dalam golongan enzim induktif, dimana dalam pembentukannya dibutuhkan adanya rangsangan dari substrat. Reaksi hidrolisis xilan dapat dilakukan oleh beberapa enzim yang tergolong dalam enzim xilanase, dimana setiap enzim memotong rantai xilan pada daerah yang berbeda. Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase merupakan salah satu enzim yang tergolong dalam enzim xilanase. Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase menghidrolisis ikatan glikosida dengan posisi  $\beta$ -1,4 untuk menghasilkan xilooligosakarida (Richana, 2002).

Xilan merupakan sumber karbon bagi enzim xilanase. Xilan memiliki tulang punggung rantai D-xilanopiranososa dengan ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 dan memiliki jumlah monomer berkisar antara 150-200 unit. Rantai xilan bercabang dan strukturnya tidak berbentuk kristal sehingga lebih mudah dimasuki pelarut dibandingkan dengan selulosa. Xilan merupakan komponen utama hemiselulosa. Xilan banyak terkandung dalam tanaman umbi-umbian, salah satunya pada tanaman singkong. Menurut Nurdjarah (2005), ampas singkong mengandung polisakarida non pati yang komponennya terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan pektin. Kadar hemiselulosa pada ampas singkong yang diperoleh dari penelitian

Nurdjarah sebesar 21.8 % dan pada penelitian Firdausa (2015) diperoleh rendemen xilan yang sebesar 32.14%.

Penelitian ini akan mempelajari tentang kinetika enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dari isolat bakteri *Bacillus sp.* yang memiliki potensi dalam hidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida (total gula reduksi). Kandungan xilan yang tinggi pada ampas singkong dapat di manfaatkan sebagai substrat. Kinetika enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase ditinjau dari pengaruh konsentrasi substrat terhadap laju reaksi enzimatik. Analisis kuantitatif kinetika reaksi enzim dilakukan dengan asas pendekatan yaitu asas keseimbangan menurut Michaelis-menten.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan

1. Berapakah konsentrasi optimum enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dan substrat xilan ampas singkong yang dibutuhkan untuk memproduksi xilooligosakarida maksimal ?
2. Berapakah nilai  $K_M$  dan  $V_{MAX}$  dari enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase terhadap konsentrasi substrat xilan pada ampas singkong ?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini meliputi :

1. Xilan yang digunakan berasal dari ampas singkong
2. Enzim yang digunakan adalah enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase asal mikroorganisme *Bacillus sp.* dalam abdomen rayap
3. Kondisi optimum pH 5, waktu inkubasi 16 jam dan suhu 40<sup>0</sup>C

## 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui konsentrasi optimum enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dan substrat xilan dari ampas singkong yang dibutuhkan untuk memproduksi xilooligosakarida

2. Mengetahui  $K_M$  dan  $V_{MAX}$  dari enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase terhadap konsentrasi substrat xilan pada ampas singkong

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian tentang studi kinetika reaksi enzimatik endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase terhadap substrat xilan ampas singkong, diharapkan menjadi informasi penting untuk menghasilkan xilooligosakarida secara optimum terhadap substrat xilan ampas singkong.





sangat spesifik terhadap jenis substrat yang dapat berikatan dengannya (Timberlake, 2009).

Aktivitas enzim merupakan kemampuan enzim untuk mengkatalisis reaksi kimia dengan substrat. Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya :

a. Suhu

Enzim sangat sensitif dengan perubahan suhu. Pada suhu rendah, enzim akan menunjukkan aktivitas yang rendah karena tidak ada energi yang cukup untuk mengkatalis reaksi. Pada suhu tinggi, aktivitas enzim bertambah karena substrat bergerak lebih cepat sehingga menyebabkan banyak tumbukan dengan enzim. Enzim lebih aktif pada suhu optimum. Suhu optimum enzim biasanya adalah suhu tubuh.

b. Derajat Keasaman (pH)

Enzim memiliki aktivitas yang lebih tinggi pada pH optimum, yaitu pH yang dapat menjaga struktur protein tersier. pH suatu larutan merupakan banyaknya ion hidrogen ( $H^+$ ) yang ada dalam larutan. Jumlah ion hidrogen akan mempengaruhi ionisasi gugus-gugus fungsi asam amino. Jika jumlah  $H^+$  meningkat akan mengakibatkan protein cenderung dalam keadaan protonasi. Sebaliknya, jika jumlah  $H^+$  menurun dan  $OH^-$  meningkat akan mengakibatkan protein cenderung dalam keadaan deprotonasi. Adanya perubahan ionisasi pada gugus-gugus fungsi asam amino akan mempengaruhi ikatan hidrogen yang ada pada enzim sehingga menyebabkan terjadinya perubahan konformasi enzim. Perubahan konformasi enzim akan membuat aktivitas enzim terganggu, akibatnya enzim tidak dapat mengikat substrat dengan baik dan reaksi katalisis oleh enzim tidak terjadi (Nelson & Cox, 1997).

c. Konsentrasi Substrat

Substrat berikatan dengan enzim untuk membentuk kompleks enzim-substrat (ES). Ketika konsentrasi enzim konstan, penambahan konsentrasi substrat akan meningkatkan kecepatan reaksi katalisis. Tersedianya molekul enzim yang berikatan dengan substrat menyebabkan kecepatan reaksi katalisis bertambah

hingga mencapai titik maksimum. Selanjutnya penambahan kembali sejumlah substrat tidak akan meningkatkan kecepatan lebih lanjut.

d. Waktu inkubasi

Waktu inkubasi merupakan waktu yang dibutuhkan enzim untuk memecah protein menjadi protein yang larut. Enzim merupakan protein yang sensitif terhadap kerusakan akibat paparan lingkungannya. Paparan tersebut antara lain suhu, cahaya, dan bahan kimia yang berinteraksi dengan enzim. Faktor tersebut akan memberikan efek kerusakan yang berbanding lurus dengan lamanya interaksi dengan enzim. Semakin lama terkena paparan tersebut maka struktur enzim yang terdapat pada lingkungan tersebut akan semakin banyak yang rusak sehingga nilai aktivitasnya menurun.

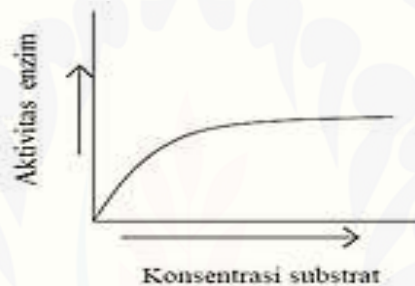
## 2.2 Kinetika reaksi enzimatis

Enzim merupakan protein yang mengkatalis reaksi biokimia secara kolektif membentuk metabolisme perantara. Laju awal ( $V_0$ ) dari reaksi yang dikatalisis enzim meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat hingga dicapai keadaan dimana penambahan substrat tidak lagi meningkatkan laju awal reaksi. Laju reaksi akan mencapai nilai maksimum ( $V_{MAX}$ ) ketika enzim dalam keadaan ES (jenuh oleh substrat). Laju reaksi bergantung pada kondisi larutan dan konsentrasi substrat. Kondisi-kondisi yang menyebabkan denaturasi protein seperti suhu tinggi, konsentrasi garam yang tinggi, dan nilai pH yang tinggi atau rendah akan menghilangkan aktivitas enzim. Sedangkan peningkatan konsentrasi substrat cenderung meningkatkan aktivitasnya. Kelajuan maksimum suatu reaksi enzimatis dapat ditentukan dengan meningkatkan konsentrasi substrat sampai laju menjadi konstan (Radzka dan Wolfenden, 1995).

Pada kelajuan yang maksimum ( $V_{MAX}$ ), semua enzim tampak aktif akan berikatan dengan substrat. Jumlah substrat yang diperlukan untuk mencapai nilai kelajuan reaksi juga penting. Hal ini diekspresikan oleh konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ), dimana  $K_M$  merupakan konsentrasi substrat yang diperlukan oleh enzim untuk mencapai setengah kelajuan maksimumnya. Setiap enzim memiliki

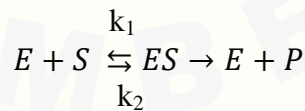
nilai  $K_M$  yang berbeda-beda untuk suatu substrat, dan ini dapat menunjukkan seberapa kuatnya peningkatan substrat ke enzim (Radzka dan Wolfenden, 1995).

Hasil eksperimen menunjukkan bahwa dengan konsentrasi enzim yang tetap, maka penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Hal ini berdasarkan hukum Michaelis-Menten yang menyatakan bahwa kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan terus meningkat dengan nilai yang semakin kecil hingga mencapai titik batas dimana enzim jenuh dengan substrat (Poedjadi, 2007). Titik batas ini disebut kecepatan maksimum ( $V_{MAX}$ ) (Lehninger, 1997).



Gambar 2.2. Pengaruh Konsentrasi substrat pada laju aktivitas enzim (Poedjadi, 2007)

Menurut Leonor Michaelis dan Maud Menten, penggabungan enzim (E) dengan substrat (S) merupakan reaksi yang dapat balik dan berlangsung relatif cepat membentuk kompleks enzim-substrat (ES). ES yang terbentuk selanjutnya terurai dan membentuk produk reaksi (P) dan enzim bebas (E) (Palmer, 1985).



Laju reaksi persamaan diatas dapat didefinisikan dalam persamaan:

$$V = k_2 [ES]$$

[ES] biasanya merupakan besaran yang tidak dapat diukur. Besaran yang dapat diukur adalah konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim total, yaitu jumlah enzim bebas dan enzim dalam kompleks ES:

$$[E]_t = [E] + [ES]$$



Pada keadaan *steady state*, laju pembentukan dan penguraian kompleks ES sama:

$$k_1 [E][S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

$$[ES] = \left( \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \right) [E][S]$$

Kemudian konstanta laju reaksi digabungkan menjadi satu konstanta, yaitu  $K_M$ :

$$K_M = \left( \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \right) \text{ sehingga dapat ditulis:}$$

$$K_M [ES] = [E][S]$$

$$K_M [ES] = [E]_t [S] - [ES] [S]$$

$$[ES] (K_M + [S]) = [E]_t [S]$$

$$[ES] = \left( \frac{[E]_t [S]}{K_M + [S]} \right) \text{ selanjutnya } V = \left( \frac{k_2 [E]_t [S]}{K_M + [S]} \right)$$

Saat laju reaksi mencapai kecepatan maksimum ( $V_{MAX}$ ), nilai  $K_M \gg [S]$ , maka :

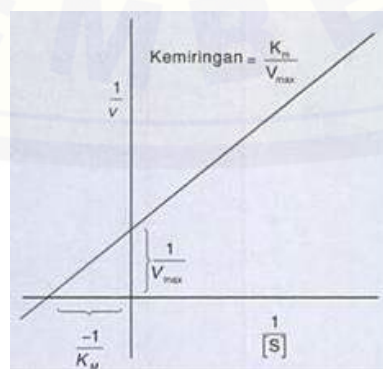
$$V_{MAX} = k_2 [E]_t$$

Akan didapat persamaan Michaelis-Menten :

$$V = \left( \frac{V_{MAX} [S]}{K_M + [S]} \right)$$

Persamaan Michaelis-Menten yaitu hubungan kuantitatif antara laju reaksi enzim dan konsentrasi substrat bila  $V_{MAX}$  dan  $K_M$  diketahui. Karena sangat sulit mencari harga  $V_{MAX}$  dan  $K_M$  secara langsung, maka persamaan tersebut harus digabung dengan metode Lineweaver-Burk yang merupakan bentuk penyederhanaan terhadap rumus Michaelis (Murray, *et al.*, 1999).

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_M}{[S]} \right)$$



Gambar 2.3. Grafik hubungan antara  $1/V$  dengan  $1/[S]$

Data untuk menghitung harga  $V_{\text{MAX}}$  dan  $K_M$  adalah dengan membuat grafik hubungan antara  $\frac{1}{v}$  dan  $\frac{1}{[S]}$  sehingga diperoleh persamaan linier,  $y = ax + b$ , dimana  $y = \frac{1}{v}$  dan  $x = \frac{1}{[S]}$ . Intersep garis (b) yang didapat dari persamaan linier adalah  $\frac{1}{V_{\text{max}}}$  dan slope (a) merupakan  $\frac{K_M}{V_{\text{max}}}$  (Suharto, 1995).

### 2.3 Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase

Enzim yang berperan dalam hidrolisis suatu karbohidrat adalah jenis enzim glikosida hidrolase (GHs). Enzim glikosida hidrolase adalah jenis enzim yang dapat menghidrolisis ikatan glikosida antara dua atau lebih karbohidrat. Selain itu enzim ini dapat pula menghidrolisis ikatan glikosida antara senyawa yang termasuk karbohidrat dan bukan karbohidrat (Universitas Marseille, 2014). Hidrolisis ikatan glikosida oleh enzim akan menghasilkan jenis gula hemiasetal atau hemiketal serta membentuk aglikon. Glikosida hidrolase dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis dari ikatan glikosida yang mengandung unsur-unsur O, N, dan S (Rye & Withers, 2000).

Enzim endo-xilanase merupakan enzim jenis hidrolase yang dapat memotong ikatan polimer xilan penyusun dinding sel tumbuhan dari bagian dalam sehingga dapat menghasilkan xilooligosakarida. Selain XO reaksi hidrolisis ini juga bisa menghasilkan unit xilosa (monomer). Xilobiosa, xilotriosa, dan xilotetrosa merupakan produk utama dari proses hidrolisis enzimatis dengan enzim endo-xilanase yang merupakan jenis oligosakarida dengan DP 2-4 (Subramanian & Prema, 2002; Wang, *et al.*, 2003).

Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase (EC 3.2.1.8,  $\beta$ -1,4-D-xilanase) dikenal sebagai xilanase, endo 1,4- $\beta$ -D-xilan hidrolase, endoxilanase,  $\beta$ -1,4-D-xilanase, dan  $\beta$ -xilanase (Collins *et al.*, 2005; Purich & Allinson, 2000). Xilanase tergolong dalam enzim glikosil hidrolase yang mengkatalisis pemutusan ikatan glikosida pada oligosakarida dan polisakarida. Beberapa bentuk dari xilanase antara lain endoxilanase dan eksoxilanase dan xilanase jenis beta memiliki peran penting pada makanan. Xilanase ditemukan di tanaman, bakteri, dan jamur dengan berat molekul berkisar 16-40 kDa. Sisi katalitik dari enzim xilanase adalah  $\text{GLU}_{78}$  dan

GLU<sub>172</sub> dengan nilai pKa antara 6.7 (enzim bebas) dan 4.2 (mengikat substrat). Enzim bakteri dihasilkan dari *Bacillus*, *Erwina*, dan *Streptomyces* spp., sedangkan enzim jamur dihasilkan dari *Trichoderma* spp. Enzim bakteri memiliki pH optimum 6.0-6.5, sedangkan enzim jamur sebagian besar aktif pada pH 3.5-6.0. Xilanase secara umum memiliki pelebaran stabilitas pH pada 3-10 dan temperatur optimum kerja enzim berkisar 40-60 °C (Fennema *et al.*, 2008).

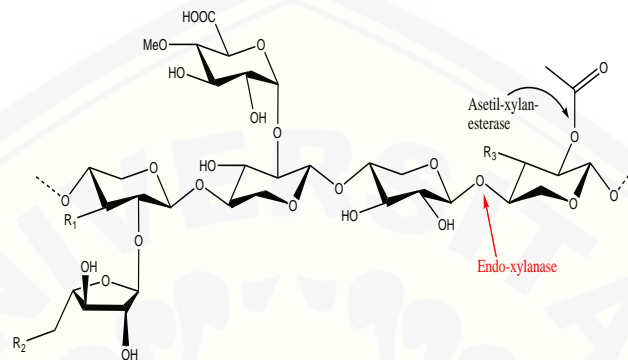
Manfaat nyata enzim xilanase yaitu berguna untuk menghidrolisis xilan menjadi gula xilosa. Gula xilosa banyak digunakan untuk konsumsi penderita diabetes yang dicampurkan pada pasta gigi. Xilanase dapat juga digunakan dalam pembuatan roti sehingga roti dapat mengembang 10% dari sebelumnya dan mampu mengontrol penyerapan air. Kegunaan lain xilanase adalah menjernihkan jus, ekstraksi kopi, ekstraksi minyak nabati dan ekstraksi pati, serta pembuatan detergen dan makanan ternak yang aman untuk pencernaan (Richana, 2002; Kapoor, *et al.*, 2001).

#### 2.4 Xilan

Hemiselulosa merupakan kompleks karbohidrat yang terdiri dari xilan, xiloglukan (heteropolimer dari D-xilosa dan D-manosa), galaktoglukomanan (heteropolimer dari D-glukosa dan D-manosa), dan arabinogalaktan (heteropolimer dari D-galaktosa dan arabinosa). Hemiselulosa juga berikatan secara kovalen dengan lignin dan selulosa membentuk struktur kompleks penyusun dinding sel tanaman (Shallom dan Shoham, 2003). Selulosa adalah penyusun terbesar dari hemiselulosa sedangkan urutan kedua ditempati oleh xilan (Verbeek, 2012).

Xilan merupakan polimer dari xilosa yang berikatan  $\beta$ -1,4glikosidik (Gambar 2.4) dengan jumlah monomer 150 hingga 200 unit. Penyusun polisakarida dialam adalah unit 4-O-metil- $\alpha$ -D-glukopiranosil, gugus asetil,  $\alpha$ -L-arabinofuranosil dan lain-lain dengan komposisi yang berbeda-beda. Secara umum, xilan dapat dikelompokkan ke dalam tiga kelas polisakarida yaitu pentosa, glikan dan hemiselulosa. Xilan dimasukkan ke dalam kelas pentosa karena pada prinsipnya xilan adalah polimer dari pentosa (xilosa). Xilan sebagai salah satu

contoh hemiselulosa terkandung di hampir semua tanaman, kebanyakan dijumpai pada tanaman-tanaman tahunan dan khususnya pada limbah-limbah pertanian seperti jerami padi, ampas tebu, tongkol jagung, dedak gandum dan biji kapas (Polizeli *et al.*, 2005; Farida, 2003; Boonchuay & Chaiyaso, 2012; Akpinar *et al.*, 2007).



Gambar 2.4. Struktur xilan dan lokasi pemotongan oleh enzim endo-xilanase (Sumber : Shallom & Shoham, 2003)

## 2.5 Ampas singkong

Hasil samping dari pabrik tepung tapioka adalah ampas singkong atau sering disebut onggok. Banyaknya onggok yang dihasilkan dari proses pembuatan tepung tapioka berkisar 5-10% dari bobot bahan bakunya dengan kadar air 20%. Limbah tersebut termasuk limbah organik yang masih banyak mengandung karbohidrat, protein, dan gula. Salah satu jenis karbohidrat yang terkandung pada ampas singkong berupa hemiselulosa. Sehingga dengan diketahuinya hal tersebut maka ampas singkong dapat dijadikan bahan baku alternatif pembuatan xilooligosakarida.

Tabel 2.1. Kandungan nutrisi Ampas singkong

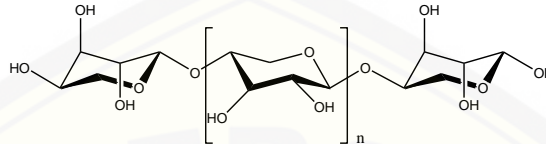
No	Parameter	Persentase (%)
1	Karbohidrat	68,0
2	Protein	1,57
3	Lemak	0,26
4	Kadar air	20,00

## 2.6 Xilooligosakarida

Menurut Dominguez et al (2003) xilooligosakarida merupakan salah satu jenis oligosakarida yang memiliki sifat kimia dan fisika yang menarik yaitu stabil pada pH tertentu dan suhu yang tinggi. Oligosakarida secara umum merupakan jenis sakarida yang mengandung antara 2-10 monomer gula. Oligosakarida dapat dikelompokkan berdasarkan sifat fisiknya menjadi oligosakarida yang tercerna dan oligosakarida yang tidak tercerna. Oligosakarida yang tidak tercerna (*Non-digestible oligosaccharides/ NDOs*) dapat bertahan dari proses pencernaan dan penyerapan dalam sistem pencernaan kecil manusia (usus halus) dengan mengalami fermentasi kompleks maupun fermentasi sebagian dalam sistem pencernaan besar manusia. Kelompok utama dari NDOs banyak digunakan dalam industri sebagai komposisi makanan yang termasuk di dalamnya adalah karbohidrat dan unit monosakarida berupa fruktosa, galaktosa, glukosa dan xilosa (Mussato & Manchilha, 2007).

Xilooligosakarida (XOs) adalah oligomer gula yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis xilan. XOs dengan Derajat Polimerisasi (DP) 2-4 memiliki karakteristik sebagai prebiotik karena dapat membantu pertumbuhan dari bakteri baik. Prebiotik merupakan bahan makanan yang tidak tercerna yang memberikan efek positif dengan merangsang pertumbuhan maupun aktivitas dari satu atau sejumlah jenis bakteri (misalnya *bifidobacteria* dan *lactobacilli*) dalam sistem pencernaan sehingga meningkatkan kesehatan organ pencernaan. Produksi XOs dapat dilakukan secara kimia maupun secara biologis. Produksi XOs secara kimia dilakukan dengan hidrolisis xilan menggunakan senyawa kimia (misalnya KOH). Sementara produksi XOs secara biologis dilakukan dengan menambahkan enzim (Tabel 2.2) untuk menghidrolisis xilan (Boonchuay & Chaiyaso, 2012). Produksi xilooligosakarida secara enzimatik harus memperhatikan kondisi optimum yang meliputi suhu, pH, waktu hidrolisis, dan spesifisitas enzim (Aachary & Prapulla, 2008; Akpinar *et al.*, 2009).

Secara umum, struktur xilooligosakarida tersusun dari unit-unit xilosa yang berjumlah 2 sampai 10 dan terhubung oleh ikatan  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 (Gambar 2.2). Struktur dan komposisi xilooligosakarida ditentukan dari sumber dan proses produksi (Nabarlatz, *et al.*, 2007). Struktur dari xilooligosakarida bervariasi pada derajat polimerisasi, unit monomer, dan tipe ikatan (Kumar *et al.*, 2012).



Gambar 2.5. Struktur dasar xilooligosakarida (Kumar *et al.*, 2012)

## 2.7 Gula Reduksi

Gula pereduksi merupakan golongan gula (karbohidrat) yang dapat mereduksi senyawa-senyawa penerima elektron, contohnya adalah glukosa dan fruktosa. Ujung dari suatu gula pereduksi adalah ujung yang mengandung gugus aldehida atau keton bebas. Struktur molekul xilosa terdapat gugus karbonil yang berada pada ujung rantai karbon, menandakan bahwa xilosa memiliki gugus aldehid bebas yang reaktif, dengan demikian xilosa tergolong gula reduksi.

Umumnya gula pereduksi yang dihasilkan berhubungan erat dengan aktifitas enzim, dimana semakin tinggi aktifitas enzim maka semakin tinggi pula gula pereduksi yang dihasilkan. Jumlah gula pereduksi yang dihasilkan selama reaksi diukur dengan menggunakan pereaksi asam dinitro salisilat (DNS) dengan spektrofotometer UV-VIS. Semakin tinggi nilai absorbansi yang dihasilkan, semakin banyak pula gula pereduksi yang terkandung.

## 2.8 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis adalah teknik kromatografi terbuka dengan fase diam yang berupa lapisan tipis dan ditempatkan pada sebuah plat. Kromatografi lapis tipis sering digunakan untuk analisa kualitatif dan semikuantitatif. Alasan utama menggunakan kromatografi lapis tipis adalah analisa dalam waktu yang singkat, penggunaan yang cukup mudah dan tidak memerlukan biaya yang mahal.

Kromatografi lapis tipis juga dapat digunakan sebagai preparasi untuk isolasi dan pemurnian.

Proses pemisahan atau identifikasi menggunakan KLT melalui penotolan campuran senyawa yang akan dipisahkan pada permukaan plat tipis lalu dielus dengan cara memasukkan plat pada chamber yang berisi fase gerak. Kekuatan interaksi yang berbeda akan menghasilkan mobilitas dan pemisahan yang berbeda. Beberapa faktor yang dapat menentukan kinerja dari kromatografi lapis tipis antara lain: luas permukaan spesifik, diameter rata-rata pori dan distribusinya, serta ukuran dan distribusi partikel. Semakin kecil ukuran partikel dan semakin sempit distribusi ukuran partikel maka akan semakin meningkatkan resolusi, menurunkan waktu analisis, dan meningkatkan sensitifitas (Rohman & Gandjar, 2007).

Secara umum pemisahan kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam berupa silika gel dan pelarut nonpolar sebagai fase gerak. Pemisahan ini dinamakan pemisahan fase normal (Ahuja, 2003). Beberapa fase diam yang sesuai untuk pemisahan senyawa ditampilkan pada Tabel 2.2. Plat tipis yang merupakan fase diam biasanya distabilkan oleh agen pengikat seperti gibs yang dicampurkan sebanyak 10 %. Fase diam dibuat dengan cara mengaduk rata campuran adsorben dengan agen pengikat yang telah ditambahkan air. Campuran yang terbentuk disebarkan secara merata pada plat. Plat dikeringkan pada oven dan disimpan di dalam desikator. Ketidakteraturan lapisan pada plat dapat menghasilkan perbedaan pola pemisahan (Holme & Peck, 1998).

Fosfor dapat ditambahkan pada saat pembuatan fase diam untuk visualisasi sampel. Ketika plat disinari lampu UV, analit akan tampak sebagai noda gelap akibat terjadinya fosforisense. Plat kromatografi biasanya diaktifkan dengan cara pemberian panas diatas 100 °C selama satu jam atau lebih. Plat yang mengandung agen pengikat organik seperti polivinil alkohol tidak perlu dipanaskan diatas 150°C. Pemanasan selain berfungsi untuk aktivasi juga dimaksudkan untuk menghilangkan air (Miller, 1988).

Xilooligosakarida jenis xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa, xilopentaosa, xiloheksosa, dan xiloheptaosa, serta sedikit xilosa yang dihasilkan oleh hidrolisis

dengan limbah berlignoselulosa berhasil diidentifikasi berdasarkan penggunaan KLT pada plat silika. Larutan pengembang yang digunakan adalah campuran etil asetat: asam asetat:air (2: 2: 1) dan divisualisasi dengan etanol:asam sulfat (18:2). Namun, larutan pengembang ini tidak mampu memisahkan antara xilobiosa, glukosa, dan arabinosa (Akpinar & Bostanci, 2009). Larutan pengembang 1-butanol:etanol:air (5: 3: 2) dan larutan visualisasi berupa anilin-difenil amin telah diaplikasikan untuk identifikasi xilooligosakarida pada plat silika. Xilobiosa, xilotreosa, xilotetraosa, dan xilopentaosa yang dihasilkan dari hidrolisis *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 dengan limbah pertanian dapat terpisah satu sama lain dan ditunjukkan adanya noda-noda ungu pada kromatogram KLT (Anad, *et al.*, 2013).

Tabel 2.2. Fase diam untuk kromatografi lapis tipis

Fase gerak	Bahan yang dipisahkan
Silika gel	Asam amino, alkaloid, gula, asam lemak, lipid, minyak esensial, anion dan kation anorganik, steroid, terpenoid
Alumina	Alkaloid, pewarna makanan, fenol, steroid, vitamin, karoten, asam amino
Kieselguhr	Gula, oligosakarida, asam dibasic, asam lemak, trigliserida, asam amino, steroid
Celite	Steroid
Tepung selulosa	Asam amino, pewarna makanan, alkaloid, nukleotida
Selulosa penukar ion	Nukleotida
Pati	Asam amino
Sephadex	Asam amino, protein

Sumber: Bintang (2010).



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium *Centre for Development of Advance Siences and Technology* (CDAST) Universitas Jember.

### 3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian diklasifikasikan menjadi peralatan gelas, peralatan bukan gelas, dan instrumen.

Peralatan gelas meliputi pembakar bunsen, pengaduk gelas, cawan petri, gelas Beker berbagai volume, tabung reaksi, tabung sentrifugasi, Erlenmeyer (150 dan 300 ml), pipet volum (2, 5, dan 10 ml), pipet Mohr (1, 2, dan 5 ml), pipet tetes, botol bening, botol gelap, labu ukur (10 ml, 100 ml, 250 ml dan 1L), gelas ukur (10, 25, dan 50 ml), corong gelas, dan *chamber*.

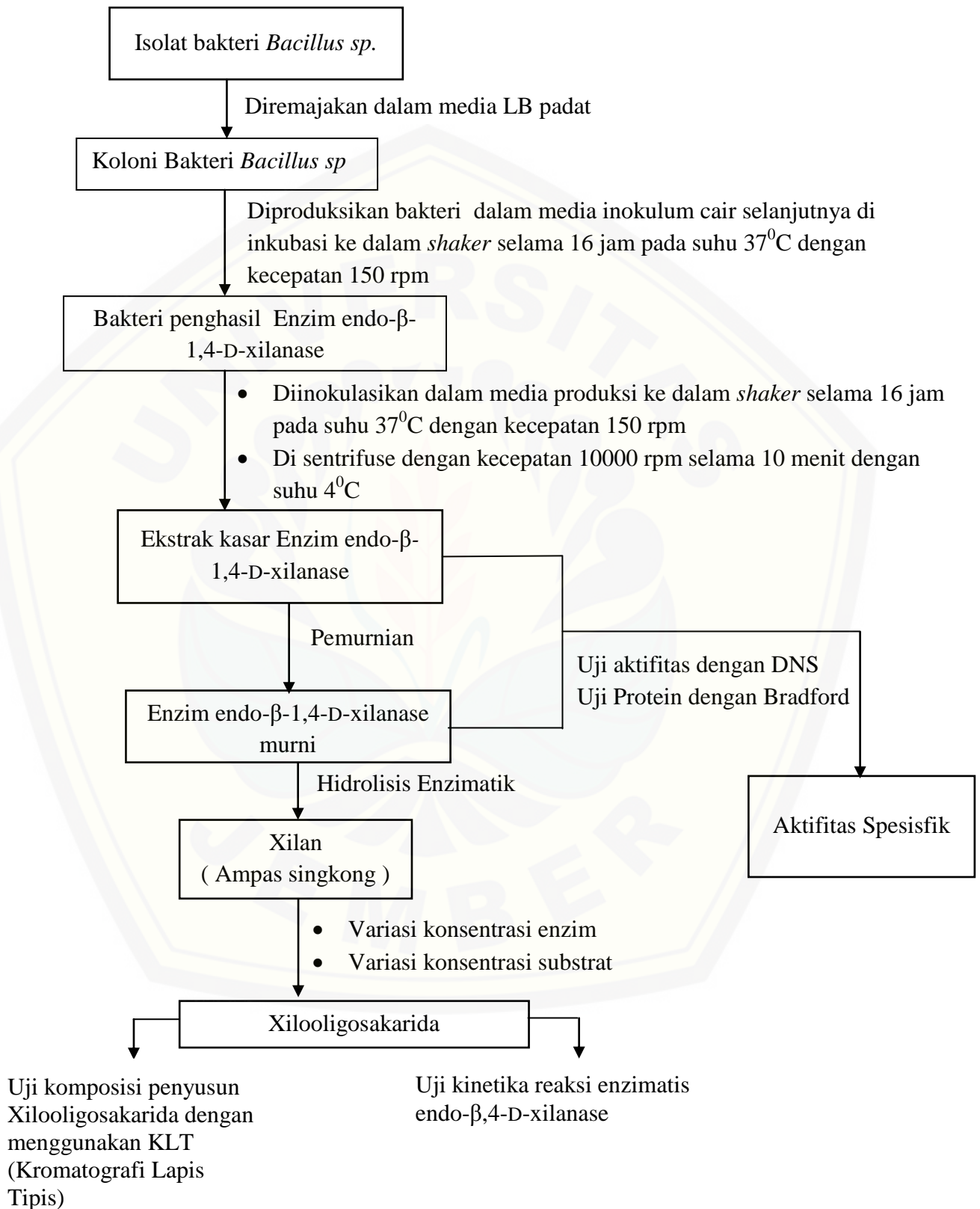
Peralatan bukan gelas meliputi spatula logam, kawat *ose*, *Eppendorf*, *parafilm*, pembungkus plastik, *ball* pipet, rak tabung reaksi, termometer, mikropipet (10, 200, dan 1000  $\mu$ l), tip pipet (putih, kuning, biru), *timer*, botol semprot, wadah aquades, bak alat, dan perlengkapan keamanan (sarung tangan, masker, dan kaca mata pelindung).

Instrumentasi meliputi neraca analitis, *autoclave*, inkubator, laminar, *shaker*, lemari pendingin, *water bath*, sentrifuse tabung reaksi, sentrifuse dingin, *sentrifuse Eppendarf*, penangas, magnetik stirer, anak stirer, spektrofotometer UV beserta kuvet, pH meter, *hairdryer*, oven, dan kamera digital.

### 3.3 Bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian yang akan digunakan adalah sampel substrat xilan yang telah diisolasi dari ampas singkong dan isolat bakteri sistem abdomen rayap, triptofan (Oxoid), yeast, akuades, *bacto* agar (Oxoid), natrium klorida (E-Merck, Mr: 58,44 g/mol,  $\rho$ : 2,16 g/ml), 1-butanol (E-Merck, Mr: 74,12 gr/mol),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (E-Merck, Mr: 141,96 g/mol,  $\rho$ :1,70 g/ml), NaOH (E-Merck, Mr: 39,99 gr/mol), asam sitrat  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (E-Merck, Mr: 210,14 g/mol,  $\rho$ :1,50 g/ml), NaOH (E-Merck, Mr: 39,99 g/mol,  $\rho$ :2,10 g/ml), Asam asetat (E-Merck, Mr: 60,05 gr/mol), KNaTartrat  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (E-Merck, Mr: 282,1 g/mol,  $\rho$ :0,63 g/ml), asam 3,5-dinitrosalisilat (E-Merck, Mr: 228,12 gr/mol),  $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$  (E-Merck, Mr: 94,11 g/mol,  $\rho$ :1,07 g/ml),  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (E-Merck, Mr: 126,04 g/mol,  $\rho$ :1,56 g/ml), Ammonium sulfat (E-Merck, Mr: 132,14 gr/mol), HCl (E-Merck), asam fosfat 85% (E-Merck, Mr: 97,99 gr/mol) dan etanol 95% (E-Merck, Mr: 46,07 g/mol,  $\rho$ :0,789 g/ml). Bahan-bahan pendukung yang digunakan pada penelitian ini antara lain kertas saring, kapas, kain kasa, benang pengikat, kertas label, gabus, spiritus.

### 3.4 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram alir penelitian

### 3.5 Persiapan Media, *Buffer* dan Reagen

#### 3.5.1 Pembuatan media (Luria Bertani) LB Padat

Sebanyak 1 gram triptofan, 0,5 gram ragi, 1 gram agar, dan 1 gram NaCl dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 300 ml dan dilarutkan dengan akuades sampai volume 100 ml. Erlenmeyer ditutup dengan penutup dari kapas dan kasa. Media campuran dipanaskan dengan *autoclave* selama 15 menit. Campuran yang telah dipanaskan dikeluarkan dari *autoclave* dan ditunggu hingga suhu larutannya hangat. Selanjutnya tuangkan media ke petri yang steril (penuangan dilakukan di dalam laminar) dan ditunggu hingga padat selama 1 jam dan disimpan dalam lemari pendingin.

#### 3.5.2 Pembuatan media inokulum cair

Sebanyak 0,5 gram triptofan; 0,25 gram ragi; 0,5 gram NaCl dan 0,25 gram xilan oat dimasukkan dalam Erlenmeyer 150 ml dan dilarutkan dengan akuades sampai volume 50 ml. Campuran dibagi ke dalam 5 tabung reaksi dengan volume yang sama. Tabung reaksi ditutup dengan penutup kapas dan kasa. Media campuran dipanaskan dengan *autoclave* selama 15 menit. Campuran yang telah dipanaskan dikeluarkan dari *autoclave* dan ditunggu hingga suhu larutannya sama dengan suhu ruang. Media yang telah mencapai suhu ruangan disimpan dalam lemari pendingin.

#### 3.5.3 Pembuatan media produksi

Sebanyak 1 gram triptofan; 0,5 gram ragi, dan 1 gram NaCl dimasukkan dalam Erlenmeyer 300 ml dan dilarutkan dengan akuades sampai volume 100 ml. Erlenmeyer ditutup dengan penutup dari kapas dan kasa. Media campuran dipanaskan dengan *autoclave* selama 15 menit. Campuran yang telah dipanaskan dikeluarkan dari *autoclave* dan ditunggu hingga suhu larutannya sama dengan suhu ruang. Media yang telah mencapai suhu ruangan disimpan dalam lemari pendingin.

#### 3.5.4 Pembuatan reagen Miller

NaOH sebanyak 5 gram dilarutkan menjadi 50 ml dengan akuades. Natrium potassium tartrat sebanyak 91 gram dilarutkan menjadi 200 ml dengan akuades. NaOH dan natrium potassium tartrat dicampurkan dengan pengadukan menggunakan stirrer magnetik dan anak stirernya. Selanjutnya ditambahkan 5 gram DNS sedikit demi sedikit. Setelah tercampur ditambahkan 1 gr fenol, dan 50 ml aquades (Miller, 1959).

#### 3.5.5 Pembuatan reagen Bradford

Pembuatan reagen bradford dilakukan dengan 2 jenis larutan yang disiapkan yaitu larutan stok dan larutan kerja. Larutan stok dibuat dengan melarutkan sebanyak 350 mg CBB dalam campuran etanol 95% 100 ml dan 200 ml asam fosfat 85% dan kemudian disimpan pada suhu ruang. Larutan kerja diperoleh dengan mengambil sebanyak 30 ml larutan stok kemudian dicampurkan dengan 15 ml etanol 95% dan 30 ml asam fosfat 85% pada labu ukur 500 ml selanjutnya diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Penyimpan larutan ini pada botol kaca gelap pada suhu ruang dan larutan ini dapat digunakan selama beberapa minggu dengan dilakukan penyaringan tiap kali sebelum digunakan (Bradford, 1976).

#### 3.5.6 Larutan Subtrat Xilan Oat 0,8%

Larutan substrat dibuat dengan 0,8 g xilan oat yang dilarutkan dalam 100 ml buffer fosfat-sitrat (pH 5,0). Larutan diautoclave sampai semua xilan oat larut.

#### 3.5.7 Larutan Stok Xilosa

Larutan stok xilosa dibuat dengan konsentrasi 10 mg/ml. Sebanyak 10 mg xilosa dilarutkan dalam 10 ml aquades.

#### 3.5.8 Pembuatan *buffer* fosfat-sitrat

Asam sitrat sebanyak 9,605 gram dilarutkan dengan akuades pada labu ukur 500 ml sampai tanda batas. Sebanyak 14,196 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dilarutkan dengan

akuades menggunakan labu ukur 500 ml aquades sampai tanda batas. Bufer pH 5 dibuat dengan mencampurkan 243 ml asam sitrat dengan 257 ml natrium hidrofosfat pada labu ukur 1000 ml dan menambahkan aquades hingatanda batas. Selanjutnya diuji nilai pH-nya menggunakan pH meter.

### **3.6 Peremajaan Bakteri Pengekresi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase**

Isolat bakteri *Basillus sp.* diremajakan dengan cara diambil menggunakan jarum *ose* dan digoreskan dalam cawan petri yang berisi media LB padat. Isolat yang telah dikembang biakkan pada media didiamkan dalam inkubator selama 16 jam pada suhu 37°C.

### **3.7 Produksi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase**

Koloni bakteri diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium cair dan di-*shaker* selama 16 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi kemudian diambil sebanyak 1 % dari total volume medium produksi. Medium produksi selanjutnya di-*shaker* selama 16 jam pada suhu 37°C.

### **3.8 Isolasi Ekstrak Kasar Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase**

Medium poduksi disentrifugasi pada kecepatan 10.000 *rpm* selama 15 menit dengan suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan dari proses sentrifugasi selanjutnya digunakan sebagai ekstrak kasar enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase. Ekstrak kasar enzim ini selajutnya ditentukan aktifitas dan kadar protein.

### **3.9 Pemurnian Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase**

#### **3.9.1 Fraksinasi Amonium Sulfat**

Amonium sulfat digunakan untuk memurnikan enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang telah didapatkan dengan aktifitas tertinggi. Fraksinasi berupa pengendapan secara seri terhadap protein ekstrak enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase melalui penambahan amonium sulfat jenuh 35-65%. Sebanyak 10 ml enzim diletakkan dalam tabung sentrifugasi dan diendapkan dengan amonium sulfat dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Penambahan amonium sulfat dilakukan

dengan konsentrasi 35-65% dengan rentang 5%. Enzim yang telah ditambahkan amonium sulfat selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 8.000 *rpm* selama 20 menit dengan temperatur 4°C hingga terbentuk supernatan dan pelet. Pelet dilarutkan dengan *buffer* hingga volume 5 mL. Larutan pelet yang terbentuk dari setiap proses penengendapan dengan konsentrasi yang berbeda ditampung 1 mL dan ditentukan aktifitas dan kadar protein berdasarkan metode pada sub bab 3.10 dan 3.11.

### 3.9.2 Dialisis

Larutan pelet dengan aktifitas enzim tertinggi dari prosedur 1.9.1 dimurnikan lebih lanjut dengan metode dialisis. Dialisis bertujuan untuk menghilangkan kandungan ammonium sulfat pada larutan pelet. Larutan pellet didialisis selama 24 jam dalam *buffer* menggunakan kantung dialisis pada temperatur 4°C. Larutan bufer diganti setiap 2, 4, 6, dan 12 jam selama proses dialisis. Enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase hasil dialisis selanjutnya ditentukan aktifitas dan kadar protein berdasarkan metode pada sub bab 3.10 dan 3.11.

## 3.10 Penentuan Aktifitas Enzim

Aktifitas enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase ditentukan berdasarkan konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan setelah penambahan reagen DNS pada ekstrak kasar enzim. Satu unit enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase didefinisikan sebagai aktifitas enzim yang mampu menghasilkan 1  $\mu$ mol gula reduksi (ekivalen xilosa) dari substrat xilan dalam waktu 1 menit untuk setiap kondisi tertentu (Puspaningsih *et al.*, 2005). Aktifitas enzim yang diukur adalah ekstrak kasar (*crude*), hasil fraksinasi, dan hasil dialisis (*dialisat*).

### 3.10.1 Kurva Standar Xilosa

Larutan standar xilosa dari larutan stok 10 mg/ml diencerkan menggunakan akuades dengan konsentrasi yang berbeda (0,25 mg/ml-3 mg/ml dengan selisih 0,25 mg/ml). 1000  $\mu$ l dari masing-masing konsentrasi dicampurkan dengan 750  $\mu$ l reagen DNS dalam *test tube*. Campuran ini dipanaskan dalam air mendidih selama

15 menit dan langsung didinginkan dalam air es selama 20 menit. Warna yang dihasilkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm dan dibuat grafik antara sumbu  $x$  (konsentrasi xilosa) dan  $y$  (nilai absorbansi).

### 3.10.2 Pengujian Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase

Sebanyak 125  $\mu$ l sampel enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase ditambahkan pada 125  $\mu$ l substrat *oat spelt* xilan 0,8% (b/v) dalam bufer dan diinkubasi dengan *water bath* pada suhu 40°C selama 60 menit. Bersamaan dengan itu dikerjakan kontrol yakni campuran dari 125  $\mu$ l enzim inaktif (enzim yang telah di panaskan pada suhu 100°C) dan 125  $\mu$ l suspensi substrat. Selanjutnya baik sampel maupun kontrol ditambahkan sebanyak 750  $\mu$ l reagen DNS. Sampel dan kontrol dipanaskan kembali dalam air mendidih selama 15 menit dan langsung didinginkan dalam air es selama 20 menit. Warna yang dihasilkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm.

### 3.10.3 Perhitungan Aktifitas

Aktifitas dapat ditentukan menggunakan persamaan regresi standar xilosa yang mewakili konsentrasi standar dan nilai absorbansi. Berdasarkan data yang didapatkan, maka aktifitas enzim dapat ditentukan melalui persamaan berikut :

$$\text{Aktifitas Enzim (U.ml}^{-1}\text{)} = \frac{([s] - [k]) \times Fp \times \left(\frac{V_{total}}{V_{enzim}}\right)}{t \times BM \text{ xilosa}}$$

dimana,

[s] : konsentrasi sampel

[k] : konsentrasi kontrol

$Fp$  : Faktor pengenceran

$V_t$  : Volume total ( $\mu$ l)

$V_e$  : Volume enzim ( $\mu$ l)

$t$  : waktu hidrolisis substrat oleh enzim (menit)

BM : Berat Molekul xilosa (gr/mol) (Miller, 1959).



### 3.11 Penentuan Kadar Protein ( Crude, hasil Fraksinasi dan Dialisat)

#### 3.11.1 Pembuatan kurva standar BSA

Larutan standar BSA yang digunakan terdapat beberapa dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 0,1-0,7 mg/ml dengan interval konsentrasi 0,1 mg/ml. Larutan standar masing-masing diambil sebanyak 100  $\mu$ L dan dicampurkan dengan 1 ml reagen. Campuran dikocok dengan vortex dan didiamkan selama 2-5 menit kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Kurva yang diperoleh pada pengukuran absorbansi larutan standar BSA dapat diketahui persamaan regresi yaitu  $y = mx + C$ . Persamaan regresi inilah dapat digunakan untuk menentukan kadar protein pada sampel enzim.

#### 3.11.2 Perhitungan kadar protein Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase

Sampel enzim diambil sebanyak 100  $\mu$ l dan dicampurkan dengan reagen Bradford sebanyak 1 ml. Campuran dikocok dengan vortex dan didiamkan selama 2-5 menit kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Kadar protein dapat dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Kadar Protein } \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{abs} \pm C}{m}$$

Keterangan,

Abs : absorbansi pada panjang gelombang 595 nm

C : nilai *intercept* dari persamaan kurva standar BSA

m : nilai *gradient* dari persamaan kurva standar BSA (Bradford, 1976).

#### 3.11.3 Perhitungan aktifitas spesifik Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase

Aktifitas spesifik adalah jumlah unit enzim per milligram protein, dimana merupakan suatu ukuran kemurnian enzim. Sehingga untuk menentukan aktifitas spesifik (U/mg) dari enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dengan cara membagi hasil perhitungan aktifitas (U) dengan kadar protein (mg). Perhitungan aktifitas spesifik dilakukan pada sampel enzim berupa crude, hasil fraksinasi dan dialisat.

### **3.12 Optimasi Konsentrasi substrat Xilan dan Deteksi Produk Pemurnian Hidrolisat**

Konsentrasi substrat xilan untuk memperoleh produk hidrolisis yang maksimal perlu dioptimasi, oleh karena itu konsentrasi substrat xilan yang berasal dari ampas singkong perlu divariasikan. Variasi konsentrasi substrat xilan adalah (0,1-2% (b/v)). Hidrolisis dengan variasi konsentrasi substrat dilakukan dengan mencampurkan 125  $\mu\text{l}$  enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan (variasi substrat) sebanyak 125  $\mu\text{l}$  yang telah dilarutkan dalam *buffer* fosfat-sitrat dengan pH 5 kemudian campuran substrat dan enzim diinkubasi pada suhu 40°C dalam *water bath* selama 16 jam. Kontrol yang digunakan untuk membandingkan hasil yang diperoleh adalah enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase yang dinaktifkan. Inaktivasi enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dilakukan dengan mengambil 125  $\mu\text{l}$  enzim kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 60 menit.

Selanjutnya baik sampel maupun kontrol ditambahkan sebanyak 750  $\mu\text{l}$  reagen DNS. Sampel dan kontrol dipanaskan kembali dalam air mendidih selama 15 menit dan langsung didinginkan dalam air es selama 20 menit. Warna yang dihasilkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Selanjutnya ditentukan aktifitas berdasarkan metode pada sub bab 3.10.

### **3.13 Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dan Deteksi Produk Pemurnian Hidrolisat**

Konsentrasi enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase untuk memperoleh produk hidrolisis yang maksimal juga perlu dioptimasi. Variasi konsentrasi enzim adalah 2 sampai 15 U/ml dengan penambahan *buffer*. Hidrolisis dengan variasi enzim dilakukan dengan mencampurkan 125  $\mu\text{l}$  enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan sebanyak 125  $\mu\text{l}$ . Prosedur yang dilakukan pada optimasi konsentrasi enzim ini sama halnya pada optimasi konsentrasi substrat. Konsentrasi substrat xilan yang digunakan adalah konsentrasi yang optimum yang diperoleh dari prosedur 3.12.

### 3.14 Kinetika reaksi Enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase terhadap substrat xilan ampas singkong dan Deteksi Produk Pemurnian Hidrolisat

Kinetika reaksi enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase untuk memperoleh produk hidrolisis yang maksimal juga perlu diketahui, oleh karena itu setelah diketahui konsentrasi optimum dari substrat xilan pada sub bab 3.12 dan konsentrasi optimum dari enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase pada sub bab 3.13, dilakukan variasi waktu inkubasi mulai dari 0, 4, 8, 12 dan 16 jam terhadap variasi substrat mulai dari 0.1%, 0.3%, 0.6%, 0.9% dan 1.2%.

Tujuan dari variasi konsentrasi substrat ini untuk mengetahui laju reaksi dari enzim tersebut. Hidrolisis dilakukan dengan mencampurkan 125  $\mu$ l enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan sebanyak 125  $\mu$ l. substrat dan enzim diinkubasi pada suhu 40°C dalam *water bath* selama 0, 4, 8, 12 dan 16 jam. Kontrol yang digunakan untuk membandingkan hasil yang diperoleh adalah enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dengan konsentrasi optimum yang diinaktifkan. Inaktif enzim Endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase dilakukan dengan mengambil 125  $\mu$ l enzim kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 60 menit. Selanjutnya dilakukan penentuan aktifitas dari hasil hidrolisis seperti pada sub bab 3.10.

### 3.15 Deteksi Produk Hasil Hidrolisis

Hasil hidrolisis yang diperoleh kemudian dideteksi keberadaan xilooligosakarida yang terbentuk secara kromatografi lapis tipis (KLT). Metode kromatografi lapis tipis dilakukan berdasarkan Ratnadewi *et al.* (2007). Kromatoplat yang akan digunakan sebelumnya diberi tanda nomor serta garis batas atas dan batas bawah sebagai lokasi penotolan sampel hidrolisat lalu dipanaskan dalam oven selama 30 menit. 40  $\mu$ l hidrolisat ditotolkan pada kromatoplat dan dicelupkan dalam wadah yang telah berisi fasa gerak n-butanol, asam asetat, dan akuades dengan perbandingan 2:1:1 (Kubata *et al.*, 1994).

Proses ini diakhiri hingga fasa gerak mencapai garis batas atas dari kromatoplat. Visualisasi dilakukan dengan menyemprotkan larutan penampak noda ( $\alpha$ -naftol, asam sulfat, etanol 1:10:200) dan meletakkan kromatoplat dalam oven dengan suhu 100°C selama 30 menit. Proses penyemprotan dengan

penampak noda yang dilanjutkan dengan pemanasan akan menghasilkan noda-noda dari hidrolisat dan standar.



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

- Konsentrasi substrat xilan ampas singkong untuk menghasilkan Xilooligosakarida (XO) optimum adalah 1.1% dengan konsentrasi enzim sebesar 11.8128 U/ml.
- Nilai  $V_{max}$  sebesar 5.820721 ppm/jam dan  $K_m$  sebesar 0.00407%, sehingga diketahui bahwa enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase berinteraksi dengan kuat substrat xilan ampas singkong.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penentuan secara kualitatif dan kuantitatif dengan standar xilooligosakarida agar dapat diketahui secara pasti kandungan dan kadar xilooligosakarida yang terbentuk, dari hasil hidrolisis substrat xilan ampas singkong dengan enzim endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase

**DAFTAR PUSTAKA**

- Aachary, A.A & Prapulla, S.G. 2008. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic : Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10 : 2-16.
- Ahuja, S. 2003. Chromatography and Separation Science. United State of America: Elsevier Science.
- Akpinar, Ak, Kavas, Bakir, & Yilmaz, L. 2007. Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Cotton Stalks. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55 : 5544-5551.
- Akpinar, O., & Bostanci, S. 2009. Xylooligosaccharide Production from Lignocellulosic Wastes with *Trichoderma longibrachiatum* Xylanase. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7(1): 70-74.
- Akpinar, Erdogan, & Bostanci. 2009. Production of Xylooligosaccharides by Controlled Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Materials. *Journal of Carbohydrate Research*, 344: 660-666.
- Anand, A., Kumar, V., & Satyanarayana, T. 2013. Characteristics of Thermostable Endoxylanase and B-Xylosidase of The Extremely Thermophilic Bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 and Its Applicability in Generating Xylooligosaccharides and Xylose from Agro-Residues. *Extremophiles*, 17(3):357-366.
- Bintang, Maria. 2010. Biokimia-Teknik Penelitian. Jakarta: Erlangga.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72 : 248-254.
- Budiman, Albar & Setyawan, Sigit. 2009. Pengaruh konsentrasi substrat, lama inkubasi dan pH dalam proses isolasi enzim xilanase dengan menggunakan media jerami padi. Jurusan kimia. Semarang : Universitas Diponegoro.
- Bullock, S. 2005. Xylooligosaccharides Characterization by Aqueous SEC with Evaporative Light-Scattering Detection. *Polymer Laboratories Reader Service the Application Book*, 15:2.

- Boonchuay, P. & Chaiyaso, T. 2012. Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Corn cob Using Endo-Xylanase from *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948. *1<sup>st</sup> Mae Fah Luang University International Conference*.
- Collin, T., Gerday, C., & Feller, G. 2005. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanase. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 29(1): 3-23.
- Dyah, A. S., Jannah, A., dan Maunatin, A. 2012. Kinetika Reaksi Enzimatis Ekstrak Kasar Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul. Malang : UIN Maliki.
- Direktorat gizi. 2000. Singkong. Departemen Kesehatan. Republik Indonesia.
- Dominguez G, Silva J, Garacia JM, Silva JM, Rodriguez R, Munoz C, Chacon I, Sanchez R, Carballido J, Colas A, Espana P, Bonilla F. 2003. *Prevalence of aberrant methylation of P14ARF over P16NK4a in some human primary tumors*. *Mutat Res*, 530:9-17.
- Efendi, T. 2007. "Eksplorasi Kompleks Enzim Xilanolitik dan Karakterisasi Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase dari Bakteri Sistem Abdomen Rayap Tanah." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember : Jurusan Kimia Universitas Jember.
- Esteves, F. D. L., Ruelle, V., Brasseur, J. M., 2004, " *Acidophilic Adaptation of Family 11 Endo- $\beta$ -1-4-Xylanases: Modeling and Mutational Analysis*", *Protein Science*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 13: 1209-1218.
- Fang, Chang, Lan, & Fang. 2007." Purification and Characterization of a Xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and Its Potential Use in Photoprotectant Preparation". *Process Biochemistry*, 43 : 49-55.
- Fennema, O. R., Parkin, K. L., & Damodaran, S. 2008. Food Chemistry. Fourth Edition. United State of America: CRC Press.
- Gulton, T. 2001. Biokimia Struktur dan Fungsi. Yogyakarta: UNY Press.
- Hendayana, S. Kimia Pemisahan: *Metode Kromatografi Modern dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Holme, D. J., & Peck, H. 1998. *Analytical Biochemistry*. Third Edition. Singapore: Singapore Publisher Ltd.

- Kapoor I.P, Singh B, Singh G, De Heluani C.S, De Lampasona M.P, Catalan C.A. *Chemistry and antioxidant activity of essential oil and oleoresins of black caraway (Carum bulbocastanum) fruits*. 2001. *J Sci Food Agric*, 90: 385–90.
- Khan, A.W., Tremblay, D., & LeDuy, A. 1986. Assay of Xylanase and Xylosidase Activities in Bacterial and Fungal Culture. *Enzyme Microbial Technology*, Vol. 8 : 373-377.
- Kubata, Suzuki, Horitsu, Kawai, & Takamizawa. 1994. Purification and Characterization of *Aeromonas caviae* ME-1 Xylanase V, Which Produces Exclusively Xylobiose from Xylan. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(2) : 531.
- Kumar, G. P., Pushpa, A., & Prabha, H. 2012. A Review on Xylooligosaccharides. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(8): 71-74.
- Lehninger, A. L. 1997. *Biochemistry*. New York: Worth Publisher Inc
- Menezes, Silva, Pavarina, Faria, Franciskon, & Durran. 2010. Production of Xylooligosaccharides from Enzymatic Hydrolysis of Xylan by White-rot Fungi *Pleurotus*. *Journal of Acta Scientiarum Technology*, 32(1): 37-42.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* Vol. 31 : 426-428.
- Murray P.R. et al. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Edition, Washington, ASM, 1999.
- Mussatto, S. I. & Manchilha, I. M. 2007. Non-digestible oligosaccharides : A Review. *Carbohydrate Polymers*, 68 : 587-597.
- Moura, Barata, Carvalheiro, Girio, Dias, & Esteves. 2006. In Vitro Fermentation of Xylooligosaccharides from Corn Cobs Autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Strains. *International Journal Food Science and Technology*, 40: 963-972.
- Naqib, M., Ratnadewi, A. A. I., Santoso, A. B. 2007. “Isolation and Some Properties of Xylanase from Soil-Termite Guts and Influence of Enzyme in Baking.” Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember : Jurusan Kimia Universitas Jember.
- Nelson, D.L., & Cox, M.M. 1997. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Edisi Keempat. Madison : Universitas Wisconsin.
- Ngili, Yohanis. 2010. *Bio Kimia Dasar*. Bandung: Rekayasa sains



- Okafor, U. A., Okochi, U. I., Onyegeme-Okerenta, B. M and Nmodo-Chinedu, S., 2007, "Xylanase Production by *Aspergillus niger* ANL 301 Using Agro Wastes", *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (14) : 1710-1714, Nigeria.
- Prof. Dr. Anna Poedjiadi ,dkk.2009. Dasar- dasar biokimia. Jakarta: Salemba, UI-press.
- Ratnadewi, A. A. I., Handayani, W., & Puspaningsih, N. N. T. 2007. Produksi dan Karakterisasi, Enzim  $\beta$ -Endoxilanase dari Bakteri Sistem Intestinal Rayap. *Jurnal Ilmu Dasar*, 8(2): 110-117.
- Ratnadewi, A. A. I., Puspaningsih, N.N.T, & Naqib, M. 2007. The Utilization of Molisch Reagens as Spraying Agent for Thin Layer Chromatograms of Charbohidrate. *Proceeding of the International Conference and Workshop on Basic and Applied Science "Improving Link of Basic and Applied Science"*, Surabaya (UNAIR-RuG-KNAW-UTM), August 6-8, 2007, 4 pp.
- Richana, N. 2002. Produksi dan Prospek Enzim xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia. *Buletin AgroBio*, 5(1): 29-36.
- Rohman, A. & Gandjar, I. G. 2007. *Metode Kromatografi untuk Analisis Makanan*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Shallom, D. & Shoham, Y. 2003. Microbial Hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3): 219-228.
- Scopes, R. K., 1982, Protein, Purification, Principles and Practice. 3<sup>rd</sup> ed., Sringer Verlag, New York, page 51-58, 87.
- Skoog, West, Holler, & Crouch. 2004. *Fundamental of Analytical Chemistry*. Eighth Edition. Canada: Cengage Learning.
- Stanbury, P.F. and A. Whitaker. 1984. Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press, London. P. 26-71.
- Svehla, G., 1985, Analisa Anorganik Kualitatif, a.b. L. Setiono dan Handayana Pudjaatmaka, bagian II, edisi kelima, PT. Kalman Media Pusaka, Jakarta, 369.
- Timberlake, K.C. 2009. Chemistry : An Introduction to General, Organic, and Biological Chemistry. Edisi Kesepuluh. New Jersey : Pearson Education, Inc.
- Verbeek, J. 2012. Products and Applications of Biopolymers. Shanghai: Intech.

Wirahadikusumah, M.m 1989, Biokimia: Protein, Enzim dan asam Nukleat. Penerbit ITB, Bandung, 61, 67-69.

Wong, D.W.S. 1995. Food Enzymes: Structure and Mechanism. New York: Chapman & Hall. 104-106.

Wysong. 2006. Rationale for Enzym Supplementation. Midland : Wysong, Co.

Yang, Wang, Song, & Xu. 2011. Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipites* based on xylan preparation from triploid *Populastomentosa*. *Bioresource Technology*, 102 : 7171-7176.

Zhang, Li, Wang, Yang & Wu. 2014. Determination for The Improved Thermostability of a Mesophilic Family 11 Xylanase Prdeicted by Computational Method. *Biotechnology for Biofuels* 7 : 3.

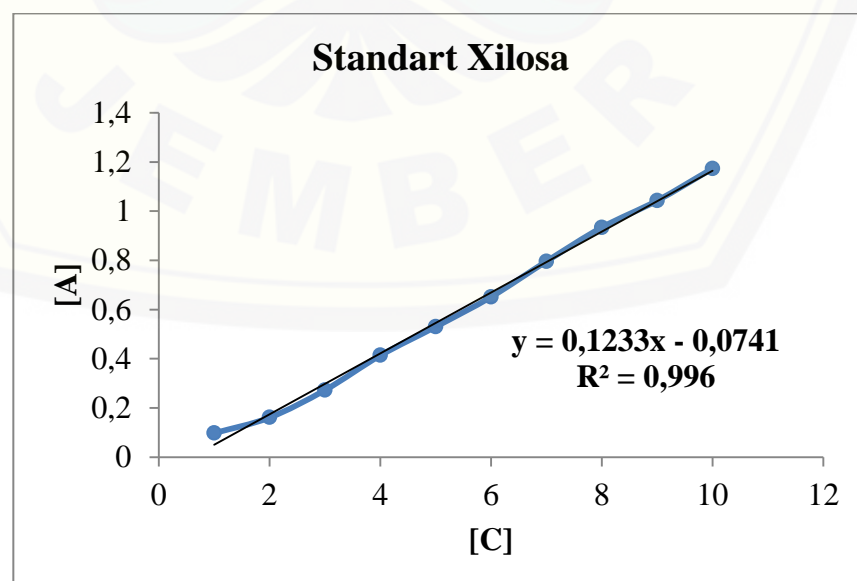
Universitas Marseille. 2014. Glycoside Hydrolase Family Classification. [serial on line]. <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>. [14Januari 2014].

LAMPIRAN

Lampiran A. Kurva hasil Penelitian

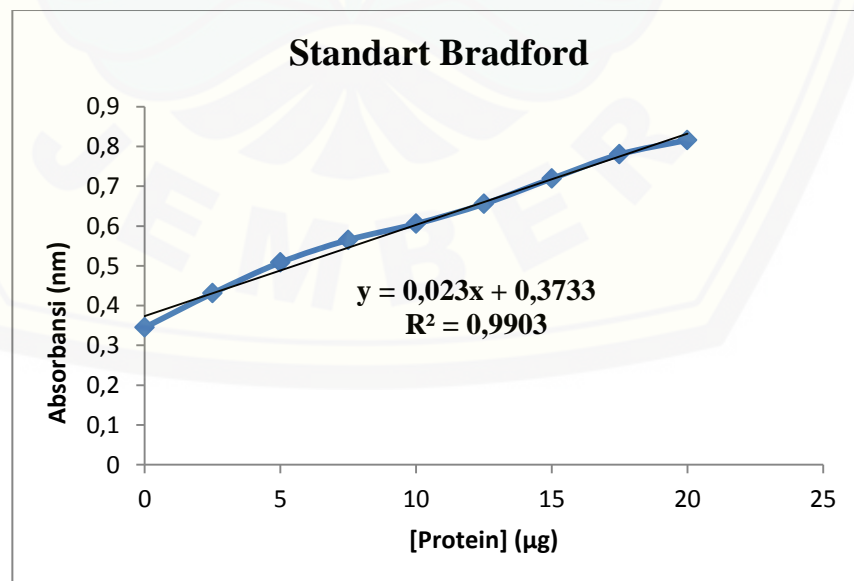
A.1 Kurva Standar xilosa dibaca pada panjang gelombang 550 nm

Konsentrasi xilosa (mg/ml)	Absorbansi (nm)
0.375	0.098
0.500	0.161
0.625	0.273
0.750	0.414
0.875	0.530
1.000	0.652
1.125	0.796
1.250	0.934
1.375	1.043



**A.2 Kurva Standar BSA pada 595 nm**

Konsentrasi Protein ( $\mu\text{g}$ )	Absorbansi (nm)
0.00	0.345
2.50	0.431
5.00	0.509
7.50	0.565
10.00	0.606
12.50	0.656
15.00	0.719
17.50	0.780
20.00	0.816



## Lampiran B.Fraksinasi Ammonium Sulfat

### B.1 Perhitungan menambahkan Ammonium Sulfat (Fraksinasi seri)

$$\text{Fraksi Ammonium Sulfat (\%)} = \frac{\text{Krude enzim (mL)}}{1000 \text{ mL}} \times \text{Massa Ammonium sulfat pada tabel (g)}$$

### B.2 Optimasi Konsentrasi Ammonium sulfat

Fraksi	Massa Ammonium Sulfat
0-40%	$\frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 226 \text{ g} = 0.226 \text{ g}$
0-45%	$\frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 29 \text{ g} = 0.029 \text{ g}$
0-50%	$\frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 29 \text{ g} = 0.029 \text{ g}$
0-55%	$\frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 30 \text{ g} = 0.030 \text{ g}$
0-60%	$\frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 30 \text{ g} = 0.030 \text{ g}$
0-65%	$\frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 31 \text{ g} = 0.031 \text{ g}$
0-70%	$\frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 31 \text{ g} = 0.031 \text{ g}$

**B.3 Data hasil Fraksinasi seri**

Jenis Fraksi	Nama	Abs (nm)	Kadar Xilosa (mg/ml)	Aktivitas (U/ml)
40%	Kontrol	0.249	2.5816	3.7267
	Sampel	0.729	6.7965	
45%	Kontrol	0.285	2.8974	5.4253
	Sampel	0.985	9.0333	
50%	Kontrol	0.253	2.6167	6.6313
	Sampel	1.108	12.310	
55%	Kontrol	0.292	2.9588	5.8557
	Sampel	1.047	11.525	
60%	Kontrol	0.276	2.8140	5.2546
	Sampel	0.953	9.8623	
65%	Kontrol	0.277	2.8228	2.3849
	Sampel	0.584	5.5202	
70%	Kontrol	0.264	2.7088	1.5783
	Sampel	0.467	4.4939	

**B.4 Data Fraksinasi seri dengan pengukuran protein**

Jenis fraksi	Absorbansi (nm)	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
40%	0.5655	0.0480	3.7267	77.713
45%	0.6055	0.0661	5.4253	82.031
50%	0.6255	0.0752	6.6313	88.150
55%	0.6730	0.0968	5.8557	60.481
60%	0.6825	0.1011	5.2546	51.956
65%	0.7145	0.1157	2.3849	20.616
70%	0.6890	0.1041	1.5783	15.163

## Lampiran C. Data Hasil Pengamatan

C.1 Pengukuran Aktivitas Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase dengan Metode Miller

$$\text{Aktivitas Enzim (U.ml}^{-1}\text{)} = \frac{([s] - [k]) \times Fp \times \left(\frac{V_{total}}{V_{enzim}}\right)}{t \times BM \text{ xilosa}}$$

dimana,

[s] : konsentrasi sampel (mg/ml)

[k] : konsentrasi control (mg/ml)

$Fp$  : faktor pengenceran

$V_t$  : volume total ( $\mu$ l)

$V_e$  : volume enzim ( $\mu$ l)

$t$  : waktu hidrolisis substrat oleh enzim (menit)

BM : berat molekul xilosa (g/mol)

Sampel	Absorbansi	Kadar Xilosa (mg/ml)	Aktivitas (U/ml)		Standar Deviasi
			Sampel	Rata-rata	
Crude	Kontrol 1	0.222	2.3447	2.0824	0.0035
	Kontrol 2	0.217	2.3009	2.0435	
	Sampel 1	0.593	5.5991	4.9727	0.0042
	Sampel 2	0.587	5.5465	4.9259	
Fraksinasi 50%	Kontrol 1	0.216	2.2921	2.0357	0.0007
	Kontrol 2	0.217	2.3009	2.0435	
	Sampel 1	0.384	3.7658	3.3445	0.0127
	Sampel 2	0.402	3.9237	3.4847	
Dialisat	Kontrol 1	0.240	2.5026	2.2226	0.0007
	Kontrol 2	0.241	2.5114	2.2304	
	Sampel 1	0.444	4.2921	3.8119	0.0021
	Sampel 2	0.447	4.3184	3.8353	

### C.2 Pengukuran Kadar Protein Endo- $\beta$ -1,4-D-Xilanase dengan Metode Bradford dan Aktivitas Spesifik

$$\text{Kadar Protein (mg/ml)} = \frac{\text{Abs} \pm C \times fp}{m}$$

dimana,

Abs : nilai absorbansi pada  $\lambda_{595}$  nm

C : nilai *intercept* dari persamaan kurva standar BSA

fp : faktor pengenceran

m : nilai kemiringan (*gradient*) dari persamaan kurva standar

Nama	Absorbansi (nm)	Kadar Protein (mg/ml)		Standar Deviasi	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
		Sampel	Rata-rata			
Crude	0.599	10.2727	10.364	0.0028	26.687	41.639
	0.603	10.4545				
Fraksinasi 50%	0.503	5.9091	5.955	0.0014	12.713	78.786
	0.505	6.0000				
Dialisat	0.497	5.6364	5.568	0.0021	14.766	91.507
	0.494	5.5000				



**D Optimasi Variasi Konsentrasi Substrat xilan ampas singkong**

Sampel	Absorbansi (nm)	Kadar Xilosa (mg/ml)		Standar Deviasi	Total Gula Reduksi (mg/ml)
		Rata-rata	Sampel		
0.10%	Kontrol 1	0.160	0.16000	1.8986	5.187
	Kontrol 2	0.160			
	Sampel 1	0.073	0.07200	7.0852	
	Sampel 2	0.070			
0.20%	Kontrol 1	0.159	0.15900	1.8946	12.271
	Kontrol 2	0.160			
	Sampel 1	0.222	0.21700	14.1655	
	Sampel 2	0.212			
0.30%	Kontrol 1	0.163	0.16300	1.9230	20.393
	Kontrol 2	0.163			
	Sampel 1	0.388	0.38450	22.3163	
	Sampel 2	0.381			
0.40%	Kontrol 1	0.168	0.16500	1.9391	22.810
	Kontrol 2	0.162			
	Sampel 1	0.400	0.43450	24.7494	
	Sampel 2	0.469			
0.50%	Kontrol 1	0.166	0.16550	1.9432	26.188
	Kontrol 2	0.165			
	Sampel 1	0.500	0.50400	28.1314	
	Sampel 2	0.508			
0.60%	Kontrol 1	0.164	0.16600	1.9473	33.070
	Kontrol 2	0.168			
	Sampel 1	0.646	0.64550	35.0170	
	Sampel 2	0.645			
0.70%	Kontrol 1	0.165	0.16600	1.9473	34.773
	Kontrol 2	0.167			
	Sampel 1	0.682	0.68050	36.7202	
	Sampel 2	0.679			
0.80%	Kontrol 1	0.165	0.16650	1.9951	37.348
	Kontrol 2	0.168			
	Sampel 1	0.737	0.73350	39.2993	
	Sampel 2	0.730			

Sampel	Absorbansi (nm)	Kadar Xilosa (mg/ml)		Standar Deviasi	Total Gula Reduksi (mg/ml)
		Rata-rata	Sampel		
0.90%	Kontrol 1	0.168	0.1685	1.9676	41.565
	Kontrol 2	0.169			
	Sampel 1	0.819	0.8205	43.5328	
	Sampel 2	0.822			
1.00%	Kontrol 1	0.170	0.1715	1.9919	43.852
	Kontrol 2	0.173			
	Sampel 1	0.900	0.8680	45.8443	
	Sampel 2	0.836			
1.10%	Kontrol 1	0.173	0.1740	2.0122	48.917
	Kontrol 2	0.175			
	Sampel 1	0.970	0.9725	50.9294	
	Sampel 2	0.975			
1.20%	Kontrol 1	0.184	0.1860	2.1095	49.234
	Kontrol 2	0.188			
	Sampel 1	0.982	0.9810	51.3431	
	Sampel 2	0.980			
1.30%	Kontrol 1	0.197	0.1960	2.1906	49.712
	Kontrol 2	0.195			
	Sampel 1	0.995	0.9925	51.9027	
	Sampel 2	0.990			
1.40%	Kontrol 1	0.200	0.2015	2.2352	50.276
	Kontrol 2	0.203			
	Sampel 1	1.012	1.0050	52.5109	
	Sampel 2	0.998			
1.50%	Kontrol 1	0.220	0.2195	2.3812	50.592
	Kontrol 2	0.219			
	Sampel 1	1.015	1.0155	52.9732	
	Sampel 2	1.016			
1.60%	Kontrol 1	0.225	0.2230	2.4096	50.564
	Kontrol 2	0.221			
	Sampel 1	1.014	1.0145	52.973	
	Sampel 2	1.015			

Sampel	Absorbansi (nm)	Kadar Xilosa (mg/ml)		Standar Deviasi	Total Gula Reduksi (mg/ml)
		Rata-rata	Sampel		
1.70%	Kontrol 1	0.223	0.2220	2.4015	50.572
	Kontrol 2	0.221			
	Sampel 1	1.013	1.0145	52.9735	
	Sampel 2	1.016			
1.80%	Kontrol 1	0.224	0.2240	2.4177	50.560
	Kontrol 2	0.224			
	Sampel 1	1.017	1.0150	52.9777	
	Sampel 2	1.013			
1.90%	Kontrol 1	0.229	0.2300	2.4663	50.504
	Kontrol 2	0.231			
	Sampel 1	1.018	1.0165	52.9703	
	Sampel 2	1.015			
2.00%	Kontrol 1	0.233	0.2310	2.4745	50.499
	Kontrol 2	0.229			
	Sampel 1	1.016	1.0145	52.9732	
	Sampel 2	1.013			

**E Optimasi Variasi Konsentrasi Enzim terhadap substrat xilan ampas singkong**

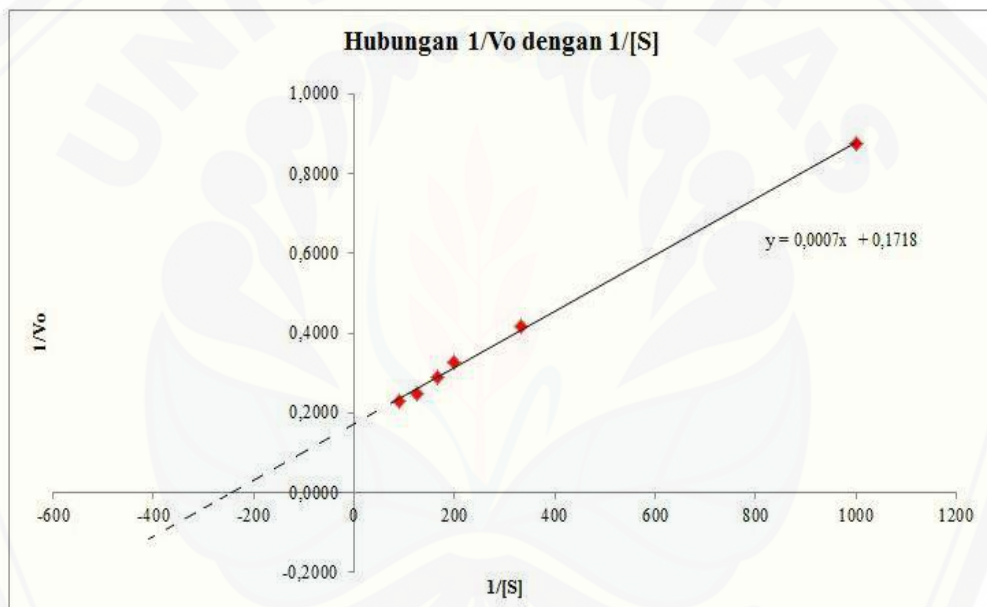
Sampel	Absorbansi (nm)	Kadar Xilosa (mg/ml)		Standar Deviasi	Total Gula Reduksi (mg/ml)
		Rata-rata	Sampel		
2.9532	Kontrol 1	0.211	0.210	2.3041	0.001
	Kontrol 2	0.209			
	Sampel 1	0.333	0.331	29.4233	0.004
	Sampel 2	0.328			
5.9064	Kontrol 1	0.215	0.214	2.3325	0.002
	Kontrol 2	0.212			
	Sampel 1	0.500	0.495	41.5036	0.008
	Sampel 2	0.489			
8.8596	Kontrol 1	0.223	0.223	2.4055	0.001
	Kontrol 2	0.222			
	Sampel 1	0.605	0.604	49.4598	0.002
	Sampel 2	0.602			
11.8128	Kontrol 1	0.225	0.224	2.4177	0.001
	Kontrol 2	0.223			
	Sampel 1	0.655	0.653	53.0364	0.004
	Sampel 2	0.650			
14.7660	Kontrol 1	0.227	0.227	2.4420	0.000
	Kontrol 2	0.227			
	Sampel 1	0.654	0.654	53.1094	0.001
	Sampel 2	0.653			

**F Penentuan nilai KM dan Vmax dari enzim terhadap substrat xilan ampas singkong**

Sampel	Waktu (Jam)	Absorbansi (nm)		Rata-rata	Kadar Xilosa (mg/ml)	Standar Deviasi	Total Gula Reduksi (mg/ml)
		Abs 1	Abs 2		Sampel		
0.10%	0	0.204	0.207	0.206	2.268	0.002	0.880
	4	0.286	0.286	0.286	11.682	0.000	10.286
	8	0.218	0.215	0.217	14.141	0.002	12.753
	12	0.217	0.216	0.217	16.498	0.001	16.498
	16	0.297	0.298	0.298	21.097	0.001	19.725
0.30%	0	0.293	0.300	0.297	3.006	0.005	1.598
	4	0.438	0.432	0.435	16.516	0.004	15.015
	8	0.465	0.456	0.461	26.015	0.006	24.586
	12	0.450	0.458	0.454	29.981	0.006	28.541
	16	0.638	0.663	0.651	41.137	0.018	39.697
0.50%	0	0.358	0.381	0.370	3.598	0.016	2.048
	4	0.478	0.489	0.484	18.089	0.008	16.531
	8	0.605	0.607	0.606	33.095	0.001	31.533
	12	0.728	0.713	0.721	45.111	0.011	43.379
	16	0.961	0.989	0.975	59.560	0.020	57.969
0.60%	0	0.392	0.401	0.397	3.817	0.006	2.267
	4	0.618	0.620	0.619	22.485	0.001	20.976
	8	0.685	0.695	0.690	37.182	0.007	35.620
	12	0.789	0.797	0.793	49.227	0.006	47.649
	16	1.073	1.125	1.099	66.599	0.037	65.009
0.80%	0	0.625	0.628	0.627	5.682	0.002	3.986
	4	0.629	0.623	0.626	22.712	0.004	20.951
	8	0.762	0.766	0.764	40.783	0.003	38.958
	12	0.998	0.997	0.998	60.837	0.001	59.048
	16	1.105	1.109	1.107	67.054	0.003	65.195
1.20%	0	0.518	0.519	0.519	4.806	0.001	3.110
	4	0.886	0.884	0.885	31.114	0.001	29.354
	8	0.989	0.992	0.991	51.805	0.002	49.980
	12	1.010	1.012	1.011	70.404	0.001	68.615
	16	1.035	1.038	1.037	72.058	0.002	70.200

F.1 Tabel 1/[S] dengan 1/Vo

$\frac{1}{[S]}$	$V_o$	$\frac{1}{V_o}$
1000.0	1.1427	0.8751
333.3	2.4063	0.4156
200.0	3.0673	0.3260
166.7	3.4747	0.2878
125.0	4.0129	0.2492
90.9	4.3360	0.2306



$$y = mx + C$$

$$y = 0.0007x + 0.1718$$

$$\frac{1}{V_o} = 0.0007x + 0.1718$$

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$\frac{1}{V_{max}} = 0.1718$$

$$V_{max} = 5.8207$$

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 0.0007$$

$$\frac{K_m}{5.8207} = 0.0007$$

$$K_m = 0.00407$$

$$K_m = 4.07 \times 10^{-3}$$

