



**KINETIKA ENZIM ENDO- β -1,4-D-XILANASE PADA
HIDROLISIS SUBSTRAT XILAN KULIT SINGKONG**

SKRIPSI

Oleh
Dewanti Oktaviana Khoirulloh
NIM 111810301024

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



**KINETIKA ENZIM ENDO- β -1,4-D-XILANASE PADA
HIDROLISIS SUBSTRAT XILAN KULIT SINGKONG**

SKRIPSI

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

Oleh

Dewanti Oktaviana Khoirulloh

NIM 111810301024

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

2016

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ibunda Kominingsih dan Ayahanda Hartono yang telah memberikan segenap kasih sayang dan doa yang tak pernah ada habisnya. Terimakasih telah membuatku bisa bertahan dan kuat hingga menjadi kebanggaanmu;
2. Mbakku Herdika Lestiyarningsih yang senantiasa memberikan semangat, dukungan, dan kasih sayang baik ketika jauh maupun dekat;
3. Sanggam Atmajaya Nugraha yang telah memberikan semangat dan mendengarkan segala keluh kesahku;
4. Guru-guruku sejak TK hingga Perguruan Tinggi;
5. Almamater tercinta Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang ku banggakan.

MOTO

Sesungguhnya Allah Tidak Akan Mengubah Nasib Suatu Kaum Hingga Mereka
Mengubah diri Mereka Sendiri
(Terjemahan Surat Ar Ra'd: 11)^{*)}

Bermimpilah Karena Tuhan akan Memeluk Mimpi-mimpi itu ^{**)}



^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. *Al-Quran dan Terjemahannya*. Bandung: CV. Diponegoro

^{**)} Hirata, Andrea. 2006. *Sang Pemimpi*. Yogyakarta: Bentang Pustaka

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Dewanti Oktaviana Khoirulloh

NIM :111810301024

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “ Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase Pada Hidrolisis Substrat Xilan Kulit Singkong adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 1 Desember 2016

Yang menyatakan,

Dewanti Oktaviana Khoirulloh

111810301024

SKRIPSI

**KINETIKA ENZIM ENDO- β -1,4-D-XILANASE PADA
HIDROLISIS SUBSTRAT XILAN KULIT SINGKONG**

Oleh

Dewanti Oktaviana Khoirulloh

NIM 111810301024

Pembimbing:

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase dan Optimasi Konsentrasi Substrat Xilan dari Kulit Singkong pada Proses Hidrolisis untuk Memproduksi Xilooligosakarida” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada :

hari,tanggal : JUM'AT 23 DEC 2016

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam

Tim Penguji:

Ketua



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

Anggota I



drh. Wuryanti Handayani, M.Si
NIP. 196008221985032002

Anggota II,



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

Anggota III,



Novita Andarini, S.Si., M.Si
NIP. 197211122000032001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember



Dr. Sujito, Ph. D
NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase Pada Hidrolisis Substrat Xilan Kulit Singkong; Dewanti Oktaviana Khoirulloh, 111810301024; 2016: 48 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Endo- β -1,4-D-xilanase adalah salah satu jenis enzim hidrolase yang berperan menghidrolisis ikatan β -1,4-D-xilosida pada xilan untuk menghasilkan xilooligosakarida. Xilan merupakan salah satu penyusun hemiselulosa yang termasuk dalam jenis polisakarida. Penelitian ini menggunakan xilan yang bersumber dari limbah pertanian yakni kulit singkong. Penelitian yang telah dilakukan yaitu menghidrolisis xilan yang bersumber dari kulit singkong menjadi produk berupa xilooligosakarida dengan menggunakan Endo- β -1,4-D-xilanase yang berasal dari isolat mikroorganisme *Bacillus, sp* yang telah diisolasi dari abdomen rayap. Enzim sebelum digunakan dilakukan pemurnian terlebih dahulu. Tahapan pemurnian enzim melalui 2 tahapan yaitu fraksinasi ammonium sulfat pada fraksi 50% dan dialisis. Hasil enzim yang lebih murni ini digunakan untuk optimasi konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim. Optimasi konsentrasi substrat dilakukan dengan menginkubasi enzim yang lebih murni dengan variasi konsentrasi substrat dari 0,1% sampai 1,1% dengan rentang 0,1 sedangkan konsentrasi enzim dijaga konstan. Waktu inkubasi yang digunakan adalah selama 20 jam sedangkan suhu yang digunakan adalah 40°C. Hasil optimasi konsentrasi substrat digunakan untuk mengoptimasi konsentrasi enzim. Hasil optimasi konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim dilihat dengan menggunakan parameter jumlah total gula reduksi. Produk yang dihasilkan pada optimasi konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim kemudian dilakukan pengujian jenis xilooligosakarida dengan menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatography*).

Pengujian yang dilakukan selanjutnya pengujian kinetika enzim. Parameter yang diukur pada kinetika enzim adalah K_M dan V_{max} . Pengukuran kinetika enzim dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi substrat 0,3% sampai konsentrasi substrat 1,1% dengan variasi waktu inkubasi selama 0 jam sampai 20

jam dengan rentang 4 jam. Konsentrasi enzim yang digunakan pada uji kinetika enzim merupakan konsentrasi enzim yang diperoleh pada optimasi enzim dan dijaga konstan.

Konsentrasi enzim yang diperoleh dalam tahapan pemurnian adalah sebesar 0,049 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 1,043U/mg. Besar total gula reduksi maksimal yang dihasilkan pada variasi konsentrasi substrat adalah sebesar 1,036 mg/ml pada konsentrasi substrat 0,7% sedangkan pada variasi konsentrasi enzim diperoleh total gula reduksi maksimal adalah sebesar 1,099 mg/ml pada konsentrasi enzim 0,040 U/ml. Analisa KLT yang telah dilakukan pada produk hidrolisis menunjukkan beberapa spot yang tampak pada plat yaitu xilotriosa, xilotetrosa dan xilopentosa, namun spot yang paling tebal terdapat diantara xilotetrosa dan xilopentosa. Uji kinetika yang telah dilakukan menghasilkan nilai K_M dan V_{max} secara berturut-turut sebesar $4,77 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$ dan $0,053 \text{mg/ml.jam}$.

PRAKATA

Puji Syukur Ke Hadirat Allah SWT Atas Segala Rahmat Dan Karunia-Nya Sehingga Penulis Dapat Menyelesaikan Skripsi Yang Berjudul “Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase Pada Hidrolisis Substrat Xilan Kulit 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 terimakasih kepada :

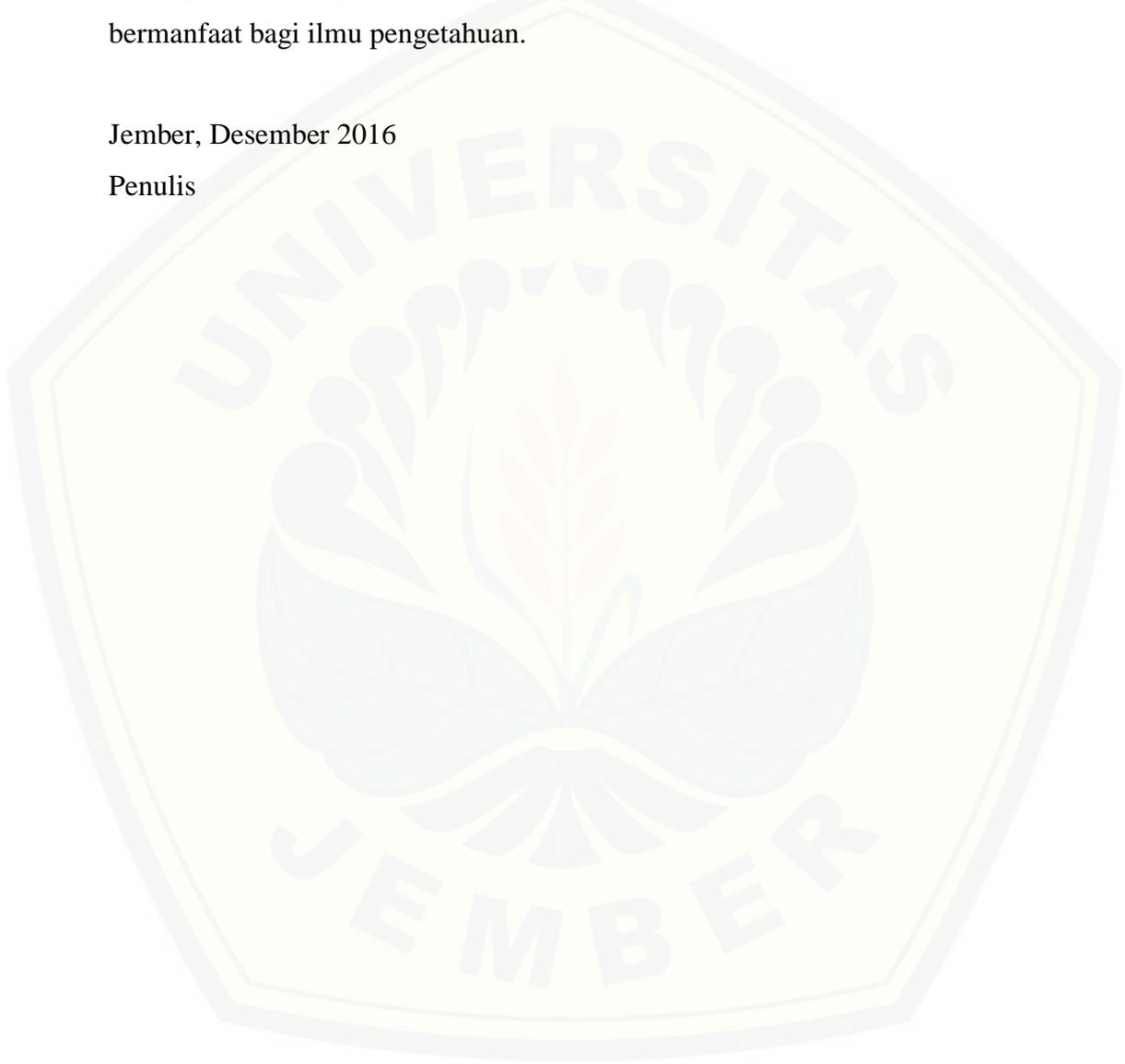
1. Drs. Sujito, Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama serta drh. Wuryanti Handayani, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si., selaku Dosen Penguji I serta Novita Andarini, S.Si., M.Si., selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktunya untuk menguji serta memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. Tri Mulyono, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
6. teman-teman SOLVENT angkatan 2011 terimakasih atas semangat, bantuan, kritik, saran, pengalaman yang telah diberikan;
7. keluarga besar *xilanase group*, mbak Siti Nur Avida, mbak Dwi Melia Rahmawati, mbah Santi, mbak Vita, mbak Wardah, Vike, Marena, Handa dan Linda Faiqotul, terimakasih atas saran, kerjasama dan bantuan baik berupa tenaga maupun pikiran;

8. sahabatku Anis Najmatul, Faiz, Fitriah dan Rosita yang senantiasa memberikan motivasi dan hiburan
9. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan.

Jember, Desember 2016

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Enzim dan Faktor-faktor yang Mempengaruhi	5
2.2 Xilan	7
2.3 Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase	10
2.4 Xilooligosakarida	12
2.5 Kulit Singkong	15
2.6 KLT (Kromatografi Lapis Tipis)	16
2.7 Kinetika Enzim	17
BAB 3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	20

3.2	Alat Penelitian	20
3.3	Bahan Penelitian	20
3.4	Diagram Alir Penelitian	22
3.5	Prosedur Kerja	23
	3.5.1 Pemurnian Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase	23
	3.5.2 Optimasi Konsentrasi Substrat Xilan dan Deteksi Produk Pemurnian Hidrolisat	29
	3.5.3 Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase dan Deteksi Produk Pemurnian Hidrolisat	30
	3.5.4 Studi Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase	30
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1	Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase Murni	31
4.2	Konsentrasi Substrat Xilan Kulit Singkong terhadap Hasil Hidrolisis Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase	37
4.3	Konsentrasi Enzim optimum terhadap substrat xilan kulit singkong	42
4.4	Kinetika Reaksi Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase	43
BAB 5.	PENUTUP	46
5.1	Kesimpulan	46
5.2	Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	51

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Mekanisme Katalitik Keluarga Enzim endo- β -1,4-D-Xilanase	11
2.2 Mikroorganisme Penghasil Xilanase.....	12
2.3 Jenis Prebiotik	14
2.4 Kandungan Kimia dari Kulit singkong	16
4.1 Optimasi Hasil Fraksinasi Ammonium Sulfat	34
4.2 Aktivitas dan Kadar protein Enzim endo- β -1,4-D-Xilanase Hasil Fraksinasi dan Dialisis	36

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Stuktur Struktur Xilan dan Letak Pemotongan Ikatan oleh Enzim	
Endo- β -1,4-D-Xilanase	8
2.2 Struktur Xilan dari Beberapa Sumber	9
2.3 Mekanisme Katalitik <i>Retaining</i>	11
2.4 Struktur Dasar Xilooligosakarida.....	13
2.5 Kurva Plot Lineweaver-Burk	19
4.1 Koloni Bakteri Tumbuh pada Media LB Padat.....	32
4.2 Media Inokulum Sebelum diberi Bakteri dan Sesudah diberi Koloni Bakteri.....	33
4.3 Reaksi Redoks antara Xilosa dengan asam 3,5-dinitrosalisilat.....	36
4.4 Kurva Total Gula Reduksi pada Variasi Konsentrasi Substrat	39
4.5 Kromatogram Produk Hidrolisis	40
4.6 Persamaan Reaksi Visualisasi Xilosa pada Plat KLT	41
4.7 Kurva Total Gula Reduksi pada Variasi Konsentrasi Enzim.....	42
4.8 Grafik Lineweaver Bulk.....	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Kurva Regresi Hasil Penelitian	51
3.1.1 Kurva Standar Xilosa Pada Panjang Gelombang 550 nm	51
3.1.2 Kurva Standar BSA Pada Panjang Gelombang 595 nm.....	52
3.2 Data Hasil Pengamatan	53
3.2.1 Pengukuran Aktivitas Endo- β -D-Xilanase dengan Metode Miller	53
3.2.2 Pengukuran Kadar Protein Endo- β -1,4-D-Xilanase dengan Metode Bradford dan Aktivitas Spesifik	55
3.2.3 Rumus Perhitungan Total Gula Pereduksi	57
3.2.4 Hasil Hidrolisis Variasi Konsentrasi Substrat Xilan Kulit Singkong Steam Delignifikasi.....	58
3.2.5 Hasil Hidrolisis Variasi Konsentrasi Enzim Terhadap Substrat Xilan Kulit Steam Singkong Delignifikasi	60
3.3 Kromatogram produk hidrolisis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	63
3.4 Parameter Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase.....	64
3.4.1 Penentuan nilai K_M dan V_{max} dari Enzim terhadap Substrat Xilan Kulit Singkong.....	64
3.4.2 Perhitungan Nilai K_M dan V_{max} dengan Garis Linear Kurva Liveweaver Bulk.....	68

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan katalis biologis yang berfungsi untuk mempercepat reaksi dalam sel hidup yang bekerja secara spesifik. Enzim hanya dapat bekerja pada molekul yang tepat yang dinamakan substrat. Substrat ini bertindak sebagai reaktan (Chang, 2010). Enzim dapat berikatan dengan substrat karena enzim memiliki sisi katalitik. Sisi katalitik ini memiliki residu katalitik yang dapat berikatan lebih dari 1 molekul substrat. Kerja enzim dicirikan dengan terbentuknya suatu kompleks antara enzim dan substrat (kompleks ES), namun terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kerja enzim yaitu konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH dan suhu (Nelson & Cox, 2010).

Konsentrasi substrat dan atau konsentrasi enzim pada reaksi enzimatik dapat mempengaruhi laju reaksi. Substrat akan berikatan dengan enzim membentuk kompleks enzim-substrat (ES), ketika terjadi penambahan konsentrasi substrat akan terjadi peningkatan kecepatan reaksi katalis dengan tersedianya molekul enzim yang berikatan dengan substrat. Kecepatan katalis akan terus bertambah, hingga mencapai suatu titik maksimum, dimana dengan adanya penambahan konsentrasi substrat dan enzim tidak dapat lagi menambah laju reaksi, kondisi ini dinamakan kondisi optimum. Faktor yang selanjutnya adalah pH dan suhu. pH merupakan banyaknya ion hidrogen (H^+). Perubahan pH yang sangat ekstrim akan mempengaruhi perubahan konformasi enzim yang mengakibatkan aktivitas enzim terganggu ketika enzim berada pada lingkungan pH yang tidak sesuai (Nelson, 1997). Suhu juga berpengaruh pada laju reaksi karena molekul substrat dan enzim akan yang lebih sering bertumbukan sehingga akan mempercepat terbentuknya produk, namun apabila suhu yang digunakan terlalu tinggi akan memecahkan ikatan kimia yang ada pada enzim sehingga akan terjadi penurunan pada produk yang dihasilkan (Chang, 2010). Pengaruh pH dan suhu dapat diamati pada penelitian sebelumnya yaitu Kurniawan (2015). Penelitian yang telah dilakukan yaitu tentang optimasi pH dan suhu pada proses hidrolisis enzimatik dengan enzim endo-1,4- β -endoxilanasase dan substrat xilan oat. Hasil maksimal yang

diperoleh pada penelitian tersebut yaitu pada pH 5 dan suhu 50°C. Hal ini dapat dilihat bahwa pH dan suhu berpengaruh pada kerja enzim.

Enzim endo- β -1,4-D-xilanase merupakan salah satu golongan enzim xilanolitik. Enzim xilanolitik merupakan salah satu jenis enzim glikosidase hidrolase (GH: E.C. 3.2.1.-) yang mampu menghidrolisis karbohidrat (Motta, 2013). Enzim endo- β -1,4-D-xilanase bertanggung jawab dalam pemutusan ikatan glikosidik pada xilan menjadi xilooligomer rantai pendek (Motta, 2013). Salah satu jenis xilooligomer yang dihasilkan yaitu xilooligosakarida (XOs). XOs merupakan oligomer gula yang tersusun atas monomer berupa xilosa dengan polimerisasi antara 2 sampai 10. XOs dapat menstimulasi atau merangsang pertumbuhan ataupun aktivitas sejumlah bakteri pada kolon, bermanfaat bagi kesehatan dan dapat digunakan sebagai prebiotik, sehingga dapat ditambahkan sebagai komposisi pada bahan pangan (Akpinar, 2009).

XOs ini dapat dihasilkan dari proses reaksi enzimatik dari Enzim endo-1,4- β -endoxilanase dengan substrat berupa xilan. Xilan merupakan salah satu penyusun hemiselulosa, yang termasuk dalam jenis polisakarida yang terdapat pada dinding sel tanaman. Xilan biasanya ditemukan dominan pada tanaman tahunan, sekitar 30% terdapat pada dinding sel dan 25-35% banyak terdapat pada bahan lignoselulosa contohnya pada limbah pertanian (Verbeek, 2012). XOs yang diproduksi dari limbah hasil pertanian misalnya limbah pertanian yang berasal dari tongkol jagung yang telah diteliti oleh Aachary (2009) dan penelitian Chapla (2009) dari batang tembakau. Hal ini dapat membuktikan bahwa XOs dapat dihasilkan dari substrat xilan yang berasal dari limbah pertanian.

Kulit singkong merupakan salah satu jenis limbah pertanian yang banyak ditemukan pada industri rumahan pengolahan singkong seperti pembuatan tepung tapioka, tape dan jenis pangan lain yang berbahan dasar singkong. Pemilihan kulit sebagai substrat xilan karena kulit singkong mengandung hemiselulosa sebanyak 2,48% (Adriani, 2012).

Penelitian yang akan dilakukan adalah memproduksi xilooligosakarida dengan sumber xilan yang telah diekstrak dari kulit singkong melalui proses hidrolisis enzimatik menggunakan enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase.

Xilooligosakarida yang diperoleh akan dianalisis komponen penyusun xilooligosakarida yang terkandung dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Studi kinetika yang akan dilakukan pada penelitian ini untuk mencari nilai K_M dan V_{max} dari enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat diambil beberapa rumusan masalah yakni :

1. berapakah konsentrasi substrat xilan dari kulit singkong yang dapat menghasilkan produk xilooligosakarida maksimal dari proses hidrolisis enzimatik?
2. berapakah konsentrasi enzim yang dapat menghasilkan produk xilooligosakarida maksimal dari proses hidrolisis enzimatik xilan dari kulit singkong?
3. apakah komposisi penyusun xilooligosakarida yang dihasilkan dari proses hidrolisis xilan kulit singkong?
4. berapakah nilai K_M dan V_{max} dari enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Xilan yang digunakan pada penelitian ini adalah xilan yang berhasil diisolasi pada penelitian sebelumnya dari kulit singkong.
2. Enzim yang digunakan pada penelitian ini adalah enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase yang berasal dari isolat bakteri asal abdomen rayap
3. Kondisi hidrolisis enzimatik yang digunakan adalah pH 5, suhu 40°C, dan waktu inkubasi yang digunakan 20 jam.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. mengetahui konsentrasi optimum substrat xilan kulit singkong yang dapat menghasilkan xilooligosakarida maksimum dari proses hidrolisis enzimatik,

2. mengetahui konsentrasi enzim optimum yang dapat menghasilkan xilooligosakarida maksimum dari proses hidrolisis enzimatik xilan kulit singkong,
3. mengetahui komposisi penyusun xilooligosakarida yang dihasilkan dari proses hidrolisis xilan kulit singkong,
4. mengetahui nilai K_M dan V_{max} dari enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat untuk memberikan nilai guna pada kulit singkong yang biasanya hanya dijadikan sebagai limbah menjadi penghasil xilan yang dapat digunakan untuk mensintesis xilooligosakarida yang merupakan jenis prebiotik yang berguna sebagai tambahan pada produk pangan

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim dan Faktor-faktor yang Mempengaruhi

Menurut Chang (2010) bahwa enzim merupakan katalis biologis yang berfungsi untuk mempercepat reaksi dalam sel hidup, namun enzim tidak hanya dapat mempercepat reaksi, tetapi enzim juga bekerja secara spesifik. Enzim hanya dapat bekerja pada molekul yang tepat yang dinamakan substrat yang bertindak sebagai reaktan. Enzim dapat berikatan dengan substrat karena enzim memiliki sisi katalitik yang memiliki residu katalitik yang dapat berikatan lebih dari 1 molekul substrat. Sisi aktif inilah merupakan tempat dimana enzim dan substrat dapat berikatan. Kerja enzim dicirikan dengan terbentuknya suatu kompleks antara enzim dan substrat (kompleks ES), namun terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim yaitu konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH dan suhu (Nelson *et.al.*, 2010).

Aktivitas enzim merupakan kemampuan enzim untuk mengkatalis suatu substrat. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim antara lain :

a. Suhu

Menurut Chang (2010) enzim sangat sensitif dengan perubahan suhu. Suhu mempengaruhi pada energi kinetika suatu reaksi hal ini akan berpengaruh pada laju reaksi karena molekul substrat dan enzim akan yang lebih sering bertumbukan sehingga akan mempercepat terbentuknya produk. Tumbukan yang terjadi antar molekul akan diubah menjadi energi vibrasi, sehingga apabila suhu dinaikkan hingga mencapai suhu yang ekstrim akan menyebabkan tumbukan lebih sering terjadi dan akan mengakibatkan makin besar energi vibrasi yang dapat memecahkan ikatan kimia yang ada pada enzim sehingga akan terjadi penurunan pada produk yang dihasilkan.

b. Derajat keasaman (pH)

pH merupakan banyaknya ion hidrogen (H^+) yang terdapat dalam larutan. Lingkungan enzim yang asam yaitu kondisi dimana jumlah konsentrasi ion H^+ meningkat akan menyebabkan protein cenderung mengalami protonasi, namun ketika kondisi lingkungan yang terlalu basa dimana jumlah konsentrasi ion OH^-

meningkat akan menyebabkan deprotonasi pada protein. Perubahan-perubahan ionisasi yang diakibatkan oleh pH inilah yang akan mempengaruhi perubahan korformasi enzim yang mengakibatkan aktivitas enzim terganggu ketika enzim berada pada lingkungan pH yang tidak sesuai (Nelson et.al., 1997).

c. Konsentrasi substrat

Substrat berikatan dengan enzim membentuk kompleks enzim-substrat (ES), ketika konsentrasi enzim konstan, penambahan konsentrasi substrat akan meningkatkan kecepatan reaksi katalis dengan tersedianya molekul enzim yang berikatan dengan substrat. Kecepatan katalis akan terus bertambah, hingga mencapai suatu titik maksimum, dimana dengan adanya penambahan konsentrasi substrat dan enzim tidak dapat lagi menambah laju reaksi (Nelson et.al., 1997).

Menurut (Agarwal *et.al.*, 2007) bahwa sifat enzim dapat dilihat dari dua hal yaitu dari efisiensi dan spesifikasinya. Sifat efisiensi enzim dapat dilihat pada reaksi kimia yang dikatalis oleh enzim. Kecepatan akan semakin meningkat ketika enzim digunakan pada reaksi kimia yaitu dengan menurunkan energi aktivitasnya (E_a). Energi aktivasi yang menurun ketika reaksi kimia berlangsung akan mempermudah molekul bereaksi karena meminimumkan jumlah energi yang dibutuhkan untuk bereaksi sehingga kecepatan reaksi dapat meningkat.

Enzim bekerja sangat spesifik, hanya menyerang pada substrat khusus saja. Terdapat 3 jenis spesifisitas enzim yaitu spesifisitas stereokimia, spesifisitas reaksi, dan spesifisitas substrat.

a. Stereokimia.

Reaksi biologis pada dasarnya sangat spesifik pada produk stereoisomernya. Stereoisomer merupakan isomer rumus struktur sama namun berbeda pada penyusunan atom-gugus gugus fungsi yang ada disekitar karbon. Contohnya pada katalisis maltase, hidrolisis hanya terjadi pada α bukan pada β -glikosidase.

b. Reaksi

Enzim hampir selalu, hanya mengkatalisis satu dari macam-macam reaksi yang mana substrat dapat berikatan. Contohnya pada asam oksaloasetat dapat menjalani beberapa reaksi yaitu reduksi yang dapat menghasilkan asam maleat, dekarboksilasi untuk menghasilkan asam piruvat atau menerima gugus amino

untuk menghasilkan asam aspartat, dan lain-lain. Reaksi konversi asam oksaloasetat menjadi beberapa macam produk ini menggunakan enzim yang berbeda-beda, hal ini dikarenakan karena enzim bersifat spesifik dalam hal reaksi.

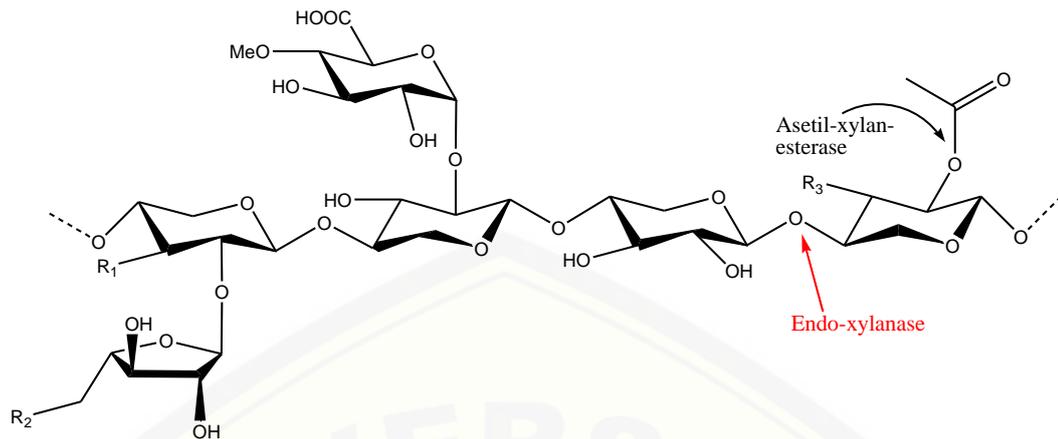
c. Substrat

Tingkat spesifisitas enzim terhadap substrat bermacam-macam tiap enzim. Spesifisitas enzim dapat dilihat dari 2 hal yaitu spesifisitas absolut dan relatif. Spesifisitas substrat absolut hanya mengkatalis satu enzim, misalnya urease yang mengkatalisis hidrolisis urea. Spesifisitas substrat relatif tergantung pada gugus atau tergantung pada ikatan. Misalnya residu tripsin yang menghidrolisis lisin dan arginin sedangkan kimotripsin yang menghidrolisis asam amino aromatik seperti fenilalanin, tripsin, dan triptofan.

Menurut Gilber (2000) bahwa kuantitas seperti miligram (mg), mikromol (μmol) dan unit jumlah lainnya apabila per satuan volume maka disebut dengan konsentrasi. Satuan konsentrasi misalnya molar (M), mikromolar (μM), miligram per mililiter (mg/ml) dan unit per mililiter (U/ml). Unit adalah jumlah enzim yang akan mengkatalis dan mengubah 1 μmol substrat menjadi produk dalam 1 menit pada kondisi yang telah diatur. Unit enzim dalam diubah menjadi miligram dari enzim jika mengetahui faktor konversi yang disebut dengan aktivitas spesifik. Aktivitas spesifik adalah jumlah aktivitas enzim per miligram dari protein (mikromol produk yang terbentuk per menit per miligram protein atau unit per miligram).

2.2 Xilan

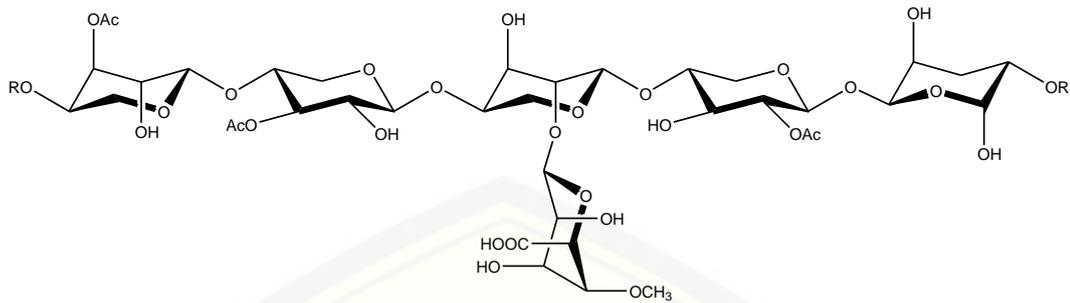
Hemiselulosa merupakan salah satu polisakarida penyusun dari dinding sel tanaman. Hemiselulosa pada dinding sel tanaman berikatan secara kovalen dengan lignin dan selulosa membentuk suatu struktur kompleks yang besar (Shallom, 2003). Komposisi penyusun hemiselulosa pada tanaman terdiri dari campuran xilan, siloglukan, glukomannan, galaktoglukomannan, arabinogalaktan, dan heteropolimer lainnya (Motta, 2013). Salah satu komponen hemiselulosa yang paling umum adalah xilan yang tersusun atas unit D-xilopiranosil yang saling terikat dengan ikatan β -1,4-glikosidik (Gambar 2.1)



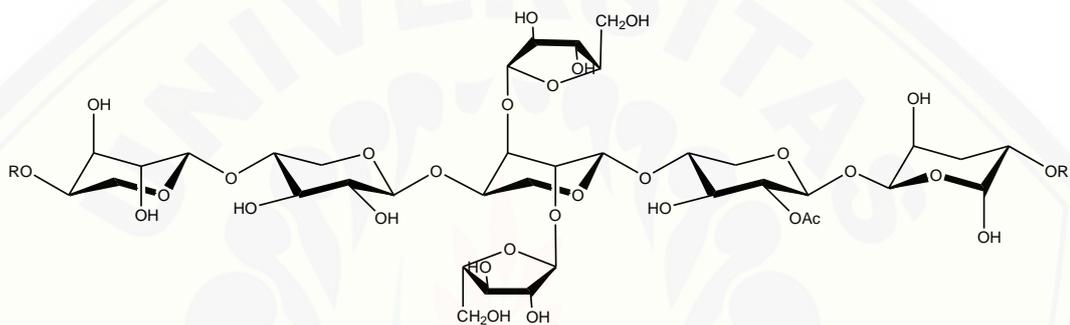
Gambar 2.1 Struktur xilan dan letak pemotongan ikatan oleh enzim endo-xilanase

(Sumber : Shallom, 2003)

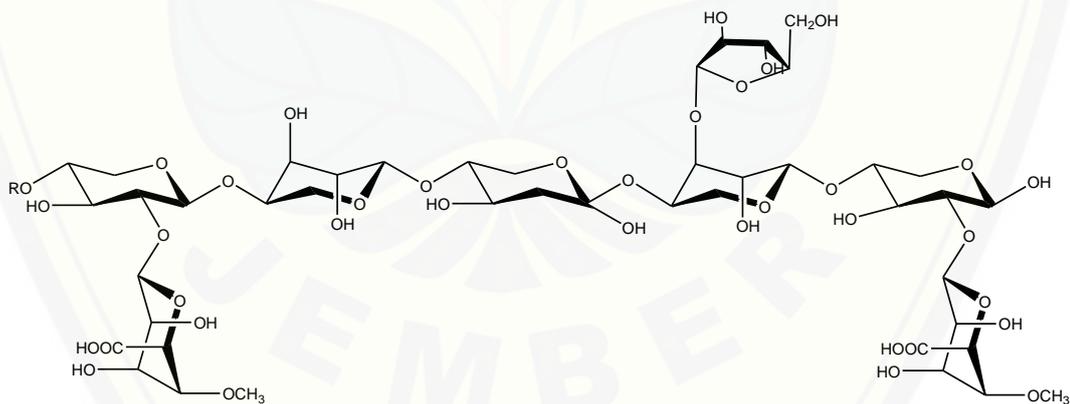
Xilan biasanya ditemukan dominan pada tanaman tahunan, sekitar 30% terdapat pada dinding sel dan 25-35% banyak terdapat pada bahan lignoselulosa contohnya pada limbah pertanian, hutan, dan hasil buangan atau ampas dari kayu keras maupun kayu lunak (Verbeek, 2012). Struktur xilan berbeda-beda tergantung pada jenis sumber tanaman (Gambar 2.2). Menurut Haan (2003) bahwa secara umum xilan tersusun dari rantai utama xilosa yang terikat pada β -1 \rightarrow 4 dan terdapat substitusi pada posisi C2 dan C3 dengan cabang arabinofuranosil, asam 4-O-metilglukoronat atau asetil dengan proses esterifikasi. Menurut Aachari (2011) bahwa adanya cabang yang berbeda-beda pada rantai utama inilah yang menyebabkan sifat biologis yang berbeda-beda).



(a)



(b)



(c)

(a) O-asetil-4-O-metilglukoronoxilan dari kayu keras, (b) Arabinoxilan dari hemiselulosa gandum, dan (c) Arabino-4-O-metilglukoronoxilan dari kayu lunak

Gambar 2.2 Struktur xilan dari beberapa sumber (Vazquez, 2000).

2.3 Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

Menurut Motta (2013) bahwa enzim xilanolitik yang menghidrolisis xilan yaitu endoxilanase (endo-1,4- β -endoxilanase, E.C.3.2.1.8), β -xilosidase (xilan-1,4- β -xilosidase, E.C. 3.2.1.37), α -glukurosidase (α -glukosiduronase, E.C. 3.2.1.139), α -arabinofuranosidase (α -L-arabinofuranosidase, E.C. 3.2.1.55) dan asetilxilan esterase (E.C. 3.2.1.72). Enzim-enzim ini bertanggung jawab terhadap perubahan xilan menjadi penyusunnya, namun dari semua jenis enzim xilanolitik, endoxilanase merupakan enzim yang paling terlibat dalam pemutusan ikatan glikosidik dan menghasilkan xilooligomer rantai pendek. Xilanase mengkatalisis reaksi hidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida (Gambar 2.3). Degradasi ini memerlukan peranan sinergis dari asetil esterase untuk menghilangkan cabang asetil dari ikatan β -1,4 D-xilosa pada xilan.

Menurut Kregel (1996) bahwa kelompok enzim yang termasuk dalam golongan Glikosidase Hidrolase (GH) dibagi menjadi beberapa famili yaitu GH 5, 8, 10, 11, dan 43. Famili xilanase yaitu famili 10 (yang diberi symbol F) dan famili 11 (diberi symbol G). Xilanase famili F lebih besar dan memiliki massa molekul mendekati 35 kDa, sedangkan famili G hanya memiliki massa molekul sebesar 20 kDa. Famili enzim ini, masing-masing memiliki sifat fisikokimia (titik isoelektrik dan massa molekul) yang berbeda (Shallom, 2003). Keluarga enzim ini selain berbeda dalam hal sifat fisikokimia juga memiliki mekanisme enzimatik yang berbeda beda pula (Tabel 2.1).

Menurut Collins (2003) bahwa jenis mekanisme katalitik yang terjadi pada kelompok enzim xilanase ini dibagi menjadi 2 jenis yaitu *retaining* dan *inverting*. Mekanisme katalitik yang terjadi pada famili 10 dan 11 adalah melalui *retaining*. Mekanisme *retaining* terjadi 2 residu glutamat yang menjadi sisi aktif enzim. Mekanisme ini melibatkan mekanisme S_N2 (*double displacement*). Hasil pertama yang diperoleh pada mekanisme ini berupa intermediet antara glicosil-enzim dan selanjutnya dihidrolisis via ion oksokarbenium seperti keadaan transisi. Kedua residu asam karboksilat pada enzim merupakan sisi aktif yang terlibat dalam pembentukan intermediet, salah satunya berperan sebagai katalis asam umum

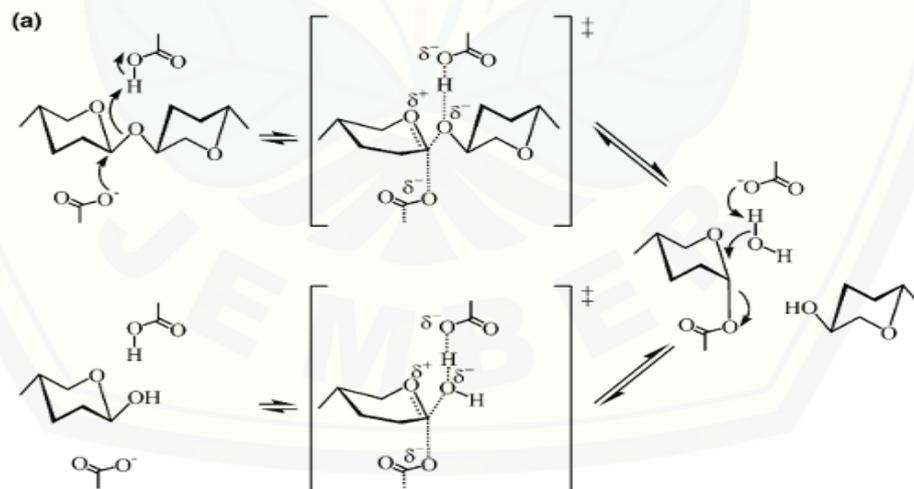
yang memprotonasi substrat yang lain berperan sebagai serangan nukleofilik yang membentuk intermediet α -glikosil enzim (inversi $\beta \rightarrow \alpha$).

Tabel 2.1 Mekanisme Katalitik keluarga enzim endo-1,4- β -D-endoxilanase

Keluarga Glikosida Hidrolase (GH)	Mekanisme katalitik
5	<i>Retaining</i> (Menahan)
7	<i>Retaining</i> (Menahan)
8	<i>Inverting</i> (Membalik)
9	<i>Retaining</i> (Menahan)
10	<i>Retaining</i> (Menahan)
11	<i>Retaining</i> (Menahan)
43	<i>Inverting</i> (Membalik)

Sumber : Collins, (2003)

Langkah kedua adalah gugus karboksilat yang dihasilkan pada langkah pertama akan berperan sebagai basa yang akan menarik proton dari molekul air yang berperan sebagai nukleofilik. Tahapan kedua ini akan menghasilkan ion oksokarbenium kembali untuk meningkatkan produk dengan konfigurasi β (Inversi $\alpha \rightarrow \beta$). Hasil ini merupakan keseluruhan dari mekanisme retensi (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 mekanisme katalitik *retaining*

Xilanase umumnya merupakan protein kecil dengan berat molekul antara 15.000-30.000 Dalton, aktif pada suhu 55°C dengan pH 9, namun pada suhu 60°C dan pH normal xilanase bersifat stabil (Richana, 2002). Menurut Ratnadewi

(2007) bahwa umumnya xilanase dihasilkan oleh jenis mikroorganisme seperti jamur dan bakteri (Tabel 2.2). Xilanase yang berasal dari bakteri termofilik seperti *Thermonospora fusca*, *Bacillus sp* dan *Bacillus stearothermophilus* memperlihatkan suhu optimum kisaran 65 sampai 80°C. Xilanase-A yang dihasilkan oleh anaerob termofilik *Clostridium stercorarium* mempunyai temperatur optimum 70°C dan waktu paruh pada temperatur 80°C selama 90 menit.

Tabel 2.2 Mikroorganisme penghasil xilanase

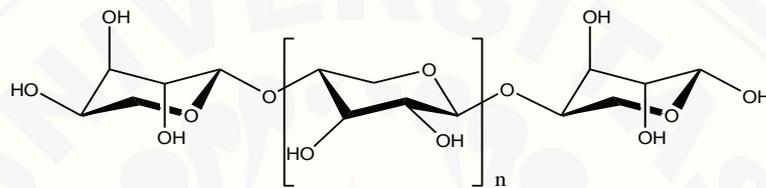
Mikroorganisme	Suhu tumbuh (°C)	Suhu optimum (°C)	pH	Berat molekul (kDa)
Jamur				
<i>Aspergillus sp.</i>	24-30	45-60	4,5-6	22,0-46,5
<i>Aureobasidium sp</i>	28	45-54	4,5-4,8	20-25,0
<i>Bipolaris sorokinana</i>	28	70	5,5	30,0
<i>Cryptococcus Flavus</i>	20	55	4,5	25,0
<i>Fusarium Oxysporium</i>	26	50	5,0	80,0
<i>Penicillium sp.</i>	25	40	6,0	35,0
<i>Trichoderma sp.</i>	25-30	50-60	3,5-6,5	1,8-32
Bakteri				
<i>Bacillus sp.</i>	37-50	50-70	6,0-10,0	16-43
<i>Clostridium sp.</i>	37-65	50-75	5,5-7,0	29,0-72,0
<i>Streptomyces sp.</i>	36-50	50-72	4,5-8,0	21,0-50
<i>Thermotoga sp.</i>	77-80	80-105	5,4-6,2	40-120
<i>Aeromonas sp.</i>	30	30-55	5,0-7,0	22-58,0

Sumber : Sunna (1997).

2.4 Xilooligosakarida

Menurut Achary (2011) bahwa xilooligosakarida (XOS) adalah oligomer gula yang tersusun atas unit xilosa yang biasanya terdapat pada tunas bambu, buah-buahan, sayur-sayuran, susu dan madu. XOS dihasilkan melalui proses hidrolisis xilan yang merupakan unsur penyusun hemiselulosa tanaman terbesar.

Struktur dari XOS bermacam-macam tergantung pada asal xilan yang digunakan sebagai bahan baku produksi XOS, derajat polimerisasinya (DP), unit monomer penyusunnya, dan tipe ikatannya. XOS secara umum merupakan campuran oligosakarida yang dibentuk oleh residu xilosa dengan ikatan β -(1 \rightarrow 4) (Gambar 2.4). Jumlah residu xilosa yang terlibat dalam pembentukan XOS bermacam-macam dari 2 sampai 10 yang biasa disebut dengan xilobiosa, xilotriosa, xilotetrosa, dan seterusnya. Jumlah residu xilosa yang biasa digunakan untuk aplikasi pada makanan adalah xilobiosa (DP=2).



Gambar 2.4 Struktur dasar xilooligosakarida (Kumar *et al.*, 2012).

XOS memiliki rasa yang manis sehingga sesuai digunakan sebagai bahan tambahan pangan (Bullock, 2005). XOS diperoleh dari karbohidrat yang kaya lignoselulosa dan berpotensi pada pemanfaatannya dibidang industri kimia, makanan, dan obat-obatan, selain itu juga dapat digunakan di sektor peternakan sebagai bahan tambahan pakan ternak untuk meningkatkan pertumbuhan ternak (Xiao *et al.*, 2013). Sintesis XOS dengan berat molekul besar dari eter dan ester digunakan plastik *biodegradable*, kapsul dan tablet (Nabarlatz *et al.*, 2007).

XOS dapat menstimulasi atau merangsang pertumbuhan ataupun aktivitas sejumlah bakteri pada kolon, bermanfaat bagi kesehatan dan dapat digunakan sebagai prebiotik, sehingga dapat ditambahkan sebagai komposisi pada bahan pangan (Tabel 2.3) (Akpinar, 2009). 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 (Boonchuay, 2012). XOS juga bermanfaat untuk mereduksi kolesterol, meningkatkan ketersediaan biologis kalsium, mereduksi resiko kanker

kolon, memberikan pengaruh sitotoksik pada sel leukemia manusia, dan bermanfaat bagi penderita penyakit diabetes melitus (Akpinar, 2011).

Menurut Vazquez (2001) bahwa XOS dapat diproduksi dari bahan yang kaya lignoselulosa. Konsep produksi XOS dari bahan yang kaya lignoselulosa yaitu dimulai dari bahan xilan yang berperan sebagai bahan awal yang terdapat beberapa ikatan heterosiklik eter kemudian dihidrolisis menjadi senyawa yang memiliki derajat polimerisasi yang rendah. Produksi XOS dapat dilakukan dengan 3 cara:

- a. Perlakuan enzim langsung pada xilan yang terkandung pada bahan yang berlignoselulosa
- b. Fraksinasi kimia dari bahan lignoselulosa yang sesuai menghasilkan isolat xilan dan kemudian melalui proses lebih hidrolisis enzimatik lebih lanjut pada xilan dan kemudian menghasilkan XOS.
- c. Degradasi hidrolitik dari xilan menjadi XOS melalui penguapan air atau larutan dari asam mineral

Tabel 2.3 Jenis prebiotik

Prebiotik	Metode produksi
Inulin [Fruktooligosakarida (FOS)]	Polimerisasi monomer fluktosa
Galaktooligosakarida (GOS)	Transgalaktosilasi laktosa dengan enzim
Xilooligosakarida (XOS)	Hidrolisis xilan dengan enzim
Isomaltooligosakarida (IMO)	Transglukosilasi pati
Laktulosa	Isomerisasi laktosa

Sumber : Vernazza *et al.*, (2006)

Menurut Akpinar (2009) bahwa XOS yang dihasilkan melalui metode kimia, metode enzimatik atau gabungan dari metode kimia dan metode enzimatik. Metode pertama yaitu metode kimia dilakukan dengan pemanasan material yang mengandung xilan pada air atau uap kemudian dilarutkan pada larutan mineral asam atau larutan alkali. Uap panas inilah yang akan mendegradasi xilan menjadi rantai yang lebih pendek. Proses ini disebut juga dengan autohidrolisis. Metode kedua yaitu metode enzimatik dilakukan dengan hidrolisis menggunakan enzim. Menurut (Chapla *et al.*, 2012) bahwa metode kedua lebih dipilih untuk menghasilkan XOS dibandingkan dengan metode kimia dan gabungan keduanya, hal ini dikarenakan metode enzimatik tidak membutuhkan peralatan yang rumit dan tidak

mebutuhkan suhu dan tekanan yang tinggi . Menurut Wyman (2013) kelemahan dari metode enzimatik ini adalah membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan proses hidrolisis asam atau autohidrolisis, selain itu sumber xilan yang digunakan yang berbeda akan menghasilkan XOS yang berbeda pula.

2.5 Kulit Singkong

Singkong merupakan tanaman perdu yang berasal dari benua Amerika, tepatnya dari negara Brasil, tanaman ini masuk ke Indonesia pada tahun 1852 (Purwono, 2009). Produktivitas singkong di Indonesia sebesar 22.677.866 ton, sedangkan di Jawa Timur produktivitas singkong mencapai 5 juta ton (Badan Pusat Statistika, 2012).

Potensi kulit singkong di Indonesia sangat melimpah, seiring dengan eksistensi negara ini sebagai salah satu penghasil singkong terbesar di dunia. Setiap kilogram singkong biasanya dapat menghasilkan 15 – 20% kulit singkong (Hidayat, 2009), sehingga apabila dihitung kulit singkong di Jawa Timur pada tahun 2012 mencapai 800.000 ton. Kulit singkong selama ini belum dimanfaatkan secara optimal. Kulit singkong termasuk salah satu bahan baku pakan ternak yang mempunyai energi (TDN) tinggi dan masih mengandung bahan-bahan organik seperti karbohidrat, protein, lemak dan mineral (Juliarti & Iis, 2013).

Menurut (Hanifah *et al.*, 2010) bahwa peternak memberikan kulit singkong ke hewan ternak hanya sebatas pada pengetahuan mereka. Peternak di Sukabumi memberikan kulit singkong secara langsung ke ternak. Peternak dibogor memberikan kulit singkong dalam bentuk cacahan. Kulit singkong dapat diolah melalui beberapa perlakuan sebelum diberikan ke hewan ternak, sehingga dapat meningkatkan nilai nutrisinya dan juga mengurangi kadar sianida yang membahayakan.

Tabel 2.4 merupakan kandungan kimia dari kulit singkong menurut penelitian Adriani *et al.*, (2012).

Tabel 2.4 Kandungan Kimia dari Kulit Singkong

Kandungan	Jumlah
Air	8,31
Abu (%)	6,75
Protein kasar (%)	4,63
Serat kasar (%)	13,04
Lemak kasar (%)	1,99
EB (kkal)	3510
Lignin (%)	7,88
Selulosa (%)	6,06
Hemiselulosa (%)	2,48
Asam sianida (ppm)	256,142
Glukosa	7,3602
Pati	30,8721

2.6 KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu jenis metode kromatografi planar. Prinsip kerna dari KLT adalah pergerakan fase gerak terhadap fase diam dengan peranan kapiler atau terkadang dengan gravitasi atau potensial listrik (Skoog et. al., 2004). Menurut (Rohman & Gandjar, 2007) bahwa proses pemisahan/identifikasi menggunakan KLT melalui penotolan campuran senyawa yang akan dipisahkan pada permukaan plat tipis lalu dielusi 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.

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). Menurut (Holme & Peck, 1998) bahwa 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.

2.7 Kinetika Enzim

Ahli biokimia pada umumnya menggunakan beberapa pendekatan untuk memahami mekanisme reaksi enzimatik. Salah satu pendekatan yang paling lama digunakan adalah dengan menentukan laju reaksi perubahan yang disebut sebagai kinetika enzim. Salah satu pendekatan yang paling sederhana dalam percobaan kinetika adalah menghitung kecepatan awal (V_0) (Nelson dan Cox, 2008).

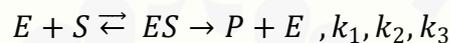
Wiesman (dalam Putra, 2009) menyatakan bahwa:

harga kecepatan pada reaksi enzimatik akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat $[S]$, akan tetapi setelah $[S]$ meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap, dimana penambahan $[S]$ tidak akan menambah lagi kecepatan reaksi hal ini disebut dengan kecepatan maksimum (V_{maks}). V_{max} merupakan salah satu parameter kinetika enzim. Parameter kinetika yang lain adalah konstanta *Michaelis-Menten*, yang lebih dikenal dengan K_M . K_M merupakan konsentrasi substrat ketika mencapai dari setengah V_{maks} . Nilai K_M dapat digunakan dalam menentukan ukuran afinitas enzim-substrat (E-S) yang merupakan suatu indikator kekuatan ikatan kompleks E-S atau suatu tetapan keseimbangan untuk disosiasi kompleks E-S menjadi E dan S. Nilai K_M kecil berarti kompleks E-S mantap, afinitas enzim tinggi terhadap substrat, sedangkan bila K_M besar berlaku sebaliknya.

Menurut (Nelson *et al.*, 2008) bahwa reaksi yang dikatalis oleh enzim, pada sistem enzim terdapat dalam bentuk E bebas dan E dalam bentuk berikatan dengan substrat membentuk ES. Ketika konsentrasi substrat pada sistem rendah maka pada sistem banyak enzim dalam bebas (E). Laju reaksi akan sebanding dengan konsentrasi substrat, ketika konsentrasi substrat meningkat maka akan banyak terbentuk kompleks ES didalamnya. Ketika semua enzim telah

membentuk kompleks ES maka laju pada keadaan ini adalah V_{max} . Kondisi ini menyebabkan enzim menjadi jenuh sehingga dengan adanya penambahan konsentrasi substrat tidak akan mempengaruhi kecepatan reaksi.

Laju reaksi pada reaksi enzimatik ketika konsentrasi substrat tetap maka kenaikan laju akan berbanding lurus dengan konsentrasi enzim, sedangkan bila konsentrasi enzim yang tetap maka kenaikan laju reaksi akan berbanding lurus dengan konsentrasi substrat. Namun, pada konsentrasi substrat yang tinggi, laju reaksi tidak meningkat lagi dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Keadaan ini laju reaksi mencapai batas maksimum dari enzim yang sudah jenuh dengan substrat. Secara sederhana, hipotesis Michaelis-Menten dapat dituliskan :



Jika $[S] \gg E$ sehingga E semuanya akan menjadi ES, maka $[ES] \approx [E]_0$ akibatnya $k_3[E]_0 = V_{maks}$. V_{max} menyatakan banyaknya molekul yang terbentuk atau substrat yang diolah secara maksimum, sehingga diperoleh persamaan Michaelis-Menten :

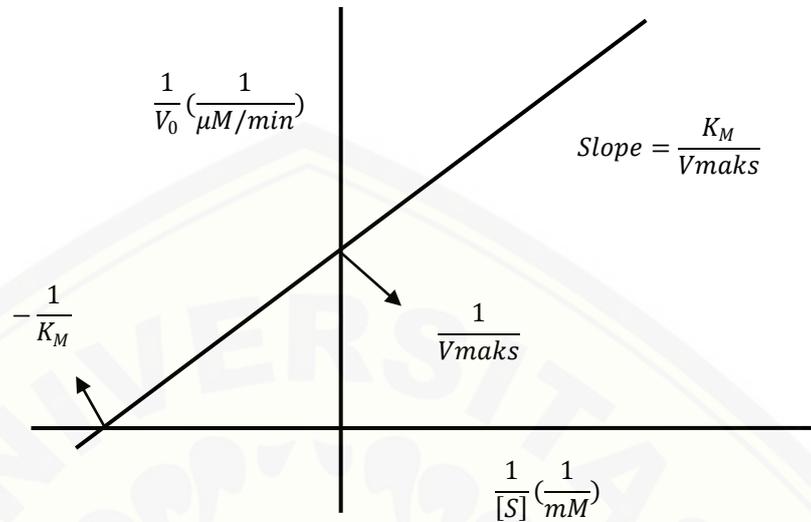
$$V = \frac{V_{maks}[S]}{K_M + [S]}$$

Penentuan nilai V_{maks} dan K_M langsung dari grafik persamaan Michaelis-Menten tidaklah selalu memuaskan karena grafiknya membentuk kurva sehingga menyulitkan untuk melakukan ekstrapolasi dengan akurat. Lineaweaver-Bulk menyelesaikan masalah diatas dengan menata ulang persamaan Michaelis-Menten kedalam bentuk persamaan linear :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Nilai V_{maks} dan K_M ditentukan dengan plot Lineaweaver-Burk seperti pada Gambar 2.5. Menurut Fersht (1999) bahwa bila nilai K_M semakin besar berarti ikatan kompleks ES semakin lemah atau afinitas enzim terhadap substrat kecil. Sebaliknya jika nilai K_M kecil berarti ikatan kompleks ES semakin kuat atau afinitas enzim terhadap substrat besar. Nilai K_M bersifat spesifik untuk setiap

enzim terhadap substrat tertentu yang dipengaruhi oleh waktu inkubasi dan tingkat kemurnian enzim.



Gambar 2.5 Kurva plot Lineweaver-Burk (Sumber: Nelson dan cox, 2008)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, laboratorium terpadu Fakultas Teknologi Pertanian, dan laboratorium *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember dan waktu pelaksanaannya dilakukan pada Bulan Desember 2015 sampai Agustus 2016.

3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang akan digunakan pada penelitian ini terdiri dari peralatan gelas, non gelas dan instrumen. Peralatan yang termasuk dalam peralatan gelas meliputi gelas ukur, pipet mohr, beaker gelas, pengaduk gelas, cawan petri, corong, chamber untuk uji KLT, labu ukur dan erlenmeyer.

Peralatan non gelas yaitu meliputi Eppendrof, spatula logam, botol semprot, mikropipet dan tip, kawat ose dan ball pipet. Peralatan instrumentasi seperti laminar, sentrifuse dingin, sentrifuse eppendrof, stirer magnetik, *autoclave*, *water bath*, lemari pendingin, spektrofotometer Hitachi U-2900 dan kuvet.

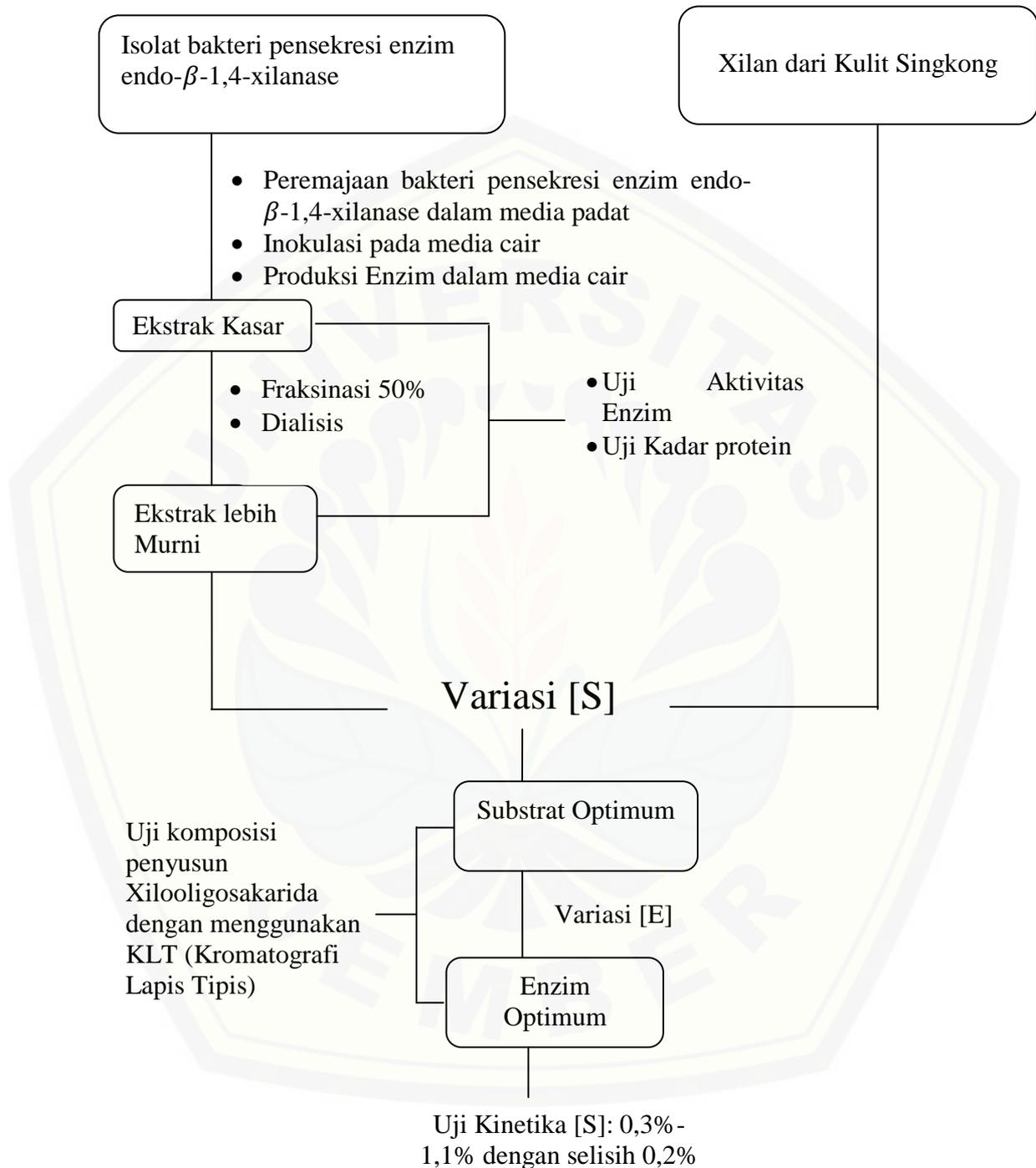
3.3 Bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian yang akan digunakan adalah sampel substrat xilan yang telah diisolasi dari kulit singkong dan isolat bakteri sistem abdomen rayap, triptofan (Oxoid), yeast, akuades, *bacto* agar (Oxoid), natrium klorida (E-Merck, Mr: 58,44 g/mol, ρ : 2,16 g/ml), 1-butanol (E-Merck, Mr: 74,12 gr/mol), Na_2HPO_4 (E-Merck, Mr: 141,96 g/mol, ρ :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, ρ :1,50 g/ml), NaOH (E-Merck, Mr: 39,99 g/mol, ρ :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, ρ :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, ρ :1,07 g/ml), Na_2SO_3 (E-Merck, Mr: 126,04 g/mol, ρ :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, ρ : 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



3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Pemurnian Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

a. Persiapan Media dan Reagen

1) Pembuatan Media Luria Bertani (LB) Padat

Media Luria Bertani padat dibuat dengan mencampurkan triptofan sebanyak 1%; 0,5% *yeast*; 1% *bacto* agar; 1% NaCl; dan dicampurkan dalam dalam erlenmeyer 500 ml. Erlenmeyer yang telah berisi campuran kemudian ditutup rapat dengan menggunakan kasa dan kapas kemudian diautoclave selama 15 menit. Erlenmeyer dikeluarkan dan didinginkan pada suhu ruangan sampai larutan menjadi hangat. Larutan selanjutnya dituangkan pada cawan petri. Penuangan larutan dilakukan didalam *Laminar Aer Flow* (LAF). Larutan yang telah dituang pada cawan petri ditunggu hingga padat dan kemudian disimpan pada lemari pendingin

2) Pembuatan Media Inokulum Cair

Media inokulum cair atau media cair dibuat dengan mencampurkan triptofan sebanyak 0,5% ; *yeast* 0,25% ; 0,5% NaCl dan 0,25% xilan oat dan kemudian ditambahkan akuades pada labu ukur 50 ml sampai tanda batas. Campuran kemudian dipindahkan pada 5 tabung reaksi yang berbeda masing-masing tabung reaksi diisi 10 ml. Tabung reaksi ditutup rapat dengan menggunakan kasa dan kapas dan kemudian diautoclave selama 15 menit. Tabung reaksi yang telah diautoclave dikeluarkan dan dinginkan pada suhu ruangan dan disimpan pada lemari pendingin.

3) Pembuatan Media Produksi

Media produksi dibuat dengan mencampurkan triptofan sebanyak 1%; NaCl 1%; *yeast* sebanyak 0,5% dan dilarutkan dalam akuades pada labu ukur 100 ml sampai tanda batas, kemudian campuran dipindahkan dalam erlenmeyer 250 ml. Erlenmeyer ditutup rapat dengan menggunakan kasa dan kapas dan kemudian diautoclave selama 15 menit. Erlenmeyer yang telah diautoclave dikeluarkan dan dinginkan pada suhu ruangan.

4) Pembuatan Reagen Miller (Miller, 1959)

Reagen miller dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 182 gram Kalium Natrium Tartrat dan 6,3 gram DNS dengan akuades panas (50°C) sampai 500 ml, kemudian ditambahkan NaOH 2 M sebanyak 262 ml. Campuran diatas setelah larut kemudian ditambahkan fenol sebanyak 5 gram dan 5 gram Natrium sulfit. Akuades ditambahkan pada campuran sampai volume campuran menjadi 1000 ml.

5) Pembuatan Reagen Bradford (Bollag dan Edelstein, 1996)

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 dan dicampurkan dengan 15 ml etanol 95% dan 30 ml asam fosfat 85% pada labu ukur 500 ml dan kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Penyimpanan larutan ini pada botol kaca gelap pada suhu ruang dan larutan ini dapat digunakan selama beberapa minggu dengan dilakukan penyaringan tiap kali sebelum digunakan.

6) Pembuatan Larutan Buffer Sitrat-fosfat (Deutsher, 1990)

Pembuatan Larutan buffer sitrat-fosfat dibuat dengan mencampurkan larutan asam sitrat dan larutan asam fosfat. Larutan asam sitrat 0,1 M dibuat dengan melarutkan sebanyak 21,014 gram asam sitrat (monohidrat) dengan akuades sampai 1000 ml. Larutan asam fosfat 0,2 M dibuat dengan melarutkan sebanyak 28,4 gram Natrium fosfat pada akuades sampai 1000 ml. Larutan buffer sitrat-fosfat dengan pH 5 dibuat dengan mencampurkan larutan asam sitrat 0,1 M sebanyak 24,3 ml dengan larutan asam fosfat sebanyak 25,7 ml dan kemudian ditambah dengan akuades dalam labu ukur 100 ml sampai tanda batas. Pengukuran pH larutan buffer dilakukan dengan menggunakan pH meter. pH yang digunakan adalah 5.

7) Pembuatan Larutan Standar Xilosa

Stok xilosa dibuat dengan cara melarutkan xilosa sebanyak 20 mg dengan akuades sampai 10 ml. Larutan stok xilosa yang diperoleh adalah konsentrasi 2 mg/ml.

8) Pembuatan Larutan Standar BSA

Larutan standar BSA dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 5 mg padatan BSA dengan buffer Sitrat-Fosfat sampai volume menjadi 5 ml. Konsentrasi Stok BSA yang diperoleh adalah 1 mg/ml.

9) Pembuatan larutan xilan oat

Larutan xilan oat dibuat dengan cara melarutkan bubuk xilan sebanyak 0,8 gram dengan buffer sitrat-fosfat sampai volume larutan menjadi 100 mL. Konsentrasi larutan xilan oat yang diperoleh adalah 0,8%.

b. Peremajaan Bakteri Pensekresi Endo- β -1,4-D-Xilanase

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara mengambil isolat bakteri dengan menggunakan jarum ose dan kemudian digoreskan pada media luria bertani padat yang terdapat pada cawan petri lain. Media luria bertani padat yang telah berisi isolat bakteri kemudian diinkubasi dalam suhu 37°C selama 16 jam.

c. Inokulasi pada Media inokulum cair

Inokulasi dilakukan dengan cara menggores 1 koloni bakteri pada media luria bertania padat yang telah berisi isolat bakteri penghasil enzim endo- β -1,4-D-Xilanase dengan menggunakan jarum ose, kemudian memasukkannya dalam media inokulum cair. Media cair inokulum yang telah berisi koloni bakteri kemudian digojok menggunakan *shaker* pada suhu 37°C selama 16 jam dengan kecepatan 150 rpm.

d. Produksi Endo- β -1,4-D-Xilanase

Produksi Endo- β -1,4-D-Xilanase dilakukan pada media produksi. Isolat bakteri yang telah diinokulasi dalam media cair dituangkan pada media produksi dan kemudian digojok dengan menggunakan *shaker* selama 16 jam dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C, sebanyak 1 ml inokulum dimasukkan dalam media produksi sebanyak 50 ml.

e. Isolasi Ekstrak Kasar Endo- β -1,4-D-Xilanase

Ekstrak kasar enzim yang telah dihasilkan pada prosedur sebelumnya kemudian disentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 20 menit pada suhu 25°C. Proses sentrifus menghasilkan supernatan dan pelet. Hasil yang diambil

adalah supernatan yang merupakan ekstrak kasar enzim. Supernatan kemudian disimpan dan diuji aktifitasnya.

f. Pemurnian Endo- β -1,4-D-Xilanase

1) Fraksinasi Amonium Sulfat

Pemurnian Endo- β -1,4-D-Xilanase menggunakan fraksinasi amonium sulfat. Amonium sulfat yang ditambahkan yaitu fraksi 50%. Ekstrak kasar Endo- β -1,4-D-Xilanase ditambahkan ammonium sulfat sebanyak 291 gram dalam 1 liter enzim. Enzim yang telah ditambahkan bubuk amonium sulfat selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dengan suhu 4°C. Proses sentrifugasi ini memperoleh supernatan dan pelet. Pelet yang diperoleh masing-masing dilarutkan dalam buffer sitrat sebanyak setengah dari volume enzim yang digunakan. Enzim yang diperoleh dari hasil fraksinasi ammonium sulfat ini kemudian diuji aktivitas dengan metode Miller dan kadar proteinnya dengan metode Bradford

2) Dialisis

Dialisis dilakukan dengan larutan enzim dimasukkan dalam kantung dialisis dan kemudian dicelupkan pada beaker gelas yang berisi buffer sitrat-fosfat dan anak stirer. Dialisis dilakukan pada suhu 4°C. Larutan buffer yang digunakan harus diganti pada jam ke 2, 4, 6 dan 12 selama 24 jam. Enzim yang diperoleh setelah dimurnikan pada proses dialisis ini kemudian diuji aktivitasnya dengan reagen Miller dan Bradford.

g. Penentuan Aktivitas Endo- β -1,4-D-Xilanase

Penentuan aktivitas enzim ditentukan dengan banyaknya konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan setelah menambahkan ekstrak kasar dengan reagen Miller. Satu unit enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase didefinisikan sebagai aktivitas enzim yang mampu menghasilkan 1 μ mol produk (gula reduksi) dari substrat (xilan) dalam waktu 1 menit pada tiap kondisi tertentu (Khan, 1986).

1) Pembuatan kurva standar xilosa

Kurva standar xilosa dapat diperoleh dengan menyiapkan larutan standar xilosa yang diperoleh dari pengenceran larutan induk. Larutan standar xilosa dengan perbedaan konsentrasi antara 0,07 mg/ml; 0,17 mg/ml; 0,27 mg/ml; 0,37

mg/ml; 0,47mg/ml; 0,57 mg/ml; dan 0,67 mg/ml. Larutan standar xilosa masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 250 μ l, kemudian dicampurkan dengan reagen miller sebanyak 750 μ l, kemudian dipanaskan selama 15 menit pada air mendidih dan didinginkan pada air es selama 20 menit, kemudian dilakukan pengujian dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm untuk melihat absorbansi pada masing-masing konsentrasi. Pembuatan kurva standar xilosa dibuat dengan membuat grafik x dan y dimana x merupakan konsentrasi larutan standard xilosa dan y merupakan absorbansi dengan persamaan kurva $y = mx + C$.

2) Pengujian enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

Pengujian enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase dilakukan dengan cara mengambil ekstrak kasar sebanyak 125 μ l dicampurkan dengan xilan oat 0,8% dalam bufer sitrat-fosfat sebanyak 125 μ l. Campuran antara ekstrak kasar enzim dan substrat xilan oat diinkubasi pada suhu 40°C selama 60 menit, kemudian ditambahkan reagen Miller sebanyak 750 μ l. Campuran enzim dan substrat yang telah ditambahkan dengan reagen Miller kemudian dididihkan dalam air mendidih selama 15 menit dan kemudian didinginkan dalam air es selama 20 menit dan kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer. Tahapan ini juga membutuhkan larutan kontrol sebagai pembanding. Larutan kontrol merupakan enzim yang diinaktif dengan cara pengambil sebanyak 125 μ l ekstrak kasar enzim kemudian dipanaskan selama 1 jam. Campuran kemudian diukur absorbansinya dengan absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Perhitungan Aktivitas ekstrak kasar enzim dihitung dengan menggunakan dengan persamaan berikut ini :

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

Keterangan,

[s] : konsentrasi sampel (mg/ml)

[k] : konsentrasi kontrol (mg/ml)

- F_p : Faktor pengenceran
 V_t : volume total (µL)
 V_e : volume enzim (µL)
 t : waktu hidrolisis substrat oleh enzim (menit)
 BM : Berat molekul xilosa (g/mol)

Konsentrasi sampel dan konsentrasi kontrol diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi pada persamaan yang diperoleh dari kurva standar xilosa yang diperoleh pada prosedur pembuatan kurva standar xilosa sebelumnya.

h. Penentuan Kadar Protein Endo-β-1,4-D-Xilanase

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 µL dan dicampurkan dengan 1 ml reagen. Prosedur yang dilakukan pada pengujian ekstrak kasar enzim dengan Bradford juga dilakukan pada larutan standar BSA.

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 Endo-β-1,4-D-Xilanase.

2) Perhitungan Kadar Protein Endo-β-1,4-D-Xilanase

Penentuan kadar protein pada enzim dilakukan dengan menambahkan reagen Bradford. Metode yang digunakan berdasarkan metode Bradford (Bollag et. Al, 1996). Ekstrak kasar enzim diambil sebanyak 100 µl 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

3.5.2 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 kulit singkong perlu divariasikan. Variasi konsentrasi substrat xilan adalah 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 dan 1,1% (b/v). Hidrolisis dilakukan dengan mencampurkan 125 μ l enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase konsentrasi 0,049 U/ml dengan substrat xilan (variasi substrat) sebanyak 125 μ l yang telah dilarutkan dalam buffer fosfat-sitrat 0,2 M dengan pH 5 kemudian campuran substrat dan enzim diinkubasi pada suhu 40°C dalam *water bath* selama 20 jam. Kontrol yang digunakan untuk membandingkan hasil yang diperoleh adalah enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase yang dinaktifkan. Inaktif enzim dilakukan dengan mengambil 125 μ l enzim kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 60 menit.

Hasil produk hidrolisis yang memiliki total gula reduksi paling besar kemudian diuji jenis xilooligosakarida dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Metode KLT dilakukan dengan cara sebanyak 2 μ l produk XO ditotolkan pada plat KLT yang sebelumnya telah diberi tanda nomor dan garis batas bawah dan atas sebagai lokasi penotolan sampel. Totolan sampel dilakukan sebanyak 4 kali totolan. Plat dicelupkan dalam wadah yang telah berisi fase gerak n-butanol, asam asetat, dan akuades dengan perbandingan 2:1:1 (Kubata *et al.*, 1994). Plat diambil dari wadah ketika fase gerak telah mencapai garis batas atas dari Plat. Plat kemudian dikeringkan dan disemprotkan dengan larutan penampakan noda yang berisi campuran α -naftol, asam sulfat, dan etanol dengan perbandingan 1:10:200 (Ratnadewi dan Handayani, 2007), kemudian diletakkan dalam oven

dengan suhu 100°C selama 5 menit. Spot-spot yang dihasilkan akan terdapat perbedaan karena adanya perbedaan kepolaran atau kelarutan dengan fasa geraknya sehingga akan dihasilkan jarak spot yang berbeda-beda. Data jarak migrasi ini digunakan untuk menentukan faktor retensi yang diperoleh dengan menggunakan persamaan berikut ini :

$$Rf = \frac{r_s}{r_{sp}}$$

Keterangan :

r_s : jarak migrasi yang ditempuh sampel (cm)

r_{sp} : jarak migrasi yang ditempuh fasa gerak (cm)

3.5.3 Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase dan Deteksi Produk Pemurnian Hidrolisat

Optimasi konsentrasi enzim juga dilakukan untuk memperoleh produk hidrolisis yang maksimal. Variasi konsentrasi enzim yang digunakan adalah 0,008; 0,016; 0,024; 0,032; 0,040; 0,048; 0,056 dan 0,064 U/ml. Hidrolisis dilakukan dengan mencampurkan 125 μ l enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase dan substrat xilan sebanyak 125 μ l. Konsentrasi substrat xilan yang digunakan adalah konsentrasi yang optimum yang diperoleh dari prosedur 3.5.2. Prosedur pengujian sama dengan prosedur yang telah dilakukan pada prosedur 3.5.2. Hasil produk hidrolisis yang memiliki total gula reduksi paling besar kemudian diuji jenis xilooligosakarida dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

3.5.4 Studi Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

Studi Kinetika dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat xilan dan waktu inkubasi. Konsentrasi substrat xilan yang digunakan 0,3% sampai 1,1% dengan selisih 0,2% dengan waktu inkubasi 0 jam, 4 jam, 8 jam, 12 jam, 16 jam dan 20 jam. Konsentrasi enzim yang digunakan adalah 0,0040 U/ml. Parameter yang diamati pada studi kinetika ini adalah nilai kecepatan maksimum (V_{max}) dan nilai konstanta Michaelis-Menten (K_M).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Konsentrasi substrat xilan kulit singkong yang optimum pada konsentrasi 0,7% dengan total gula pereduksi 1,036 mg/ml
2. Konsentrasi enzim Endo- β -D-Xilanase yang optimum pada konsentrasi 0,040 U/ml dengan total gula reduksi sebesar 1,099 mg/ml
3. Komposisi xilooligosakarida yang diperoleh berdasarkan uji KLT berkisar antara xilotetrosa dan xilopentosa
4. Nilai V_{max} yang dihasilkan adalah $0,053 \text{ mg/ml.jam}$ dan nilai K_M yang dihasilkan sebesar $4,77 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan pengujian hasil hidrolisis dengan menggunakan analisis KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) untuk mengetahui pasti besar kadar xilooligolisakarida yang dihasilkan dan perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut pada enzim sebelum digunakan untuk menghidrolisis substrat xilan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aachary, A. A. dan Prapulla, S. G. 2010. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Vol.10. doi10.1111/j/1541-4337.2010.00135.x
- Agarwal, G.R., Agarwal, Kiran., dan Agarwal, O. P. 2007. *Text book of Biochemistry (Physiological chemistry)*. India: Krishna Prakashan Media (P) Ltd
- Ahuja, S. 2003. *Chromatography and Separation Science*. United State of America: Elsevier Science.
- Akpinar, Ozlem. & Bostanci, Seyda. 2009. Xylooligosaccharide production From Lignocellulosic Wastes with *Trichoderma longibrachiatum* Xylanase. *Journal of Food Agriculture & Environment* Vol.7 (1): 70-74
- Andriani, Sukaya, Ratu, dan Abun. 2012. The Quality of Fermented Cassava Tuber Skin as Herbivorous Fish Feed. *Lucrari Stiintifice – Seria Zootehnie*, Vol.57
- Badan Pusat Statistika. 2012. *Luas Produktivitas Tanaman Ubi Kayu di Seluruh Provinsi Tahun 2012*. Badan Pusat Statistika.
- Bollag, D.M., Rozicky, M.D., & Edelstein, S.J. 1996. *Protein Methods*. Edisi Kedua. New York : John Willey & Sons Inc.
- Boonchuay, P. & Chaiyaso, T. 2012. Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Corncob Using Endo-Xylanase from *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948. *1st Mae Fah Luang University International Conference*.

- Chang, Raymond. 2010. *Chemistry tenth Edition*. New York: McGraw-Hill Companies
- Chapla, Digantkumar., Pandit, Pratima., dan Shah, Amita. 2012. Production of Xylooligosaccharides from Corn cob Xylan by Fungal Xylanase and Their Utilization by Probitics. *Bioresource Technology* 115: 215-221. www.elsevier.com/locate/biortech [15 Juli 2015]
- Collins, Tony. Gerday, Charles. Feller, Georges. 2003. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 3-23. www.Fems-microbiology.org [20 Oktober 2015]
- Deutscher, M.P. 1990. *Methods in Enzymology : Guide to Protein Purification Vol. 182*. California : Academic Press Inc.
- Gilbert, H.F. 2000. *Basic Concepts in Biochemistry*. United States of America: McGraw-Hill Companies, Inc
- Haan, R.Den. & Zyl, W.H.Van. 2003. Enhanced Xylan Degradation and Utilisation by *Pichia stipitis* Overproducing Fungal Xylanolytic Enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 620-628. www.elsevier.com/locate/enzmictec [20 Oktober 2015]
- Hidayat, C. 2009. *Peluang Penggunaan Kulit Singkong Sebagai Pakan Unggas*. Bogor : Balai Penelitian Ternak.
- Krengel, Ute. dan Dijkstra, B. W. 1996. Three-dimensional Structure of Endo-1,4- β -xylanase 1 from *Aspergillus niger*: Molecular Basis for its Low pH optimum. *J.Mol.Biol* 263, 70-78
- Kubata, Suzuki, Horitsu, Kawai, dan 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, Agrawal., dan Prabha, Hegde. 2012. A Review on Xylooligosaccharides. *International Research Journal of Pharmacy* 3 (8)
- Kurniawan, Andika. Ade. 2015. Optimasi Kondisi Hidrolisis Xilan Oat dengan Endo β -1,4-D-Xilanase Asal Mikroorganisme dalam Sistem Abdomenal Rayap untuk Produksi Xilooligosakarida. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Nelson, David L. dan Cox, Michael M. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry fifth edition*. New York: W.H. Freeman and Company
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* Vol. 31 : 426-428.
- Motta, F.L., Andrade, C.C.P., dan Santana, M.H.A. 2013. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. *Intech*. <http://dx.doi.org/10.5772/53544> [20 Oktober 2015]
- Putra, G.P. Ganda. 2009. Penentuan Kinetika Enzim Poligalakturonase (PG) Endogenous dari Pulp Biji Kakao. *Jurnal Biologi* XIII (1): 21-24
- Polizeli, Rizzatti, Monti, Terenzi, Jorge, dan Amorim. 2005. Xylanases from Fungi: Properties and Industrial Application. *Appl. Microbiol Biotechnol* 67: 577-591. DOI 10.1007/s00253-005-2904-7
- Ratnadewi, A.A.I. & Handayani, W. 2007. *Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Xilanolitik Asal Mikrob dalam Sistem Intestinal Rayap untuk Memproduksi Xilooligosakarida sebagai Pereduksi Resiko Kanker*. Laporan Penelitian Tahun II Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi. Jember : Universitas Jember.

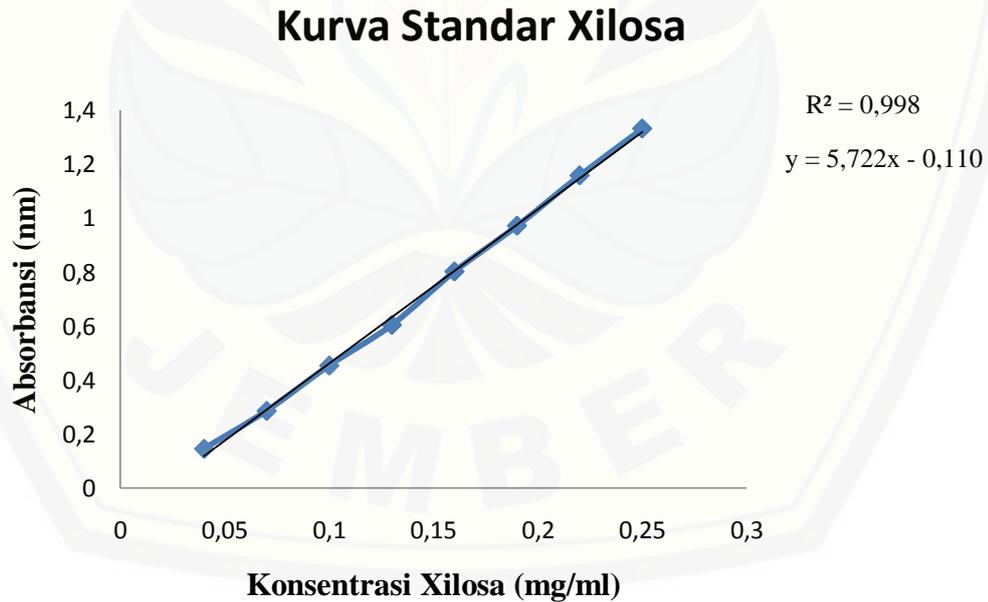
- Richana, Nur. 2002. Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia. Bogor: Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. *Buletin Agrobio* 5 (1): 29-36.
- Saptana, Joko. 2007. Isolasi dan Optimasi Purifikasi Parsial Enzim Endo- β -D-Xilanase dari Bakteri Sistem Abdomen Rayap. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Shallom, Dalia. dan Shoham, Yuval. 2003. Microbial Hemicellulases. *Israel: Current Opinion in Microbiology* 6 : 219-228.
- Vazquez, Alonso, Dominguez, dan Parajo. 2000. Xylooligosaccharides: Manufacture and Applications. *Food Science and Technology* 11: 387-393
- Verbeek, Johan. 2012. Xylan, a Promising Hemicellulose for Pharmaceutical Use. *Brazil: Intech open Science*
- Xiao, Bian, Peng, Xu, Xiao, dan Sun. 2013. Autohydrolysis of Bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) Culm for the Production of Xylo-Oligosaccharides. *Bioresource Technology* 138: 63-70

LAMPIRAN

3.1 Kurva Regresi Hasil Penelitian

3.1.1 Kurva Standar Xilosa Pada Panjang Gelombang 550 nm

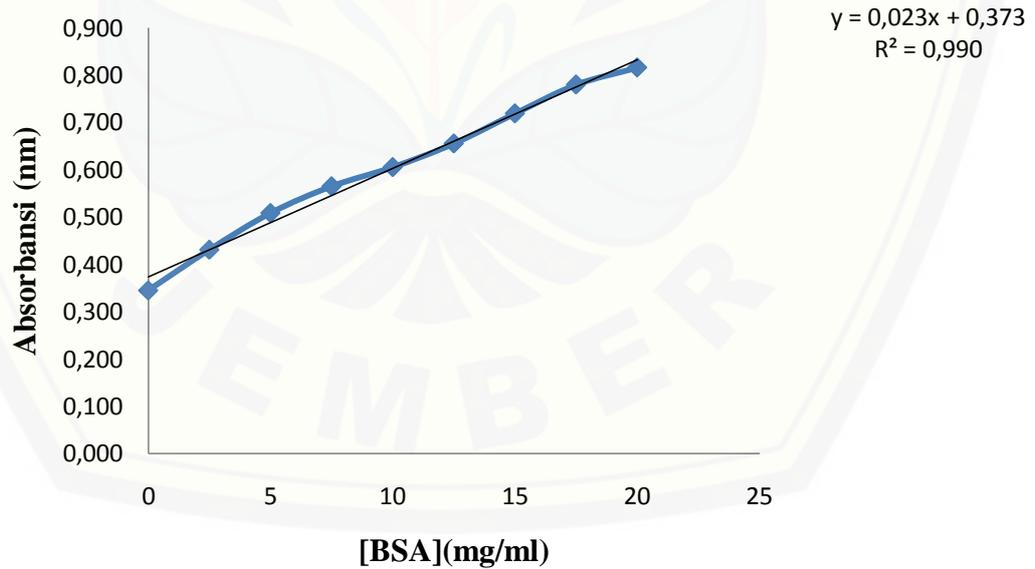
Konsentrasi Xilosa (mg/mL)	Absorbansi		Rata-rata	Standar Deviasi
	Abs. 1	Abs.2		
0,04	0,145	0,146	0,146	0,001
0,07	0,288	0,248	0,286	0,003
0,10	0,433	0,475	0,454	0,030
0,13	0,596	0,613	0,605	0,012
0,16	0,846	0,759	0,803	0,062
0,19	0,921	1,023	0,972	0,072
0,22	1,149	1,168	1,159	0,013
0,25	1,359	1,359	1,332	0,028



3.1.2 Kurva Standar BSA Pada Panjang Gelombang 595 nm

[BSA] (mg/ml)	Absorbansi		Rata-rata	Standar deviasi
	Abs.1	Abs.2		
0	0,369	0,321	0,345	0,024
2,5	0,435	0,427	0,431	0,004
5	0,519	0,498	0,509	0,011
7,5	0,572	0,565	0,565	0,007
10	0,606	0,602	0,606	0,004
12,5	0,651	0,660	0,656	0,005
15	0,719	0,717	0,719	0,002
17,5	0,780	0,784	0,780	0,004
20	0,824	0,808	0,816	0,008

Kurva Standar BSA



3.2 Data Hasil Pengamatan

3.2.1 Pengukuran Aktivitas Endo- β -D-Xilanase dengan Metode Miller

$$\text{Aktivitas Enzim } U/mL = \frac{([S] - [K]) \times Fp \times \left(\frac{V_t}{V_e}\right)}{t \times BM \text{ xilosa}}$$

dimana,

[S] : konsentrasi sampel (mg/ml)

[K] : konsentrasi kontrol (mg/ml)

Fp : faktor pengenceran

V_t : volume total (ml), jumlah volume enzim, substrat, dan reagent DNS

V_e : volume enzim yang digunakan ketika pengukuran (ml)

t : waktu hidrolisis substrat oleh enzim (menit), 60 menit

BM : berat molekul xilosa (g/mol), 130,8 g/mol

Nama	Absorbansi(nm)			\bar{X}	K.X (mg/ml)	A.E (U/ml)
	U1	U2	SD			
E.K	Kontrol	0,240	0,241	0,001	0,241	0,062
	Sampel	0,636	0,648	0,008	0,642	
F. 50%	Kontrol	0,222	0,217	0,004	0,220	0,028
	Sampel	0,405	0,401	0,003	0,403	
Dialisat	Kontrol	0,216	0,217	0,001	0,217	0,049
	Sampel	0,532	0,530	0,001	0,531	

Keterangan,

E.K : Ekstrak Kasar

F.50% : Fraksinasi 50%

U1 : Absorbansi Pengulangan 1

U2 : Absorbansi Pengulangan 2

\bar{X} : Rata-Rata absorbansi pengulangan 1 dan pengulangan

SD : Standar Deviasi

K.X : Kadar Xilosa yang diperoleh dari perhitungan dari lampiran 3.1.1

A.E : Aktivitas Enzim yang diperoleh dari perhitungan 3.2.1

Kontrol: Enzim inaktif yang telah dipanaskan pada suhu 100°C selama 60 menit

3.2.2 Pengukuran Kadar Protein Endo- β -1,4-D-Xilanase dengan Metode Bradford dan Aktivitas Spesifik

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

Keterangan,

Abs : nilai absorbansi pada λ_{595} nm

C : nilai *intercept* dari persamaan kurva standar BSA

fp : faktor pengenceran

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

Rumus perhitungan Aktivitas Spesifik Endo- β -1,4-D-Xilanase:

$$\text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas Enzim (U/ml)}}{\text{Kadar Protein (mg/ml)}}$$

Nama	Absorbansi(nm)			\bar{X}	K.BSA (mg/ml)	K.P (mg/ml)	A.E (U/ml)	A.S (U/mg)
	U1	U2	SD					
Kontrol	0,385	0,390	0,004	0,388	0,630	-	-	-
E.K	0,599	0,603	0,003	0,601	9,913	0,093	0,062	0,667
F. 50%	0,503	0,505	0,001	0,504	5,696	0,051	0,028	0,549
Dialisat	0,497	0,494	0,002	0,496	5,326	0,047	0,049	1,043

Keterangan :

E.K : Ekstrak Kasar

F.50% : Fraksinasi 50%

U1 : Absorbansi Pengulangan 1

U2 : Absorbansi Pengulangan 2

\bar{X} : Rata-Rata absorbansi pengulangan 1 dan pengulangan

SD : Standar Deviasi

K.BSA: Kadar BSA yang diperoleh dari perhitungan dari lampiran 3.1.2

K.P : Kadar Protein diperoleh dengan mengurangi kadar BSA sampel dengan kontrol dan kemudian dibagi dengan 100 ml

A.E : Aktivitas Enzim yang diperoleh dari perhitungan lampiran 3.2.1

A.S : Aktivitas spesifik yang diperoleh dari perhitungan lampiran 3.2.2

Kontrol: Kontrol yang digunakan untuk pengujian Kadar BSA ini adalah buffer fosfat-sitrat yang ditambahkan dengan reagent Bradford

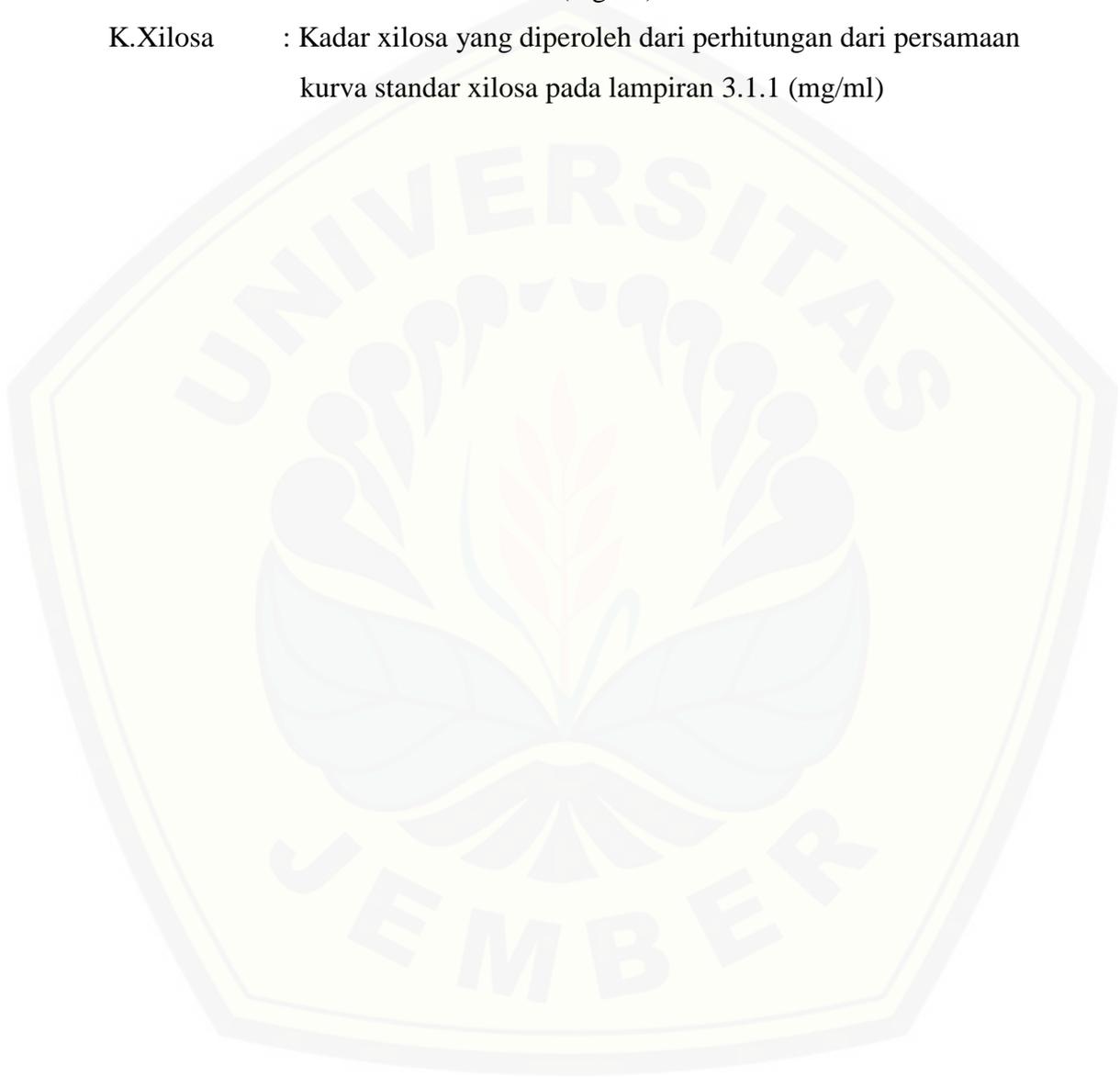
3.2.3 Rumus Perhitungan Total Gula Pereduksi

$$T.G.P \left(\frac{mg}{ml} \right) = K.Xilosa \text{ Sampel} \left(\frac{mg}{ml} \right) - K.Xilosa \text{ Kontrol} \left(\frac{mg}{ml} \right)$$

Keterangan,

T.G.P : Total Gula Pereduksi (mg/ml)

K.Xilosa : Kadar xilosa yang diperoleh dari perhitungan dari persamaan kurva standar xilosa pada lampiran 3.1.1 (mg/ml)



3.2.4 Hasil Hidrolisis Variasi Konsentrasi Substrat Xilan Kulit Singkong Steam Delignifikasi

Konsentrasi Sampel (%)		Absorbansi (nm)			SD	F.p	K. X (mg/ml)	T.G.P (mg/ml)
		U1	U2	\bar{X}				
0,1	K	0,151	0,154	0,153	0,002	1	0,046	0,006
	S	0,182	0,192	0,187	0,007	1	0,052	
0,2	K	0,150	0,152	0,151	0,001	1	0,046	0,358
	S	0,262	0,288	0,275	0,018	6	0,404	
0,3	K	0,176	0,175	0,176	0,001	1	0,050	0,456
	S	0,351	0,393	0,372	0,030	6	0,505	
0,4	K	0,187	0,183	0,185	0,003	1	0,052	0,561
	S	0,466	0,482	0,474	0,011	6	0,612	
0,5	K	0,163	0,160	0,162	0,002	1	0,047	0,601
	S	0,600	0,605	0,603	0,004	6	0,747	
0,6	K	0,175	0,179	0,177	0,003	1	0,050	0,717
	S	0,728	0,725	0,727	0,002	6	0,877	
0,7	K	0,193	0,198	0,196	0,004	1	0,053	1,036
	S	0,929	0,928	0,929	0,001	6	1,089	
0,8	K	0,213	0,208	0,211	0,004	1	0,056	0,991
	S	0,890	0,887	0,889	0,004	6	1,047	
0,9	K	0,205	0,208	0,211	0,002	1	0,055	0,910
	S	0,810	0,812	0,811	0,002	6	0,966	
1,0	K	0,228	0,225	0,227	0,002	1	0,059	0,924
	S	0,824	0,830	0,827	0,004	6	0,983	
1,1	K	0,227	0,226	0,227	0,001	1	0,059	0,907
	S	0,809	0,814	0,812	0,004	6	0,966	

Keterangan :

U1 : Absorbansi Pengulangan 1

U2 : Absorbansi Pengulangan 2

\bar{X} : Rata-Rata absorbansi pengulangan 1 dan pengulangan 2

SD : Standar Deviasi pengulangan 1 dan pengulangan 2

F.p : Faktor Pengenceran

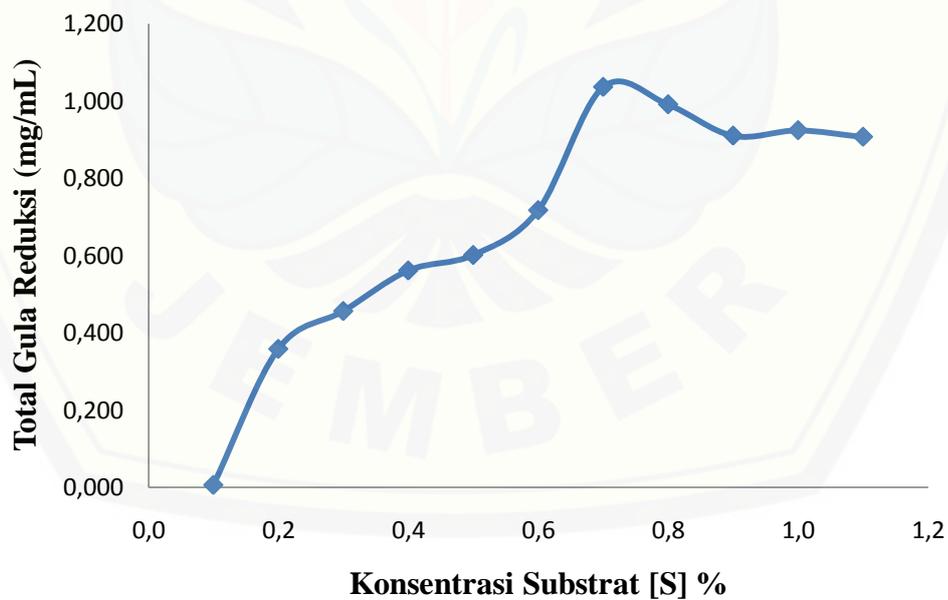
K.X : Kadar Xilosa yang diperoleh dari perhitungan dari lampiran 3.1.1

T.G.P : Total Gula Pereduksi yang diperoleh dari perhitungan lampiran 3.2.3

S : Sampel produk hidrolisis substrat dengan Enzim Aktif

K : Kontrol produk hidrolisis substrat dengan Enzim inaktif

Kurva Variasi Konsentrasi [S] substrat xilan kulit singkong steam delignifikasi



3.2.5 Hasil Hidrolisis Variasi Konsentrasi Enzim Terhadap Substrat Xilan Kulit Steam Singkong Delignifikasi

Dengan konsentrasi Enzim

Nama		Absorbansi(nm)			\bar{X}	K.X (mg/ml)	A.E (U/ml)	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
		U1	U2	SD					
E.K	Kontrol	0,240	0,241	0,001	0,241	0,061	0,083	0,099	0,838
	Sampel	0,778	0,775	0,002	0,777	0,131			
F. 50%	Kontrol	0,222	0,217	0,004	0,220	0,058	0,043	0,056	0,768
	Sampel	0,505	0,500	0,004	0,503	0,090			
Dialisat	Kontrol	0,216	0,217	0,001	0,217	0,057	0,064	0,053	1,208
	Sampel	0,624	0,630	0,004	0,627	0,112			

Konsentrasi Sampel (U/ml)		Absorbansi (nm)			SD	F.p	K.X (mg/ml)	T.G.P (mg/ml)
		U1	U2	\bar{X}				
0,008	K	0,176	0,175	0,176	0,001	1	0,050	0,290
	S	0,218	0,210	0,214	0,006	6		
0,016	K	0,198	0,190	0,194	0,006	1	0,053	0,408
	S	0,321	0,339	0,330	0,013	6		
0,024	K	0,193	0,189	0,176	0,001	1	0,053	0,703
	S	0,610	0,611	0,611	0,002	6		
0,032	K	0,171	0,169	0,170	0,001	1	0,049	0,904
	S	0,797	0,800	0,799	0,002	6		
0,040	K	0,181	0,189	0,185	0,006	1	0,052	1,099
	S	0,988	0,986	0,987	0,001	6		
0,048	K	0,168	0,164	0,166	0,003	1	0,048	1,013
	S	0,900	0,905	0,751	0,004	6		
0,056	K	0,163	0,169	0,166	0,004	1	0,048	0,997
	S	0,889	0,885	0,887	0,003	6		
0,064	K	0,198	0,195	0,197	0,002	1	0,054	0,978
	S	0,875	0,873	0,874	0,001	6		

Keterangan :

U1 : Absorbansi Pengulangan 1

U2 : Absorbansi Pengulangan 2

\bar{X} : Rata-Rata absorbansi pengulangan 1 dan pengulangan 2

SD : Standar Deviasi pengulangan 1 dan pengulangan 2

F.p : Faktor Pengenceran

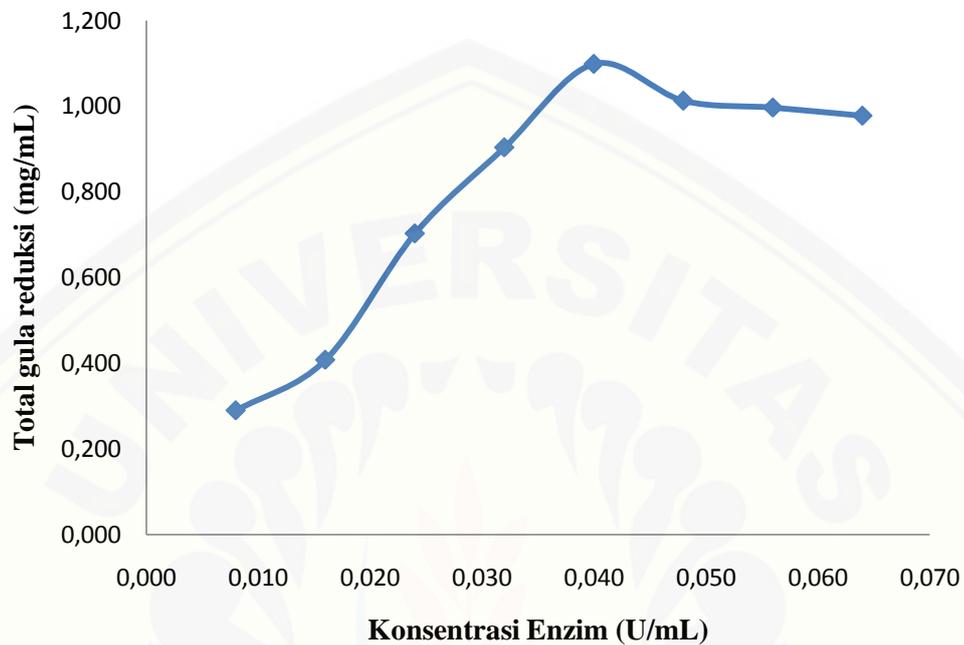
K.X : Kadar Xilosa yang diperoleh dari perhitungan dari lampiran 3.1.1

T.G.P : Total Gula Pereduksi yang diperoleh dari perhitungan lampiran 3.2.3

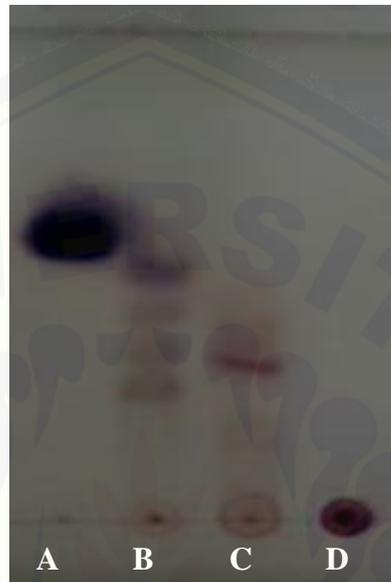
S : Sampel produk hidrolisis substrat dengan Enzim Aktif

K : Kontrol produk hidrolisis substrat dengan Enzim inaktif

Kurva Variasi Konsentrasi [E] substrat xilan kulit singkong steam delignifikasi



3.3 Kromatogram produk hidrolisis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



Gambar 4.8 Kromatogram produk hidrolisis yang terdiri dari spot a. xilosa; b. xilooligosakarida dengan derajat polimerisasi 2-5 secara berturut-turut dari atas kebawah; c. Sampel hasil hidrolisis pada enzim aktif; d. kontrol yang diperoleh dari hasil hidrolisis dengan enzim inaktif

Perhitungan nilai Rf Standar dan sampel hasil KLT

Nama	Jarak sampel (cm)	Jarak eluen (cm)	Rf
Xilosa	4,3	8	0,54
Xilobiosa	3,7	8	0,46
Xilotriosa	3,1	8	0,39
Xilotetrosa	2,5	8	0,31
Xilopentosa	1,9	8	0,24
S1	2,4	8	0,30

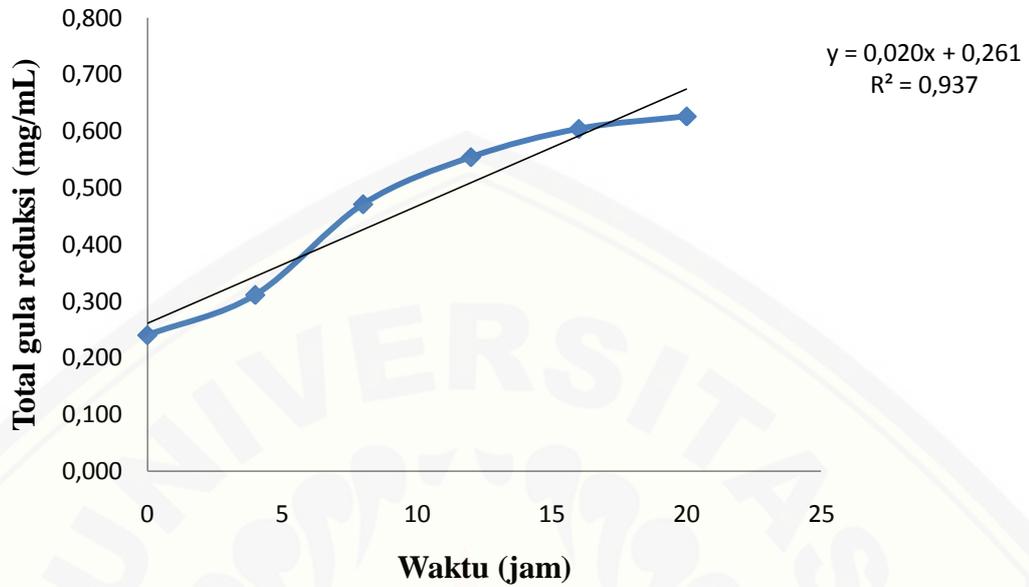
3.4 Parameter Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

3.4.1 Penentuan nilai K_M dan V_{max} dari Enzim terhadap Substrat Xilan Kulit Singkong

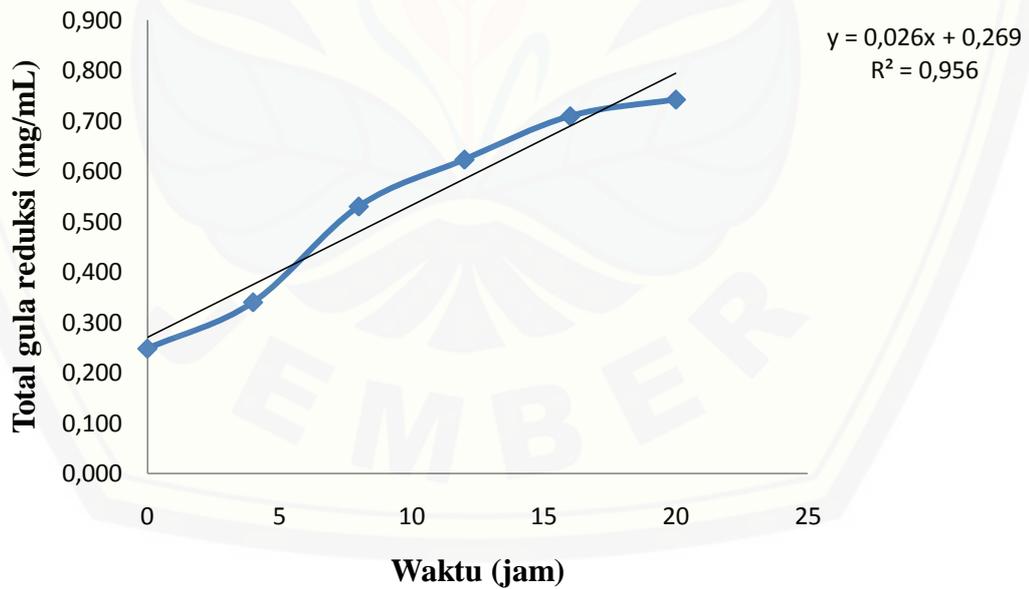
Konsentrasi sampel	Waktu (Jam)	Absorbansi (nm)		Rata-rata	SD	K.X (mg/ml)	T.G.P (mg/ml)
		Abs.1	Abs.2				
0,3%	0	0,226	0,222	0,224	0,003	0,291	0,240
	4	0,310	0,305	0,308	0,004	0,365	0,311
	8	0,493	0,493	0,493	0,000	0,527	0,471
	12	0,589	0,592	0,591	0,002	0,612	0,554
	16	0,644	0,642	0,643	0,001	0,658	0,604
	20	0,677	0,672	0,675	0,004	0,686	0,626
0,5%	0	0,238	0,236	0,237	0,001	0,303	0,248
	4	0,348	0,352	0,350	0,003	0,402	0,340
	8	0,566	0,570	0,568	0,003	0,592	0,530
	12	0,679	0,675	0,677	0,003	0,688	0,623
	16	0,777	0,769	0,773	0,006	0,772	0,709
	20	0,795	0,807	0,801	0,008	0,796	0,742
0,7%	0	0,378	0,376	0,377	0,001	0,426	0,373
	4	0,485	0,483	0,484	0,002	0,519	0,459
	8	0,731	0,729	0,730	0,001	0,734	0,673
	12	0,812	0,815	0,814	0,002	0,807	0,745
	16	0,898	0,899	0,899	0,001	0,881	0,821
	20	0,922	0,924	0,923	0,001	1,083	1,027
0,9%	0	0,236	0,238	0,237	0,001	0,303	0,250
	4	0,442	0,451	0,447	0,006	0,486	0,428
	8	0,636	0,641	0,639	0,004	0,654	0,586
	12	0,775	0,785	0,780	0,007	0,778	0,709
	16	0,603	0,604	0,604	0,001	0,873	0,807
	20	0,741	0,744	0,743	0,002	1,043	0,981
1,1%	0	0,240	0,238	0,239	0,001	0,305	0,251
	4	0,490	0,479	0,485	0,008	0,519	0,458
	8	0,697	0,698	0,698	0,001	0,709	0,643
	12	0,850	0,844	0,847	0,004	0,836	0,771
	16	0,699	0,701	0,700	0,001	0,991	0,926
	20	0,897	0,896	0,839	0,001	1,055	0,996

SD: Standar Deviasi; K.X: Kadar Xilosa; T.G.R: Total Gula Pereduksi

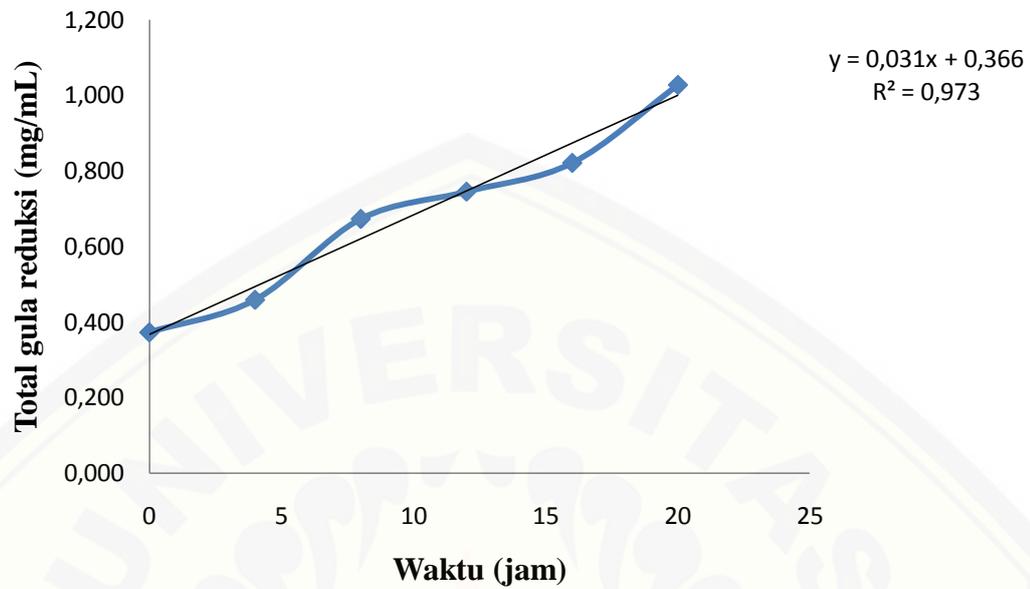
Konsentrasi Substrat 0,3%



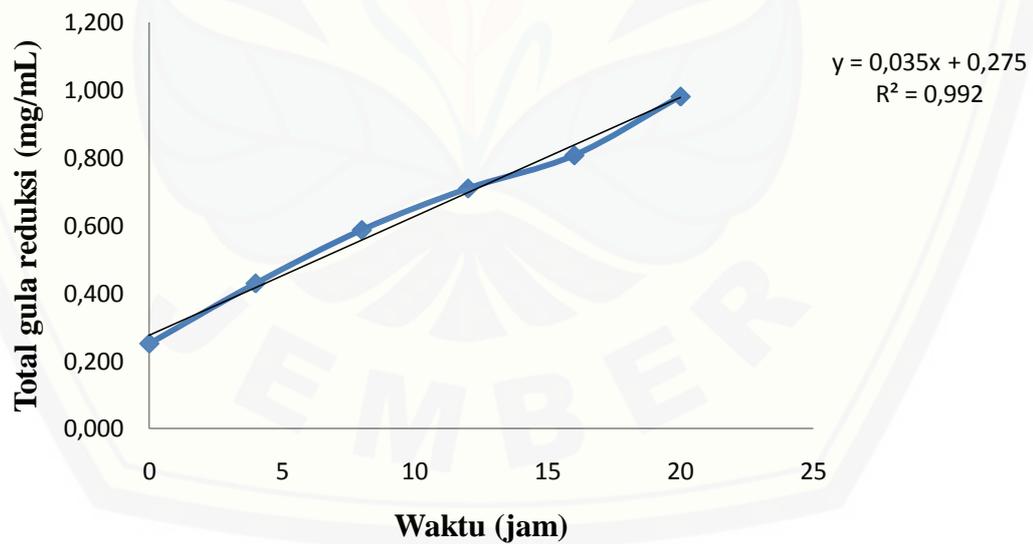
Konsentrasi Substrat 0,5%

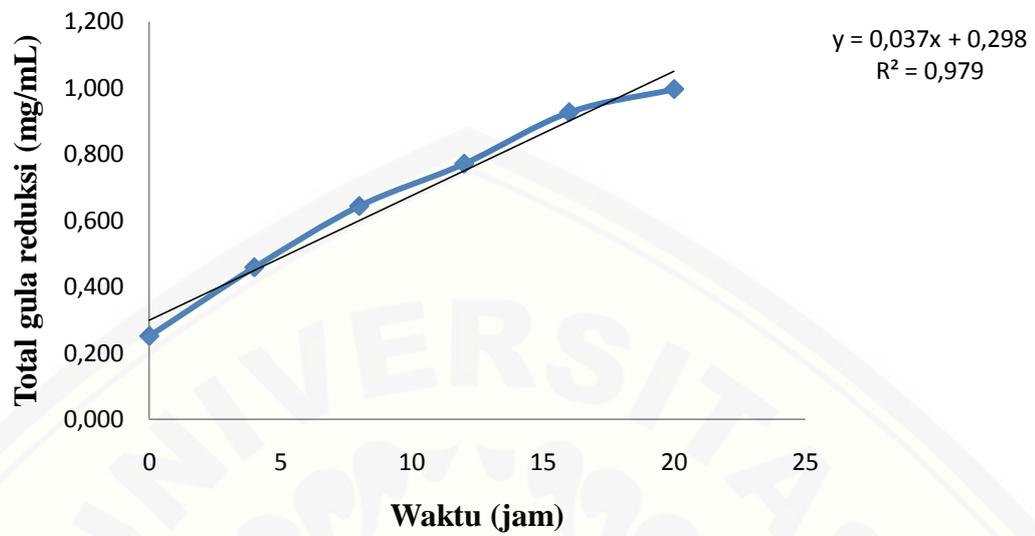


Konsentrasi Substrat 0,7%



Konsentrasi Substrat 0,9%



Konsentrasi Substrat 1,1%

3.4.2 Perhitungan Nilai K_M dan V_{max} dengan Garis Linear Kurva

Liveweaver Bulk

$$y = mx + C$$

Keterangan :

$$y = \frac{1}{V_0}$$

$$m = \frac{K_M}{V_{max}}$$

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

a. Perhitungan V_{max} dan K_M dari persamaan

$$y = mx + C$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$y = 0,090x + 18,79$$

$$\frac{1}{V_{max}} = 18,43$$

$$V_{max} = \frac{1}{18,79}$$

$$V_{max} = 0,053 \text{ mg/ml.jam}$$

$$\frac{K_M}{V_{max}} = 0,090$$

$$\frac{K_M}{0,053} = 0,090$$

$$K_M = 4,77 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

$$y = mx + C$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$\frac{1}{\text{mg/ml.jam}} = \frac{K_M}{\text{mg/ml.jam}} \times \frac{1}{\text{mg/ml}} + \frac{1}{\text{mg/ml.jam}}$$

$$\frac{\text{ml.jam}}{\text{mg}} = \frac{K_M \text{ ml.jam}}{\text{mg}} \times \frac{\text{ml}}{\text{mg}} + \frac{\text{ml.jam}}{\text{mg}}$$

$$\frac{\text{ml.jam}}{\text{mg}} = \frac{K_M \text{ ml}^2 \cdot \text{jam}}{\text{mg}^2} + \frac{\text{ml.jam}}{\text{mg}}$$

$$\frac{\text{ml.jam}}{\text{mg}} - \frac{\text{ml.jam}}{\text{mg}} = \frac{K_M \text{ ml}^2 \cdot \text{jam}}{\text{mg}^2}$$

$$\frac{\text{ml.jam}}{\text{mg}} = \frac{K_M \text{ ml}^2 \cdot \text{jam}}{\text{mg}^2}$$

$$\text{ml.jam} \times \text{mg}^2 = K_M \text{ ml}^2 \cdot \text{jam} \times \text{mg}$$

$$\frac{\text{ml.jam} \times \text{mg}^2}{\text{ml}^2 \cdot \text{jam} \times \text{mg}} = K_M$$

$$\frac{\text{mg}}{\text{ml}} = K_M$$

b. Perhitungan K_M dan V_{max} dari Gambar kurva

$$-\frac{1}{K_M} = -209$$

$$\frac{1}{K_M} = 209$$

$$K_M = \frac{1}{209}$$

$$K_M = 4,785 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

$$\frac{1}{V_{max}} = 19$$

$$\frac{1}{19} = V_{max}$$

$$V_{max} = \frac{1}{19}$$

$$V_{max} = 0,0526 \text{ mg/ml} \cdot \text{jam}$$

