



IMMOBILISASI *CROSS-LINKING* KATALASE DARI
BUAH APEL VARIETAS ROME BEAUTY MENGGUNAKAN
3-MERCAPTOPROPIONIC ACID PADA MEMBRAN
SELULOSA NATA DE COCO SEBAGAI BIOMATERIAL
SENSOR

S K R I P S I

Diajukan Untuk Memenuhi Persyaratan Penyelesaian Program Sarjana Sains
Jurusan Kimia Pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

Oleh :

Sugeng Hariyadi

NIM. 971810301022



Madiah
Pembelian
06 OCT 2003
Klass
634.1
HAR
2

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

JULI 2003

DEKLARASI

Skripsi ini berisi hasil kerja/penelitian mulai bulan Januari 2003 sampai dengan bulan April 2003 di Laboratorium Biokimia FMIPA UNEJ. Bersama ini saya menyatakan bahwa isi skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri kecuali jika disebutkan sumbernya dan skripsi ini belum pernah diajukan pada institusi lain.

Jember, Juli 2003

Sugeng Hariyadi

ABSTRAK

Immobilisasi *Crosslinking* Katalase Dari Buah Apel Varietas *Rome Beauty* Menggunakan *3-Mercaptopropionic Acid* Pada Membran Selulosa Nata de Coco Sebagai Biomaterial Sensor, Sugeng Hariyadi, 971810301022, Skripsi, Juli 2003, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Teknik immobilisasi memegang peranan penting dalam mengembangkan suatu biosensor. Salah satu teknik immobilisasi yang telah dikembangkan adalah teknik *crosslinking*. Keuntungan menggunakan teknik *crosslinking* yaitu menghasilkan ikatan kimia yang kuat (Eggins, 1997; Zulfikar dan Hibbert, 2001). Beberapa *cross-link agent* telah dikembangkan seperti glutaral dehid dan *3-Mercaptopropionic Acid* (3-MPA). Zulfikar dan Hibbert (2001) telah mengembangkan teknik *crosslinking* menggunakan selulosa nata de coco sebagai material support dan *3-Mercaptopropionic Acid* sebagai *cross-link agent*. Dalam penelitian ini, menggunakan selulosa nata de coco sebagai *material support* dan *3-Mercaptopropionic Acid* sebagai *cross-link agent*. Keuntungan dari *3-Mercaptopropionic acid* sebagai *crosslinking agent* adalah mempunyai gugus SH yang terletak pada posisi luar sehingga mudah membentuk ikatan disulfida dengan gugus SH dari enzim. Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah katalase yang mempunyai aktivitas 2490,83 unit dengan K_m 5,2 mM dan V_{max} 16,3 unit/ml. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui karakteristik dan aktivitas katalase terimmobilisasi. Proses diawali dengan menghidrolisa selulosa nata de coco menggunakan asam sulfat 2 M, selanjutnya esterifikasi *3-Mercaptopropionic Acid* 0,456 M dengan kondisi temperatur 80°C, 90°C dan 100°C. Membran yang dihasilkan mempunyai ketebalan 0.01 mm. Hasil karakterisasi Spektrofotometer UV-VIS membran selulosa nata de coco murni serapan maksimal pada panjang gelombang 380 nm, 490 nm, dan 660 nm. Sedangkan membran selulosa nata terhidrolisa, membran selulosa nata-MPA dan membran selulosa nata-MPA-katalase mempunyai serapan maksimal pada panjang gelombang 380 nm, 490 nm, dan 655 nm. Karakterisasi FTIR membran selulosa nata-MPA setiap perlakuan esterifikasi memperlihatkan adanya ester pada 1059 cm^{-1} serta gugus C=O pada 1660-1720 cm^{-1} dan gugus SH 2500-2600 cm^{-1} . Terdapatnya ikatan disulfida pada membran selulosa nata-MPA-katalase setiap perlakuan menyerap panjang gelombang 400-500 cm^{-1} . Aktivitas katalase terimmobilisasi pada selulosa nata-MPA esterifikasi 80°C 1045.133 unit serta nilai K_m adalah 1.5441 mM dan V_{max} 36.7547 unit/ml. Pada 90°C sebesar 1047.115 unit untuk K_m adalah 3.4178 mM dan V_{max} 46.9484 unit/ml dan 100°C sebesar 1047.115 unit, harga K_m adalah 1.6230 mM dan V_{max} 31.9489 unit/ml

Kata kunci : membran, selulosa nata de coco, *3-Mercaptopropionic Acid* (3-MPA), esterifikasi, katalase, immobilisasi.

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diterima oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember pada :

Hari : SABTU
Tanggal : 27 SEP 2003
Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

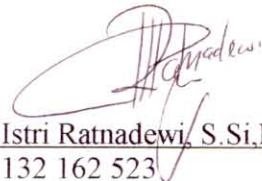
Tim Penguji

Ketua (Dosen Pembimbing Utama)

Sekretaris (Dosen Pembimbing Anggota)



Drs. Zulfikar, Ph.D
NIP. 131 660 785



A.A. Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si
NIP. 132 162 523

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II



Drs. Bambang Kuswandi, Ph.D
NIP. 132 094 129




Drs. Busroni, M.Si
NIP. 131 945 805

Mengesahkan

Dekan FMIPA UNEJ




Sumadi, MS
NIP 130 368 784

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT. atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan Judul **Immobilisasi Crosslinking Katalase Dari Buah Apel Varietas Rome Beauty Menggunakan 3-Mercaptopropionic Acid pada Selulosa Nata de Coco.**

Penulis tidak lupa mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan dalam penelitian dan menyusun skripsi terutama pada :

1. Ir. Sumadi, MS. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
2. drh. Wuryanti Handayani, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
3. Drs. Zulfikar, Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) yang telah banyak memberikan bimbingan, bantuan, dan saran dalam melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
4. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.SI, M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) yang telah banyaik memberikan bimbingan, bantuan, dan saran dalam melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Drs. Mintadi, M.Sc selaku Komisi Bimbingan dan seluruh Staff Dosen yang telah memberikan sumbangsih yang tidak ternilai harganya.
6. Muhammad Naqib yang selama ini membantu dalam penelitian dan memberikan saran.
7. Desy Aisah Erfani yang senantiasa memberikan motivasi serta perhatian.
8. Seluruh rekan-rekan seperjuangan di Jurusan Kimia khususnya '97

Akhirnya penulis berharap skripsi ini dapat memberikan kontribusi terhadap ilmu pengetahuan sebagai bahan informasi terutama biosensor.

Penulis

Jember, 21 Juni 2003

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN DEKLARASI	ii
HALAMAN ABSTRAK	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN KATA PENGANTAR	v
HALAMAN DAFTAR ISI	vi
HALAMAN DAFTAR TABEL	ix
HALAMAN DAFTAR GAMBAR	x
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan dan Manfaat.....	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Teknik Immobilisasi.....	6
2.1.1 Teknik <i>Cross-linking</i>	6
2.1.2 Teknik Immobilisasi Selulosa-Enzim.....	7
2.2 <i>3-Mercaptopropionic Acid</i>	7
2.3 Katalase.....	8
2.4 Peranan Katalase.....	9
2.5 Selulosa.....	10
2.6 Membran Selulosa Nata de Coco.....	11
III. METODOLOGI	13
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	13
3.1.1 Tempat.....	13
3.1.2 Waktu.....	13
3.2 Bahan dan Alat.....	13
3.2.1 Bahan.....	13
3.2.2 Alat.....	13

3.3 Metodologi Penelitian	14
3.3.1 Preparasi Sampel.....	14
3.3.2 Hidrolisa Selulosa Nata de Coco.....	14
3.3.3 Esterifikasi Selulosa Nata dengan <i>3-Mercaptopropionic Acid</i>	14
3.3.4 Crosslinking Selulosa Nata- MPA dengan Katalase	14
3.3.5 Penentuan Aktivitas Katalase dengan Spektrofotometri.....	14
3.3.6 Pengukuran pH optimum Immobilisasi	15
3.3.7 Penentuan Konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan Kecepatan maksimum (V_{max}).....	16
3.3.8 Penentuan kadar protein katalase terimmobilisasi.....	16
3.3.9 Karakterisasi Membran.....	16
3.4 Analisa Data	17
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1 Membran Selulosa Nata de Coco Murni	18
4.2 Karakterisasi Membran Selulosa Nata de Coco Murni	19
4.2.1 Karakterisasi spektrofotometer UV-VIS membran selulosa nata de coco murni	19
4.2.2 Karakterisasi FTIR membran selulosa nata de coco murni.....	20
4.2.3 Karakterisasi fotomikroskop membran selulosa nata de coco murni	21
4.3 Membran Selulosa Nata de Coco Terhidrolisa	22
4.4 Karakterisasi Membran Selulosa Nata de Coco Terhidrolisa.....	22
4.4.1 Karakterisasi spektrofotometer UV-VIS membran selulosa nata de coco terhidrolisa	22
4.4.2 Karakterisasi FTIR membran selulosa nata de coco terhidrolisa	23
4.4.3 Karakterisasi fotomikroskop membran selulosa nata de coco terhidrolisa	23
4.5 Karakterisasi FTIR 3-Mercaptopropionic Acid.....	24

4.6	Esterifikasi Selulosa Nata de Coco dengan 3-Mercaptopropionic Acid	25
4.6.1	Karakterisasi spektrofotometer UV-VIS membran selulosa nata-MPA temperatur 80°C – 100°C	26
4.6.2	Karakterisasi FTIR membran selulosa nata-MPA T 80°C.....	27
4.6.3	Karakterisasi FTIR membran selulosa nata-MPA T 90°C.....	28
4.6.4	Karakterisasi FTIR membran selulosa nata-MPA T 100°C.....	29
4.7	Karakterisasi Fotomiskroskop Membran Selulosa Nata-MPA Temperatur Esterifikasi 80°C – 100°C.....	29
4.8	Katalase	30
4.9	Crosslinking Katalase CI, CII dan CIII Pada pH 5-9.....	31
4.9.1	Karakterisasi Spektrofotometer UV-VIS dan FTIR Membran CI.....	32
4.9.2	Karakterisasi Spektrofotometer UV-VIS dan FTIR Membran CII.....	33
4.9.3	Karakterisasi Spektrofotometer UV-VIS dan FTIR Membran CIII	35
4.9.4	Karakterisasi Fotomikroskop Membran Selulosa Nata-MPA-Katalase CI, CII dan CIII	36
4.10	Kurva Standar KMnO ₄	37
4.11	Aktivitas Katalase Terimmobilisasi CI, CII dan CIII Pada Berbagai pH.....	37
4.12	Aktivitas Katalase Pada Immobilisasi pH Maksimal.....	38
4.13	Kadar Protein Katalase Terimmobilisasi	41
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1	Kesimpulan	43
5.2	Saran.....	45
VI.	DAFTAR PUSTAKA	46
VII.	DAFTAR LAMPIRAN	51
VIII.	LAMPIRAN	52

DAFTAR TABEL

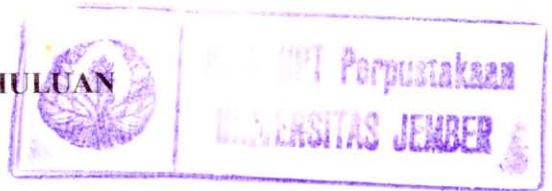
- Tabel 1. Aktivitas dan kadar protein katalase bebas
- Tabel 2. Aktivitas katalase terimmobilisasi pada pH 5-9 pada esterifikasi temperatur 80-100°C
- Tabel 3. Kadar protein Katalase terimmobilisasi pada pH maksimal esterifikasi temperatur 80-100°C

DAFTAR GAMBAR

1. Gambar 1. Struktur *3-Mercaptopropionic Acid*
2. Gambar 2. Bentuk glukosa I dan glukosa II dari selulosa
3. Gambar 3. Pola *crosslinking* selulosa nata-MPA-katalase
4. Gambar 4. Mekanisme polimerisasi selulosa
5. Gambar 5. Spektra absorbansi membran selulosa nata de coco murni
6. Gambar 6. Spektra FTIR membran selulosa nata de coco murni
7. Gambar 7. Fotomikroskop membran selulosa nata de coco murni
8. Gambar 8. Spektra absorbansi membran selulosa nata de coco terhidrolisa
9. Gambar 9. Fotomikroskop membran selulosa nata de coco terhidrolisa
10. Gambar 10. Spektra FTIR *3-Mercaptopropionic acid*
11. Gambar 11. Mekanisme reaksi esterifikasi selulosa nata dengan 3 MPA
12. Gambar 12. Spektra spektrofotometer UV-VIS membran selulosa nata-MPA
T 80°–100° C
13. Gambar 13. Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA T 80°C
14. Gambar 14. Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA T 90°C
15. Gambar 15. Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA T 100°C
16. Gambar 16. Fotomikroskop membran selulosa nata-MPA esterifikasi 80°C
sampai 100°C.
17. Gambar 17. Spektra FTIR katalase
18. Gambar 18. Spektra spektrofotometer UV-VIS membran selulosa nata-MPA-
katalase immobilisasi pH 5-9 C I
19. Gambar 19. Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA-katalase C I
20. Gambar 20. Spektra spektrofotometer UV-VIS membran selulosa nata-MPA-
katalase C II
21. Gambar 21. Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA-katalase C II
22. Gambar 22. Spektra spektrofotometer UV-VIS membran selulosa nata-MPA-
katalase C III
23. Gambar 23. Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA-katalase C III

24. Gambar 24. Fotomikroskop immobilisasi katalase esterifikasi CI, CII, CIII
25. Gambar 25. Pengaruh KMnO_4 terhadap absorbansi
26. Gambar 26. Aktivitas katalase terimmobilisasi pada berbagai pH dan esterifikasi
27. Gambar 27. Kurva kecepatan sesaat katalase terimmobilisasi
28. Gambar 28. Grafik penentuan K_m dan V_{max} esterifikasi C I
29. Gambar 29. Grafik penentuan K_m dan V_{max} esterifikasi C II
30. Gambar 30. Grafik penentuan K_m dan V_{max} esterifikasi C III
31. Gambar 31. Kurva standar bovine serum albumin

I. PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Teknik immobilisasi memegang peranan yang sangat penting dalam mengembangkan suatu biosensor. Secara garis besar teknik immobilisasi dibagi menjadi teknik absorpsi, teknik *entrapment*, teknik mikroenkapsulasi, teknik *crosslinking* dan teknik ikatan kovalen. Bioaktif molekul yang digunakan dalam teknik immobilisasi seperti enzim, antibodi, jaringan, dan lain – lain.

Teknik immobilisasi enzim dalam membuat suatu sensor harus mempertimbangkan beberapa faktor yang berkaitan dengan immobilisasi, yaitu *material support* (bahan pendukung), teknik immobilisasi, waktu respon enzim setelah diimmobilisasi yang berpengaruh langsung terhadap proses difusi analit, dan aktifitas enzim terimmobilisasi (Eggins, 1997). Teknik immobilisasi mempunyai beberapa kelebihan, enzim mudah diperoleh kembali atau dipisahkan dari produk, pengoperasian dapat kontinu, penggunaan enzim lebih efektif karena dapat digunakan kembali (*reusable*) dan sifat kimia serta fisika seperti kelarutan, stabilitas dan reaktivitas dapat diubah melalui teknik immobilisasi.

Enzim pada dasarnya diproduksi oleh sel untuk metabolisme. Efektivitas reaksi dan stabilitas enzim sangat dipengaruhi oleh pH, temperatur, keberadaan aktivator, dan kondisi reaksi dari enzim tersebut (Haska, 1996 dan Zey, 1996).

Katalase (EC 1.11.1.6) ditemukan pada pertengahan abad ke-19 yang terdistribusi secara luas pada tumbuhan, hewan dan mikroorganisme kecuali mikroorganisme *obligat anaerob*, serta telah dipurifikasi dari ketiga sumber tersebut. Katalase liver lembu kristalin awalnya diisolasi oleh Sumner dan Dounce pada tahun 1937 dan sejak saat itu pula katalase telah diisolasi dan dikristalisasi dari berbagai sumber lain (Whitaker, 1994).

Isolasi katalase dari tumbuh-tumbuhan belum banyak dilakukan. Murphy dan Maier (dalam Worthington Biochem. Com.,2001) telah mengisolasi katalase dari tomat, sedangkan Kuncze dan Trelease (dalam Gong *et al.*, 2000) mendapatkan katalase dari biji kapas dan Gong *et.al.* (2000) berhasil mengisolasi

katalase dari kultivar-kultivar apel yang terdapat di Kanada. Penggunaan enzim katalase untuk berbagai aplikasi bidang kimia analisis berkembang sangat cepat karena memiliki selektifitas reaksi hanya untuk substratnya.

Pemanfaatan enzim hasil preparasi (isolasi) dengan kemurnian yang sangat tinggi banyak dilakukan untuk tujuan praktis dalam industri dan riset laboratorium. Untuk meningkatkan stabilitas enzim dilakukan dengan teknik immobilisasi enzim. Immobilisasi adalah suatu proses pergerakan dari molekul enzim yang ditahan pada tempat tertentu dalam suatu ruang reaksi yang digunakan untuk katalisis. Proses ini dilakukan dengan cara mengikat enzim pada suatu bahan pendukung melalui pengikatan kimia atau secara fisik. Bahan pendukung yang digunakan merupakan polimer. Beragamnya jenis bahan pendukung yang dimanfaatkan dalam teknik immobilisasi enzim termasuk selulosa.

Selulosa merupakan senyawa ekstraselular yang paling banyak ditemukan pada dunia tumbuhan tingkat tinggi maupun rendah, binatang, organisme primitif seperti rumput laut, flagellata, bakteri, ganggang dan oomiset (Wardrop, 1970; Schlegel *et al.*, 1994; Lehninger, 1990). Selulosa merupakan homopolisakarida yang tersusun atas unit-unit D-glukosa dengan selobiosa sebagai unit perulangannya.

Selulosa bakteri nata de coco dihasilkan dari aktivitas organisme *Acetobacter xylinum* yang mampu membentuk membran kartilago, yang mengikat sel bersama-sama dan positif terhadap uji selulosa (Lopez *et al.*, dalam Suranti, 1991). Bakteri ini mempunyai aktivitas dapat memecah glukosa untuk mensintesis selulosa ekstraseluler. Selulosa yang terbentuk berupa benang-benang bersama dengan polisakarida berlendir membentuk suatu jalinan yang terus menebal menjadi lapisan nata. Dari penelitian menggunakan sinar X diketahui bahwa pola selulosa yang dibentuk oleh bakteri *Acetobacter xylinum* identik dengan struktur selulosa kapas (Valla dan Kjobakken, 1982).

Iguchi *et al.* (2000) membuat membran selulosa nata de coco murni dengan memberikan tekanan mekanik pada temperatur tinggi. Pemanfaatan membran selulosa yang dihasilkan oleh bakteri nata de coco oleh Sony Corporation sebagai bahan *loud speaker* dan *headphone*. Mitsubishi Paper Mills Co., memanfaatkan

untuk pembuatan kertas *banknote* dan kitab suci. Pemanfaatan lain yang telah dikembangkan termasuk penggunaan film sebagai kulit temporer dalam perawatan medis, juga fragmen suspensinya sebagai agen penambah viskositas untuk berbagai kebutuhan dan lain sebagainya.

Pemanfaatan katalase dari buah apel sebagai biomaterial sensor merupakan suatu terobosan baru dan katalase yang dihasilkan akan lebih berguna bila dapat digunakan berulang-ulang (*reusable*) dengan aktifitas dan reproduibilitas yang tetap tinggi. Untuk memenuhi hal tersebut, maka pada penelitian ini akan dilakukan immobilisasi terhadap katalase. Hal ini penting mengingat bahwa enzim pada umumnya tidak stabil dan tidak berfungsi dengan baik dalam pelarut organik atau pada temperatur tinggi suatu kondisi reaksi. Selain itu enzim aktif dari campuran reaksi secara teknik sangat sulit dipisahkan untuk digunakan kembali.

Dalam penelitian ini teknik *cross-linking* suatu immobilisasi lebih dipilih karena dapat menghasilkan ikatan kimia yang sangat kuat (Eggins, 1997; Zulfikar dan Hibbert, 2001), sehingga pada kondisi tersebut diharapkan dapat menghasilkan stabilisasi katalase pada beberapa kali pemanfaatannya. Teknik *crosslinking* berkembang dengan banyak ditemukannya agen-agen *crosslinking*. Senyawa – senyawa yang digunakan dalam immobilisasi enzim yaitu oligo (oxoethylene), *ethyl acrylate*, glutaraldehid, heksametil disosianat, *3-mercaptopropionic acid* (3-MPA). Immobilisasi katalase dengan teknik *cross-linking* telah dilakukan dalam proses sterilisasi susu tanpa panas (Winarno, 1995). Teknik *cross-linking* yang memanfaatkan *3-mercaptopropionic acid* (3-MPA) sebagai *cross-link agent* dan selulosa bakteri *Acetobacter xylinum* sebagai bahan pendukung belum banyak dikembangkan. Hal ini berdasarkan adanya penggunaan *3-mercaptopropionic acid* (3-MPA) yang pada awalnya sebagai *covalent agent* (Gobi dan Mizutani, 2001) dan bahan pendukung selulosa bakteri yang mudah diperoleh selain harganya yang murah.

Mengacu dari uraian tersebut, penggunaan membran selulosa sebagai *material support* dalam immobilisasi enzim dapat dikembangkan. Dengan mempertimbangkan biaya, teknik immobilisasi enzim menggunakan membran

nata de coco memberikan peluang yang besar. Penggunaan *3-mercaptopropionic acid* sebagai *crosslinking agent* mempunyai keuntungan yaitu gugus -SH (tiol) terletak pada posisi luar (Zulfikar dan Hibbert, 2001). Hal inilah yang mendorong penggunaan selulosa nata de coco sebagai bahan pendukung dan *3-mercaptopropionic acid* sebagai *crosslinking agent*.

1.2 Perumusan Masalah

Peningkatan kemampuan katalase sebagai biomaterial sensor dilakukan dengan mengimmobilisasikan katalase kedalam selulosa bakteri (selulosa nata de coco) menggunakan *3-mercaptopropionic acid* (3-MPA) sebagai *cross-link agent*. Aspek katalitik katalase hasil immobilisasi ditandai dengan terjadinya perubahan aktivitas katalase dalam mendekomposisi hidrogen peroksida menjadi molekul air dan oksigen.

Pada penelitian ini, digunakan katalase hasil dialisis yang diperoleh berdasarkan isolasi katalase dari buah apel (*Malus sylvestris* varietas *Rome Beauty*) dengan aktivitas 2490.832 unit dan kadar protein 1.443 mg/ml (Anonim, 2003). Dari hasil tersebut diatas, diharapkan aktivitas katalase dalam immobilisasi tidak mengalami penurunan yang begitu besar sehingga layak sebagai biomaterial sensor.

Berdasarkan latar belakang yang dikemukakan, maka beberapa permasalahan yang ingin diungkap dalam penelitian ini adalah :

- a. Adakah perbedaan karakteristik temperatur esterifikasi ?
- b. Adakah perbedaan kadar protein katalase terimmobilisasi dan katalase bebas pada pH optimum terhadap aktivitas ?
- c. Adakah perbedaan kinetika reaksi enzimatik katalase terimmobilisasi pada setiap reaksi esterifikasi?

1.3 Tujuan Dan Manfaat

Perkembangan bioteknologi yang pesat telah melahirkan inovasi baru yang dapat menggantikan proses-proses kimiawi yang telah ada. Hal ini sejalan dengan kebutuhan masyarakat akan teknologi yang ramah, aman dan nyaman terhadap lingkungan. Oleh karena itu berbagai upaya untuk meningkatkan efisiensi proses terus dilakukan melalui modifikasi proses dan peralatan. Salah satunya adalah teknik immobilisasi enzim. Immobilisasi enzim dapat dilakukan melalui pembentukan ikatan antara enzim dengan permukaan membran sehingga enzim akan terakumulasi dipermukaan membran. Hal ini dilakukan dengan membentuk jembatan molekul aktif menggunakan senyawa bifungsi seperti *3-mercaptopropionic acid* (3-MPA). Ikatan molekul yang terbentuk sangat stabil sehingga dapat mengurangi terjadinya penurunan aktifitas enzim yang pada umumnya bersifat labil serta tidak tahan terhadap kondisi yang ekstrim.

Katalase hasil immobilisasi memiliki karakter yang sedikit berbeda dengan katalase bebas hasil isolasi, sehingga diperlukan suatu karakterisasi enzim yang dapat memberikan informasi tentang karakteristik katalase untuk berlangsungnya reaksi enzim secara optimum.

Sesuai dengan perumusan masalah, beberapa tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah :

- a. Untuk memperoleh informasi tentang karakteristik temperatur optimum esterifikasi
- b. Untuk mengetahui pengaruh kadar protein katalase terimmobilisasi dan katalase bebas pada pH optimum
- c. Untuk mengetahui kinetika reaksi enzimatik katalase terimmobilisasi pada setiap reaksi esterifikasi.



2.1 Teknik Immobilisasi

Immobilisasi dapat dianggap sebagai perubahan enzim dari yang larut dalam air atau keadaan "bergerak" menjadi keadaan "tak bergerak" yang tidak larut. Immobilisasi akan dapat mencegah difusi enzim kedalam campuran reaksi dan memudahkan memperoleh kembali enzim dari aliran produk dengan teknik pemisahan padat/cair yang sederhana, sehingga enzim tersebut memungkinkan untuk dapat digunakan beberapa kali (*reusable*).

Beberapa teknik immobilisasi yang telah dikembangkan adalah teknik absorpsi (Eggins, 1997), ikatan ion (Chibata, 1978; Simionescu *et al.*, 1984; Crueger dan Crueger, 1984), kopolimerisasi (Gray, 1980), *entrapment* (tipe kisi dan mikroenkapsulasi) (Chibata, 1978; Crueger dan Crueger, 1984), adhesi-multiplikasi (Hartvigsen *et al.*, 2000), *cross-linking* (murni dan *co-cross-linking*) (Mehaia dan Cheryan, 1990), sol-gel (Wang *et al.*, 2000), retikulasi (Simionescu *et al.*, 1984), ultrafiltrasi (Uragami *et al.*, 1986), koagulasi (Rustamsjah, dkk, 1996), dan teknik ikatan kovalen (diazo, peptida, dan alkilasi) (Chibata, 1978; Crueger dan Crueger, 1984).

2.1.1 Teknik Crosslinking

Teknik *cross-linking* meliputi proses pengikatan enzim secara kimia dengan bahan pendukung padatan lainnya oleh *cross-linking agent*. *Cross-linking agent* atau senyawa dengan dua gugus fungsi yang dapat mengikat sisi aktif enzim dengan membran atau bahan pendukung lainnya antara lain glutaraldehid (Eggins, 1997), heksametil diisosinat (Eggins, 1997), glioksal (etanadial) (Schramm dan Rinderer, 2000), asam 1,2,3,4-butanatetrakarboxilat (Schramm dan Rinderer, 2000), dihidroksimetiloletilenurea (Schramm dan Rinderer, 2000), asam sitrat (Schramm dan Rinderer, 2000), 1,5-dinitro-2,4-difluorobenzena (Eggins, 1997), diamin alifatik, dimetil adipimat, dimetil suberidimat (Smith, 1990), derivat isosianat, bisdiazobenzidin, *N,N'*-polimetilen bisidoacetoamida, *N-N'*-etilen

bismaleimida (Chibata, 1978; Crueger dan Crueger, 1984), karbodiimida dan diaminoetana (Williams dan Ibrahim, 1981), serta formaldehid (Marquie *et al.*, 1997).

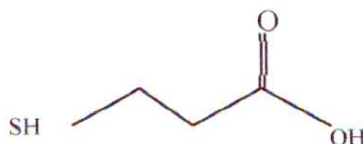
2.1.2 Teknik Immobilisasi Enzim-Selulosa

Teknik immobilisasi dengan menggunakan bahan pendukung selulosa telah banyak dikembangkan. Bagian dari bioaktif molekul yang diikatkan bukan merupakan bagian sisi aktif / katalisis. Umumnya adalah dari gugus amino yang merupakan nukleotil. Gilham (1968) menggunakan selulosa setelah diaktivasi dengan karbodiimida dimana hasil reaksi sangat mudah diganti (exchange) oleh gugus amino dari bioaktif molekul, selulosa yang diaktivasi dengan triklor-triazin (Biagioni, *et al.*, 1978), bead selulosa yang diaktivasi dengan p-nitrofenil kloroformat (Peska *et al.*, 1976; Drobnik *et al.*, 1980).

Teknik immobilisasi enzim pada partikel selulosa secara azotasi, pengikatan laktat dehidrogenase secara *anion exchange* pada lembaran selulosa dan pembuatan derivat tripsin yang tidak larut dalam air menggunakan glutaraldehid pada konyugat tripsin terhadap aminoetil selulosa telah dilaporkan oleh Guilbault (1966, 1968, dan 1970). Zulfikar dan Hibbert (2001) telah mengembangkan teknik *cross-linking* menggunakan selulosa sebagai *material support* dan *3-mercaptopropionic acid* (3-MPA) sebagai *cross-link agent*.

2.2 3-Mercaptopropionic acid (3-MPA)

3-MPA dan turunannya adalah material pokok untuk sintesis dari *PVC-stabilizier* dan digunakan sebagai pemindahan berantai (chain transfer) dan agen *crosslinking* dalam polimerisasi. Senyawa ini juga berguna sebagai katalis ion *exchange*, *coupling agent*, dan *UV-curable formulation*. 3-MPA berwarna bening dengan bau yang kuat seperti material dasar dalam produksi dari *PVC stabilizers*. Berat molekul 106, 14 gr / mole (www. Dow. Com/ hamsphire).



Gambar 1. Struktur 3- MPA

Gray (1980) melaporkan bahwa gugus tiol senyawa *3-mercaptopropionic acid* dapat berikatan dengan gugus tiol suatu enzim untuk membentuk ikatan disulfida, sedangkan gugus hidroksil yang dimiliki akan berikatan dengan gugus hidroksil selulosa. Hal inilah yang menjadi dasar penggunaan *3-mercaptopropionic acid* sebagai *cross-linking agent* dalam teknik immobilisasi. Struktur dari *3-Mercaptopropionic Acid* seperti pada gambar 1.

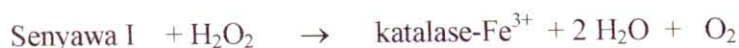
2.3 Katalase

Katalase (H_2O_2 oksidoreduktase EC. 1.11.1.6) adalah sebuah enzim yang sangat luas dalam distribusi organisme aerobik dan dapat dimurnikan dari sejumlah hewan, tumbuhan, dan bakteri. Katalase merupakan suatu hemoprotein yang mengandung 4 gugus heme dengan berat molekular sesungguhnya antara 210.000 – 280.000 (Tanford dan Lovrien, 1961; Higashu dan Peters, 1965; Deisseroth dan Dounce, 1970; Seah dan Kaplan, 1973). Nahmias dan Bewley (1984) melaporkan bahwa berat molekul *Drosophila melanogaster* berkisar antara 265.000 sampai 270.000 dengan masing – masing subunit 58.100 dan pH optimal antara 6,5 – 7,5. *Lumbricus terrestris* mempunyai berat molekul 231.000, yang terdiri atas 4 subunit yang masing – masing 57.700 dengan pH optimal 7 dan enzim tidak aktif pada pH 3,5 dan 9,5 ini ditemukan pada enzim katalase untuk mamalia, dimana spektrum dari bentuk feriheme-protein maksimal pada 620, 540,500, 405 dan 240 nm (Prento dan Prento, 1984).

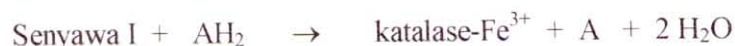
Enzim ini dibutuhkan untuk melindungi selama metabolisme selular yang disebabkan dari destruksi H_2O_2 , radiasi ionisasi, dan distimulasi dari radikal superoksida yang disebabkan oleh H_2O_2 (Masters dan Holmes, 1977; Chance *et. al.*, 1979). Enzim katalase mendekomposisi H_2O_2 melalui dua tahap reaksi. Pertama membentuk sebuah kompleks primer yang disebut senyawa I (Chance dan Oshino, 1971; Dolphin *et. al.*, 1971) antara hidrogen peroksida dan besi dari group hematin prostetik,



Yang kedua sebuah molekul hidrogen peroksida digunakan seperti donor sebuah hidrogen, reaksi katalisis seperti



Pada konsentrasi rendah dari hidrogen peroksida, reaksi peroksidatif (Oshino *et al.*, 1973), dimana membutuhkan sebuah donor lain dari pada hidrogen peroksida (AH_2), berlaku,



donor kimia dalam reaksi mungkin diganti seperti senyawa asam format dan alkohol (Deisseroth dan Dounce, 1970).

2.4 Peranan Katalase

Katalase adalah salah satu enzim yang banyak dimanfaatkan dalam bidang industri makanan dan minuman. Pada milk dan keju, katalase digunakan untuk mendekomposisi hidrogen peroksida dalam proses *cold pasteurisasi* (Whitaker, 1994). Katalase juga digunakan bersama glukosa oksidase pada berbagai produk untuk mengeliminasi glukosa, hidrogen peroksida (Mahoney, 1992) dan oksigen yang menyebabkan oksidasi dan *browning*, serta pada sayuran yang berguna untuk memonitor perkembangan *blanching* (Whitaker, 1994). De Becze (1965) melaporkan bahwa katalase juga digunakan pada pembuatan bir, *salad dressing mayonaise*, pemrosesan telur, dan pada bahan-bahan makanan sensitif.

Menurut De Becze (1965), katalase juga digunakan dalam industri non pangan untuk menghasilkan produk-produk seperti tekstil, karet dan karet busa, kosmetik, kulit, bulu halus, *bleaching*, dan kebutuhan analitis untuk menyingkirkan hidrogen peroksida dalam pembuatan sensor superoksida (Chen *et al.*, 2000).

Katalase hasil immobilisasi juga telah sering dimanfaatkan, misalnya melalui teknik sol-gel (Altstein *et al.*, 1998). Winarno (1995) menyebutkan bahwa katalase hasil immobilisasi melalui teknik ikatan kovalen, adsorpsi, *entrapment* (mikroenkapsulasi) juga telah dimanfaatkan dalam proses sterilisasi susu tanpa panas.

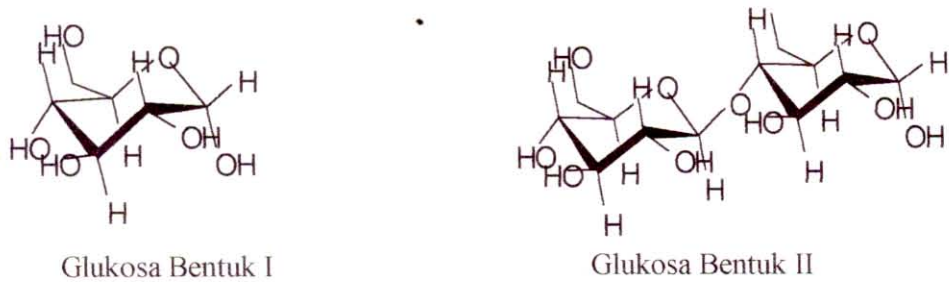
2.5 Selulosa

Selulosa merupakan bahan atau unsur pokok penyusun dinding sel tumbuhan tingkat tinggi (Nevell, Zeronian, 1995). Selulosa adalah karbohidrat masuk dalam golongan polisakarida, mempunyai rumus empiris $(C_6H_{10}O_5)_n$ yang berbentuk polimer (Saunders, 1988). Selulosa tidak hanya merupakan polisakarida struktural ekstraseluler yang paling banyak ditemui pada tumbuhan, tetapi juga merupakan senyawa yang paling banyak diantara semua biomolekul pada tumbuhan atau hewan (Lehninger, 1982).

Selulosa merupakan homopolisakarida linear tidak bercabang, terdiri dari 10.000 atau lebih unit D-glukosa yang dihubungkan oleh ikatan 1-4 glikosida, dengan konfigurasi ikatan β . Perbedaan yang mendasar dari polisakarida yang lain seperti amilosa, amilopektin dan glikogen yang bentuk ikatannya 1-4 α . Selulosa murni hampir tidak mengandung lignin dan zat-zat yang lain (Ighuci, *et al.*, 2000).

Selulosa memiliki berat molekul yang bervariasi antara 500.000 - 1.500.000 dengan jumlah segmen unit D-glukosa antara 100 - 14.000 atau lebih yang dihubungkan oleh ikatan β -1 \rightarrow 4 glikosida (C_1 dan C_4). Dua unit glukosa yang berdekatan bersatu dengan mengeliminasi satu molekul air diantara gugus hidroksilnya pada karbon 1 dan 4.

Segmen glukosa mengandung tiga gugus hidroksil yang sangat *susceptibel* terhadap reaksi kimia, membentuk ester (misalnya selulosa asetat dan selulosa nitrat) dan eter (misalnya etil selulosa). Posisi $-\beta$ dari gugus hidroksil pada C_1 membutuhkan pemutaran unit glukosa sebesar 180° berikutnya melalui rantai utama sumbu C_1 - C_4 cincin piranosa (Fengel *et al.*, 1995) dan relatif *rigid*. Hidrolisis selulosa dengan pemanasan dalam larutan asam klorida menghasilkan D-glukosa 95-96% (Saunders, 1988). Irvine dan Hirst (dalam Scherer *et al.*, 1954) menyebutkan bahwa unit glukosa tersebut merupakan produk akhir hidrolisis asam terhadap selulosa seperti pada gambar 2. Haworth (Scherer *et al.*, 1954) mengelusidasi struktur glukosa dan menemukan bahwa glukosa memiliki dua bentuk stereoisomer yaitu bentuk alfa dan beta, dimana menurut Freudenberg (dalam Scherer *et al.*, 1954) hanya bentuk beta yang terdapat dalam selulosa.



Gambar 2. Hidrolisis selulosa dengan asam menghasilkan glukosa bentuk I dan glukosa bentuk II

Kedua ujung rantai selulosa memiliki gugus hidroksil yang menunjukkan karakteristik berbeda. Gugus C₁-OH adalah gugus hidrat aldehyd yang diturunkan dari pembentukan cincin melalui ikatan hemiasetal intramolekul, sehingga gugus hidroksil pada akhir C₁ bersifat reduktor, sedangkan gugus hidroksil pada akhir C₄ pada rantai selulosa adalah hidroksil alkoholat yang bersifat bukan reduktor (Fengel et al., 1995).

Polimer selulosa sangat hidrofilik, namun tidak larut dalam air, hal ini merupakan akibat kristalinitas, ikatan hidrogen intermolekul antara gugus hidroksilnya dan adanya ikatan β sehingga rantai glukosa pada selulosa membentuk konformasi yang melebar dan mengalami pengelompokan antar sisi menjadi serat yang tidak larut.

2.6 Membran Selulosa Nata De Coco

Kata membran berasal dari bahasa latin "membrana" yang berarti potongan kain (Jones, 1987). Saat ini istilah membran didefinisikan sebagai lapisan tipis (film) yang fleksibel, *barrier* antara dua fasa yang bersifat semipermeabel. Membran tersebut dapat berupa padatan atau cairan (Jones, 1987; Mulder, 1996).

Penggunaan membran sebagai bioreaktor saat ini mengalami perkembangan yang pesat. Penggunaan bioreaktor membran memungkinkan dilakukan operasi yang kontinyu sehingga produktivitas, efisiensi waktu dan penghematan biaya dapat ditingkatkan. Selain itu penggunaan membran

mempunyai keuntungan karena dapat dioperasikan pada kondisi yang lunak sehingga dapat menghindari terjadinya degradasi produk (Kaseno dan Wibisana, 2001).

Komponen dari gel nata de coco adalah selulosa bukan dextran seperti yang diasumsikan pada masa lalu, ini dibuktikan pada tahun 1960-an. Bakteri selulosa digunakan sebagai bahan dasar dari nata de coco, spesies dari bakteri selulosa adalah *Acetobacter xylinum* termasuk bakteri aerobik, dimana dalam aktifitas biologisnya membutuhkan oksigen.

Dengan mempertimbangkan hasil yang diperoleh (Hestrin, Schramm, 1954; Valla, Kjosbakken, 1982) bahwa bakteri aerobik menghasilkan pelikel yang dapat menutup permukaan larutan kultur. Beberapa pendapat bahwa bakteri penghasil selulosa dapat melindungi dari ultra violet (William, Cannon, 1989). Menurut (Ighuci *et al.*, 2000) bakteri dapat melindungi dari *heavy – metal ions*, sebaliknya nutrisi dapat disuplai dengan mudah dari proses difusi.

Lama proses pembuatan nata de coco berkisar 8-10 hari (Ighuci *et al.*, 2000). Setelah terbentuk, nata de coco dipurifikasi dengan larutan alkali (NaOH) dan dicuci dengan air (Brown, 1986). Gel selulosa yang diperoleh masih mengandung air manampakkan pengacakan yang terdapat pada pertemuan/sambungan mikrofibril kurang lebih diameternya 100 Å (Frantz, *et al.*, 1943). Yokota (1983) beranggapan bahwa penyerapan air terjadi di dalam tempat dari orientasi permukaan lembaran, ini bertendensi bahwa orientasi dari membran adalah uniplanar dan menjadi lebih kuat setelah terjadi dehidrasi dari proses pengeringan. Orientasi uniplanar selektif diartikan sebagai pengontrolan dan penataan ulang dari selulosa mikrofibril termasuk membran (Yaginuma, *et al.*, 1986).

III. METODOLOGI



3.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

3.1.1 Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember dan Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga Surabaya.

3.1.2 Waktu

Waktu penelitian selama 5 bulan (terlampir)

3.2. Bahan Dan Alat

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan gelas (*Pyrex Iwaki Glass* dan *Duran Schott*), peralatan bukan gelas, kaca press transparan, *Miyako blender*, corong Buchner dengan pompa vakum *VEB MLW Labortechnik*, *stirrer magnetik Labinco L-32* dengan *spinbar polygon*, pHmeter *Jenway 3320*, neraca analitik *OHAUS AP310-0*, pemanas listrik *MMM Medcenter*, *water bath Memmert WB 7*, *Lab-Line Orbit Shakerbath 3540-1*, spektroskopi infra merah *JASCO-5300 Fourier Transform Infra Red Spectrophotometer*, spektrofotometer UV-VIS *Spectronic 21D Milton Roy Company* dengan kuvet kuarsa lebar 0,5 cm.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah katalase buah apel (*Malus sylvestris* varietas *Rome Beauty*) hasil dialisis dengan aktivitas spesifik (unit/mg protein) sebesar 191,7738 dan kadar protein 1,4432 mg/ml, selulosa bakteri nata de coco dan kertas saring. Seluruh bahan-bahan bersifat kimiawi memiliki *grade pro analysis* meliputi tris(hidroksimetilamino)metana ($C_4H_{11}NO_3$), asam klorida (HCl), hidrogen peroksida (H_2O_2), asam sulfat (H_2SO_4), etanol (C_2H_5OH), kalium permanganat ($KMnO_4$), *coomassie brilliant blue R-250 (CBB)*, asam fosfat (H_3PO_4), natrium hidroksida pellet (NaOH), *3-mercaptopropionic acid*

(3-MPA, $\text{SHC}_3\text{H}_5\text{O}_2$), *bovine serum albumin* (BSA), natrium oksalat ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$), asam oksalat dihidrat ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), phenolphthalein ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$), dan aquadest.

3.3 Metodologi Penelitian

3.3.1 Preparasi Nata de Coco

Nata de coco sebanyak 500 gr dicuci dengan air sampai bersih. Nata de coco kemudian diblender selama 30 menit dan direndam dalam larutan NaOH 2% (telah distandardisasi dengan HCl standar) selama ± 12 jam (Piluharto, 2003). *Juice* nata de coco yang diperoleh kemudian dinetralkan dengan aquadest, selanjutnya disaring dan dibuat membran. *Juice* nata de coco yang dihasilkan disebut selulosa nata de coco.

3.3.2 Hidrolisis selulosa nata de coco

Selulosa nata de coco dihidrolisis dengan menambahkan asam sulfat 2 M disertai dengan pengadukan. Selulosa nata de coco kemudian disaring dan dibuat membran (Zulfikar dan Hibbert, 2001).

3.3.3 Esterifikasi selulosa nata de coco dengan 3-Mercaptopropionic Acid (3-MPA)

Selulosa nata de coco terhidrolisis kemudian disaring dan ditambahkan 3-MPA 5 M sambil diaduk beberapa menit (± 60 menit) dalam *waterbath*. Variasi temperatur yang digunakan dalam proses esterifikasi adalah 80°C , 90°C dan 100°C . Hasil esterifikasi kemudian disaring dan dibuat membran.

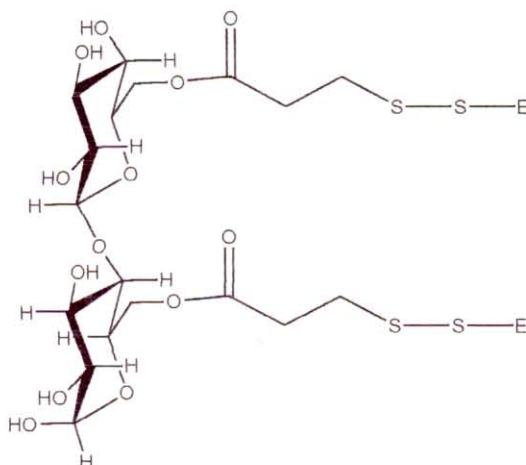
3.3.4 Cross-linking selulosa nata -MPA dengan katalase

Variasi pH yang digunakan dalam proses immobilisasi adalah 5 – 9. Buffer yang digunakan yaitu Tris 0,1 M. Proses Immobilisasi diawali dengan menambahkan katalase hasil dialisis (dengan Na_2EDTA) sebanyak ± 10 ml kedalam campuran selulosa nata-MPA sambil diaduk pada temperatur 4°C . Setelah campuran menjadi homogen kemudian dibuat membran.

3.3.5 Penentuan aktivitas katalase dengan spektrofotometer

Penentuan aktivitas dilakukan berdasarkan metode Cohen *et al.* (Graham dan Higgins, 1993) pada 4°C . Membran selulosa nata de coco berukuran tertentu yang telah mengandung katalase terimmobilisasi dicelupkan

pada campuran uji yang mengandung buffer Tris 0,1 M (pH 8,5) dan 0,5 ml hidrogen peroksida 6 mM (telah distandardisasi dengan kalium permanganat) sebagai substrat. Campuran dikocok dan setelah tiga menit ditambahkan 0,1 ml asam sulfat 6 N untuk menghentikan reaksi dan larutan kalium permanganat 0,01 N yang telah distandardisasi menggunakan natrium oksalat.



Gambar 3. Pola crosslinking selulosa nata-MPA-katalase

Blanko merupakan campuran yang serupa namun asam sulfat ditambahkan terlebih dahulu pada sampel. Absorbansi dibaca pada 480 nm selama 1 menit dengan pengulangan sebanyak tiga kali. Aktivitas katalase dinyatakan sebagai 1 unit per ml. larutan enzim, dimana 1 unit didefinisikan sebagai hidrogen peroksida 1 μmol yang didekomposisi tiap menit.

3.3.6 Pengukuran pH optimum immobilisasi

Katalase yang terimmobilisasi pada berbagai pH berdasarkan variasi temperatur esterifikasi 80, 90, dan 100 $^{\circ}\text{C}$ diukur aktivitasnya secara spektrofotometri (sub bab 3.3.5). Katalase dengan pH tertentu yang memiliki aktivitas terbesar merupakan katalase dengan pH optimum. Penentuan dilakukan sebanyak tiga kali.

3.3.7 Penentuan konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimum (V_m)

Konstanta Michaelis-Menten (K_m dalam mM) ditentukan berdasarkan plot persamaan garis lurus (persamaan Line Weaver-Burk) antara $1/\text{rata-rata kecepatan reaksi}$ ($1/V$ dalam mM.menit⁻¹) katalase terimmobilisasi terhadap $1/\text{konsentrasi hidrogen peroksida}$ ($1/[S]$ dalam mM⁻¹) dengan rentang konsentrasi 1 - 150 mM. Katalase yang digunakan memiliki aktivitas yang seragam dalam buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5).

3.3.8 Penentuan kadar protein katalase terimmobilisasi

Penentuan protein dilakukan berdasarkan metode Bradford (Whitaker, 1994) dengan standar *bovine serum albumin* (BSA). Reagent Bradford dibuat dengan melarutkan 100 mg *coomassie brilliant blue* dalam campuran 100 ml. asam fosfat 85 % dan 50 ml. etanol 95 %. Campuran dilarutkan dengan aquadest hingga 1000 ml.

Reagent Bradford sebanyak 1 ml. ditambahkan pada campuran 20 μl ekstrak katalase dan 50 μl . NaOH 1 M (telah distandardisasi). Campuran kemudian dikocok dan diinkubasi selama 5 menit. Serapan dibaca pada panjang gelombang 590 nm.

Kurva standar BSA dibuat dengan cara menyiapkan beberapa larutan BSA standar dari larutan induk dengan kadar 5 hingga 40 $\mu\text{g/ml}$. Setiap larutan tersebut diperlakukan sama seperti larutan sampel enzim. Serapan setiap larutan yang terukur pada panjang gelombang 590 nm dicatat, dan dibuat kurva antara kadar BSA terhadap serapan.

3.3.9 Karakterisasi membran

Membran selulosa bakteri hasil hidrolisis, esterifikasi, dan katalase yang terimmobilisasi pada selulosa bakteri dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer *Ultra Violet-Visible*, *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) dan fotomikroskop. Sebagai kontrol, digunakan membran selulosa nata-MPA tanpa katalase dan membran selulosa nata murni.

3.4 Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh berdasarkan hasil pengulangan dianalisis menggunakan standar deviasi (s), dimana :

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}}$$

x : hasil pengukuran

n : jumlah pengukuran keseluruhan (jumlah data)

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Crosslinking katalase buah apel melalui ikatan gugus thiol enzim dengan gugus *thiol* dari membran selulosa nata-MPA memiliki karakteristik sebagai berikut

1. Karakteristik FTIR membran
 - a. Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA pada perlakuan esterifikasi 80° – 100°C tidak memperlihatkan perbedaan. Terdapatnya serapan karbonil (C=O) 1660-1720 cm⁻¹ dan ester pada 1059 cm⁻¹, hal ini menunjukkan bahwa reaksi terjadi secara esterifikasi antara gugus OH dari selulosa dengan gugus karboksilat dari 3-MPA. Gugus SH menyerap pada panjang gelombang 800-900 cm⁻¹.
 - b. Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA-Katalase terimmobilisasi pada perlakuan esterifikasi 80° – 100°C memberikan sinyal ikatan disulfida pada panjang gelombang 400-500 cm⁻¹.
2. Karakteristik spektrofotometri UV-VIS membran
 - a. Membran selulosa nata murni : 320, 490, dan 660 nm
 - b. Membran selulosa nata terhidrolisa : 320, 490, dan 655 nm, terjadinya pergeseran serapan dari 660 nm pada membran selulosa nata murni ke 655 nm pada membran selulosa nata terhidrolisa disebabkan oleh adanya ester sulfat.
 - c. Membran selulosa nata-MPA esterifikasi temperatur 80°C-100°C : 320, 490, dan 655 nm. Serapan ini tidak berbeda dengan membran selulosa nata terhidrolisa. Hal ini disebabkan oleh atom yang mempunyai pasangan elektron bebas seperti S dari 3-MPA.
 - d. Membran selulosa nata-MPA-katalase esterifikasi temperatur 80°C-100°C : 320, 490, dan 655 nm. Tidak adanya perbedaan yang



diperlihatkan oleh serapan pada setiap perlakuan yang berbeda hanyalah intensitas serapan dari setiap perlakuan.

3. Temperatur optimum pada reaksi esterifikasi selulosa nata-MPA adalah 90°C - 100°C yang ditunjukkan oleh intensitas serapan, penurunan intensitas serapan total pada 80°C sebesar 30.24% sedangkan untuk 90°C sebesar 36.85% dan 100°C sebesar 32.69%. Dari hasil yang diperoleh bahwa terjadi ester lebih banyak pada temperatur 90°C - 100°C dimana intensitas serapan dipengaruhi oleh banyaknya molekul yang terikat.
4. Dari hasil yang diperoleh bahwa aktivitas katalase terimmobilisasi pada esterifikasi selulosa nata-MPA 80°C (CI) sebesar 1045.133 unit serta nilai K_m adalah 1.544 mM dan V_{max} 36.755 unit/ml. Pada 90°C (CII) sebesar 1047.115 unit untuk K_m adalah 3.418 mM dan V_{max} 46.948 unit/ml dan 100°C (CIII) sebesar 1047.115 unit, harga K_m adalah 1.623 mM dan V_{max} 31.949 unit/ml. Sedangkan untuk aktivitas katalase bebas adalah 2490.832 unit, K_m adalah 5.2 mM dan V_{max} 16.3 unit/ml. Kecepatan reaksi enzimatik katalase terimmobilisasi lebih lambat daripada katalase bebas, hal ini berkaitan dengan orientasi substrat terhadap sisi aktif enzim serta laju difusi.
5. Kadar protein katalase terimmobilisasi pada perlakuan temperatur esterifikasi selulosa nata-MPA 80°C (CI) adalah 196.44 mikrogram/ml, 90°C (CII) sebesar 94.87 mikrogram/ml dan 100°C (CIII) sebesar 26,82 mikrogram/ml. Hal ini memperlihatkan perbedaan kadar protein dari ketiga perlakuan dimana temperatur esterifikasi 80°C (CI) lebih besar. Berbeda dengan hasil aktivitas katalase terimmobilisasi yang diperoleh, bahwa kadar protein yang terikat pada membran selulosa nata-MPA bukan sebagai parameter dalam penentuan aktivitas. Besarnya kadar protein pada esterifikasi selulosa nata-MPA 80°C (CI) dimungkinkan adanya protein enzim yang lain selain katalase.

5.2 Saran

Crosslinking katalase pada selulosa nata de coco yang dimodifikasi dengan 3-MPA dapat digunakan sebagai dasar pembuatan sensor hidrogen peroksida. Berdasarkan hasil yang diperoleh aktivitas katalase terimmobilisasi hasil dialisis tidak mengalami penurunan yang cukup besar. Dengan hasil tersebut maka, pembuatan suatu biosensor disarankan tidaklah harus menggunakan enzim yang murni seperti yang selama ini dikembangkan dalam biosensor. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai esterifikasi selulosa nata dengan 3-MPA. Ditinjau dari segi biaya pembuatan biosensor menggunakan enzim hasil dialisis (*crude* enzim) sangat murah dibandingkan menggunakan enzim yang murni.

DAFTAR PUSTAKA

- Altstein, M., Segev G., Aharonson N., Ben-Aziz O., Turniansky A., dan Avnir D. 1998, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** (Vol. 46, August) no. 8 pp. 3318 – 3324.
- Anonymous, Tanpa tahun, **HTTP: //www. Dow. Com./ hamsphire/evans/merck. Html**
- Anonim, 2003, Purifikasi Parsial Katalase dari Buah Apel Varietas Rome Beauty, **Penelitian** (tidak dipublikasi), Jember.
- Brown, A.J., 1986, **Journal Chem. Soc**, 49,172.
- Buchanan, R. E., dan Gibbons N. E.. 1974, **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore : Williams & Wilkins
- Chen, J., Wollenberger U., Lisdat F., Ge B., dan Scheller F. W, 2000, **Sensors and Actuators B** (Vol. 70) pp. 115 – 120.
- Chibata, I., 1978, **Immobilized Enzyme**, Tokyo : Kondansha Ltd.
- Cresswell J.C, Runquist A.O, Cambell M.M, 1982, Analisis Spektrum Senyawa Organik, Penerbit ITB Bandung, Bandung.
- Crueger, W., dan Crueger A, 1984, "Biotechnology". Dalam Brock, T. D. (ed.) **A Textbook of Industrial Microbiology**, Madison : Science Technology Inc.
- De Becze, G. I., 1965, "Enzymes, Industrial". Dalam Mark, H. F., McKetta J.J. Jr., Othmer D. F., dan Standen A. (ed.) **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology** (Vol. 8). New York : John Wiley & Sons Inc.
- Drobnik, J., Saudek V., dan Kalal J., 1980, **Polymer Bulletin** (Vol. 2, January) no. 1 pp.7 -14.
- Eggins, B. R., 1997, **Biosensor. An Introduction**. Chichester : John Wiley & Sons Inc.
- Fengel, D., dan Wegener G, 1995, **Kayu : Kimia, Ultrastruktur, Reaksi – Reaksi**. Terjemahan Sastrohamidjojo, H., dan Prawirohatmodjo S. dari *Wood : Chemistry, Ultrastucture, Reactions* (1989). Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Frantz, E., Schielbold E., 1943, **Journal Macromol. Chem.**, 1, 4.

- Gobi, K. V., dan Mizutani F., 2001, **Analytical Sciences** (Vol. 17, January) no. 1 pp. 11 – 15.
- Gong, Y., Toivonen P. M. A., Wiersma P. A., Lu C., dan Lau ,O. L., 2000, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** (Volume 48, November) no. 11 pp. 5537 – 5542.
- Graham, J. M., dan Higgins J. A, 1993, "Isolation and Analysis: The Identification of Subcellular Fractions from Mammalian Cells". Dalam Graham J. M. (ed.) **Methods in Molecular Biology Biomembrane Protocols I** (Vol. 19). Totowa: Humana Press. pp. 1 - 18.
- Gray, G. R., 1980, **Analytical Chemistry Annual Reviews Fundamental** (Vol. 52, April) no. 5 pp. 9R – 15R.
- Guilbault, G. G., 1966, **Analytical Chemistry Annual Reviews Fundamental** (Vol. 38, April) no. 5 pp. 527R – 536R.
- 1968, **Analytical Chemistry Annual Reviews Fundamental** (Vol. 40, April) no. 5 pp. 459R – 471R.
- 1970, **Analytical Chemistry Annual Reviews Fundamental** (Vol. 42, April) no. 5 pp. 334R – 349R.
- Hartvigsen, K., Hansen L. F, Lund P., Bukhave K, dan Holmer G., 2000, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** (Vol. 48, December) no. 12 pp. 5842 – 5849.
- Haska, N., 1996, Determinasi Kondisi Reaksi Optimal Dan Stabilitas Selulase (Avicelase Dan CMC-Ase) Yang Dihasilkan *Penicillium Brunneum*, **Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi**, No 24, 41-46.
- Iguchi, M., Yamanaka S, dan Budhiono A., 2000, **Journal of Materials Science** (Vol. 35) pp. 1-10.
- Jones, G. L., dan Masters C. J., 1976, **Comparative Biochemistry and Physiology** (Vol. 55B) pp. 263 – 268.
- Jones, A. J., 1987, **Membrane and Separation Technology; The Australian Perspective**. Canberra : Australian Government Publishing Service
- Kaseno, dan Wibisana A., 2001, **Jurnal Biosains dan Bioteknologi Indonesia** (Vol. 1, September) no. 1 hal. 1 – 6.
- Lehninger, A. 1997. **Dasar-Dasar Biokimia I**. Terjemahan Thenawijaya, M. dari *Principles of Biochemistry* (1982). Jakarta : Erlangga.

- Marquié, C., Tessier A-M, Áymard C., dan Guilbert S., 1997, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** (Vol. 45, March) no. 3 pp. 922 – 926.
- Mehaia, M. A., dan Cheryan M., 1990, "Membrane Bioreactors : Enzyme Processes". Dalam Schwartzberg, H. G., dan M. A. Rao (ed.). **Biotechnology and Food Process Engineering**. New York : Marcel Dekker, Inc. pp. 67 – 126.
- Mulder, M., 1996, **Basic Principles of Membrane Technology**. Dordrecht : Kluwer Academic Publisher
- Nahmias, J. A, Bewley, G. C., 1984, Characterization Of Catalase Purified From *Drosophila Melanogaster* By Hydrophobic Interaction Chromatography, **Comp. Biochem. Physiol.**, vol 77B, no. 2, p. 355-364.
- Nevell T.P., Zeronian S.H., 1995, “ **Cellulose Chemistry And Applications**”, edited by Nevell T.P & Zeronian S.H., Howwood Ltd, p 15
- Piluharto.B, 2003, Kajian Sifat Fisik Film Tipis Nata de Coco Sebagai Membran Ultrafiltrasi, **Jurnal Ilmu Dasar**, Volume 4, Nomor 1, pp 52-57.
- Prento, P., dan Prento A., 1984, **Comparative Biochemistry and Physiology** (Vol. 77B) no. 2 pp. 325 – 328.
- Ratnadewi, A. A. I., Neran, dan Naqib M., 2002. **Laporan Penelitian : Isolasi Dan Karakterisasi Katalase Dari Buah Apel (*Malus sylvestris*) Sebagai Biomaterial Sensor**. Jember : Departemen Pendidikan Nasional RI Lembaga Penelitian Universitas Jember.
- Rustamsjah, Narkanti, dan Sasongko S., 1996, **Majalah IPTEK** (Vol. 7) no. 2 hal. 95 – 102.
- Saunders, K.J., 1988, **Organic Polymer Chemistry**. London : Chapman and Hall.
- Schelegel, H. G., Schmidt, K., 1994, **Mikrobiologi Umum**, terjemahan Baskoro, R. M. T., Wattimena, J. R., 1985, dari *Allgemeine Mikrobiologie 6. Uberarbeitete Auflage*, Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Scherer, P. C., dan Mauerberger H. R., 1954, **Matthew's Textile Fibers; Their Physical, Microscopic, and Chemical Properties**. New York : John Wiley & Sons Inc.
- Schramm, C., dan Rinderer B., 2000, **Analytical Chemistry** (Vol. 72, December) no. 23 pp. 5829 – 5833.

- Silverstein, Bassler, Morrill, 1986, **Penyidikan Spektrometri Senyawa Organik**, terjemahan Hartono A.J, Putra V.A, edisi keempat, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Simionescu, C. I., Dumitriu S., Popa M., Dumitriu M., dan Moldovan F., 1984. **Polymer Bulletin** (Vol. 12, November) no. 5 pp. 369 - 374.
- Smith, J. E., 1990, **Prinsip Bioteknologi**. Terjemahan Sumo, U. F., Sumantri B., dan Subono A. dari *Biotechnology Principles* (1985). Jakarta : PT Gramedia.
- Suranti, 1991, **Laporan penelitian : Variasi Kadar gula pada Pembuatan nata dengan coco**, Jember : departemen Pendidikan dan Kebudayaan republik Indonesia Pusat penelitian Universitas Jember.
- Uragami, T., Aketa T., Gobodani S., dan Sugihara M., 1986, **Polymer Bulletin** (Vol. 15, February) no. 2 pp. 101 - 106.
- Vianawati, O.I, 2003, Studi Immobilisasi Crosslinking Katalase Hati Sapi pada Membran Nata de Coco dengan Asam 3-Merkapto propanoat, **Skripsi**, FMIPA, Universitas Jember.
- Wang, K. -M., Li., Yang J. X. -h, Shen, F. -I., dan Wang X., 2000, **Sensors and Actuators B** (Vol. 65) pp 239 - 240.
- Whitaker, J. R., 1994, **Principles of Enzymology for The Food Sciences**. New York : Marcel Dekker Inc.
- Williams, A., dan Ibrahim I. T., 1981, **Chemical Review** (Vol. 81, August) no. 4 pp. 589 - 636.
- Winarno, F. G., 1995, **Enzim Pangan**. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama
- Yaginuma, Y., Takai, M., Hayashi, J., 1986, The Preferential Orientation In Bacterial Cellulose Membrane, **Journal Polymer Science**, vol 24 no 7 hal 327.
- Yokota, H., 1983, The Selective Uniplanar Orientation Phenomenon In Regenerated Cellulose Sheets Derivate From Microfibrillated Wood Pulp By Mercerization, **Journal Polymer Science**, vol 21 no 3 hal 285-287.
- Yudianti R., Indrarti L., Nuraena N., 1998, Pengaruh Water Soluble Polymer (WSP) dan Pengocokan Dalam Pembuatan Komposit Bioselulosa, **Telaah**, Jilid XIX, Nomor 1-2. pp 12-19
- Zey, A., 1996, Pengaruh Beberapa Ion Logam, pH dan Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim D-Glukosa Oksidase, **Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi**, No 24, 110-133.

Zulfikar, dan Hibbert D. B., 2001, **Report Non Degree Program : Study of Nata de Coco Membrane Surface.** (unpublished).

Zulfikar, 2001, Surface Study of Pure and Hydrolyzed Nata de Coco Membran, **Journal Agribisnis**, Volume V, Nomor 2, pp 18-25.

DAFTAR LAMPIRAN

1. Lampiran 1. Spektra FTIR selulosa nata de coco murni
2. Lampiran 2. Spektra FTIR selulosa nata terhidrolisa
3. Lampiran 3. Spektra FTIR selulosa nata-MPA esterifikasi T 80°C
4. Lampiran 4. Spektra FTIR selulosa nata-MPA esterifikasi T 90°C
5. Lampiran 5. Spektra FTIR selulosa nata-MPA esterifikasi T 100°C
6. Lampiran 6. Spektra FTIR selulosa nata-MPA-katalase esterifikasi T 80°C
7. Lampiran 7. Spektra FTIR selulosa nata-MPA-katalase esterifikasi T 90°C
8. Lampiran 8. Spektra FTIR selulosa nata-MPA-katalase esterifikasi T 100°C
9. Lampiran 9. Spektra FTIR *3-Mercaptopropionic acid* (MPA)
10. Lampiran 10. Spektra FTIR katalase
11. Lampiran 11. Data aktivitas katalase terimmobilisasi esterifikasi 80°C-100°C pada pH immobilisasi 5-9.
12. Lampiran 12. Data aktivitas katalase terimmobilisasi pada pH maksimal, Data pengaruh absorpsi terhadap KMnO_4 dan pengaruh absorpsi terhadap bovine serum albumin
13. Lampiran 13. Preparasi larutan
14. Lampiran 14. Rumus Perhitungan

Lampiran 1

Spektra FTIR membran selulosa nata de coco murni

JASCO FT/IR-5300

Date : 03/03/07 10:53

File Name :

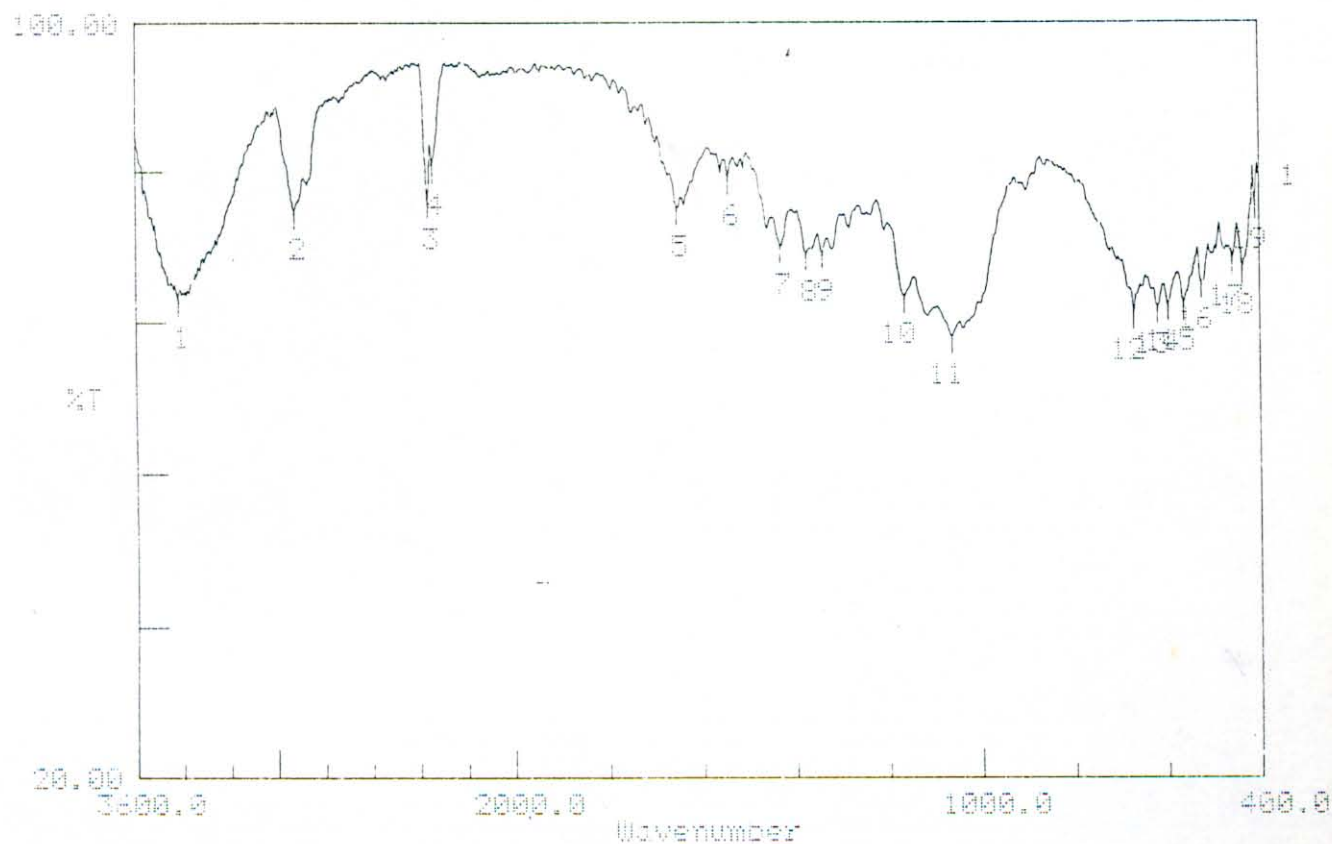
Sample Name: NATA.MURNI

Resolution : 4

Scans : 16

Gain : 5

Apodization: CS



Condition
 upper 100.00 lower 20.00 depth 2.00

Peak table

1:	3418.17(70.5)	2:	2920.49(79.8)	3:	2361.08(80.9)
4:	2341.79(84.6)	5:	1653.14(80.0)	6:	1541.26(83.3)
7:	1429.38(76.1)	8:	1373.44(75.3)	9:	1338.72(75.4)
10:	1163.18(70.8)	11:	1060.94(66.6)	12:	669.36(69.1)
13:	619.21(69.7)	14:	596.06(70.0)	15:	561.34(70.1)
16:	524.69(72.3)	17:	457.17(74.8)	18:	435.95(73.9)
19:	408.95(80.8)				

Lampiran 2

Spektra FTIR membran selulosa nata terhidrolisa

JASCO FT/IR-5300

Date : 03/03/07 19:59

File Name :

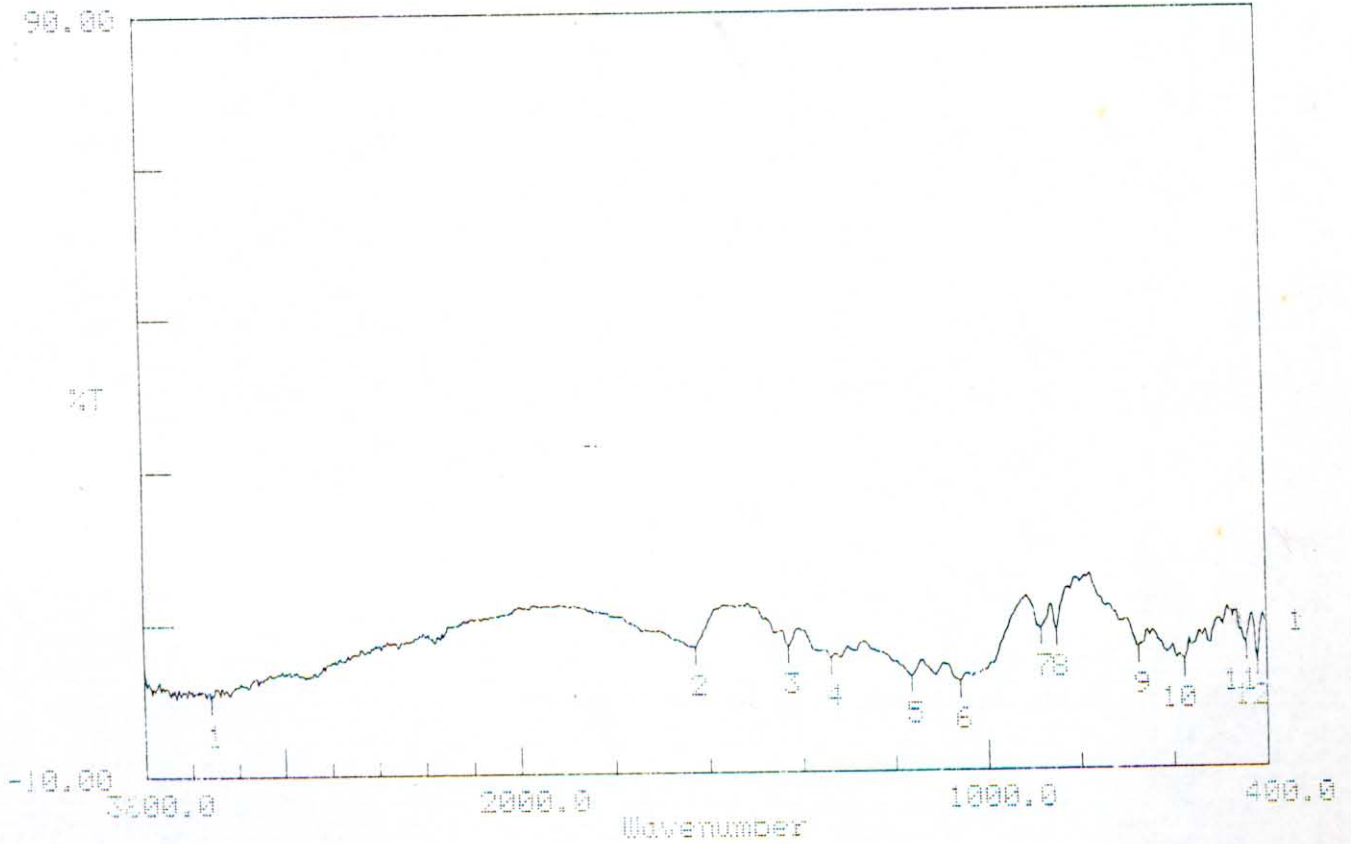
Sample Name: NATA.HI

Resolution : 4

Scans : 16

Gain : 50

Apodization: CS



Condition

upper 90.00 lower -10.00 depth 2.00

Peak table

1:	3315.93(0.5)	2:	1628.07(6.5)	3:	1429.38(6.5)
4:	1336.79(5.0)	5:	1163.18(2.5)	6:	1059.02(1.8)
7:	883.48(8.6)	8:	850.68(8.6)	9:	673.22(6.0)
10:	574.84(4.1)	11:	443.67(6.4)	12:	420.52(4.3)

Lampiran 3

Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA T 80°C

JASCO FT/IR-5300

Date : 03/03/07 11:00

File Name :

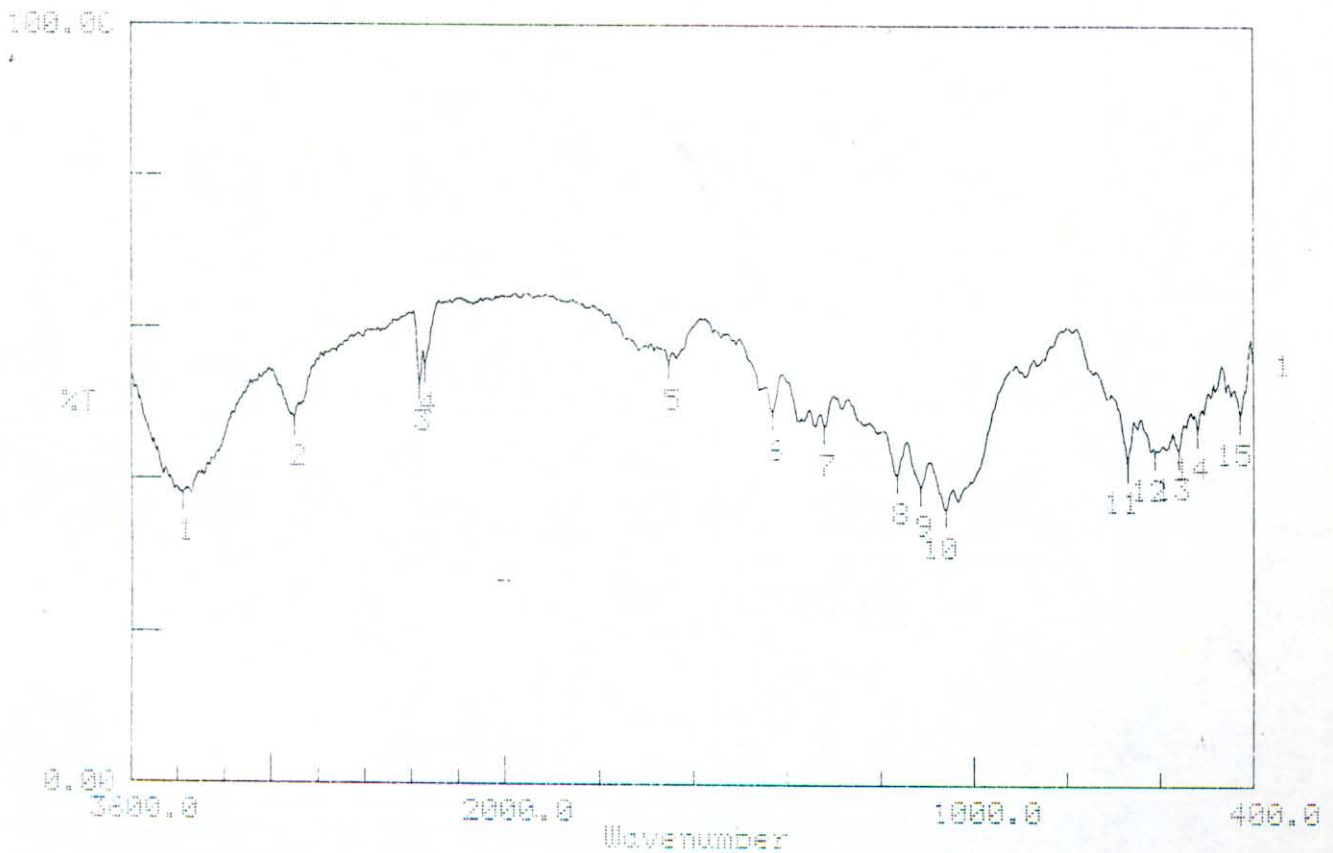
Sample Name: N-MPA.00

Resolution : 4

Scans : 16

Gain : 5

Apodization: CS



Condition
 upper 100.00 lower 0.00 depth 2.00

Peak table

1:	3379.59(38.1)	2:	2899.27(48.0)	3:	2364.94(52.7)
4:	2339.86(55.0)	5:	1653.14(55.6)	6:	1429.38(49.0)
7:	1317.50(47.1)	8:	1163.18(40.7)	9:	1113.03(39.2)
10:	1059.02(36.2)	11:	667.43(42.3)	12:	609.56(44.0)
13:	559.41(44.1)	14:	518.90(46.9)	15:	428.24(48.7)

Lampiran 4

Spektra FTIR membran selulosa:nata-MPA T 90°C

JASCO FT/IR-5300

Date : 03/03/07 11:08

File Name :

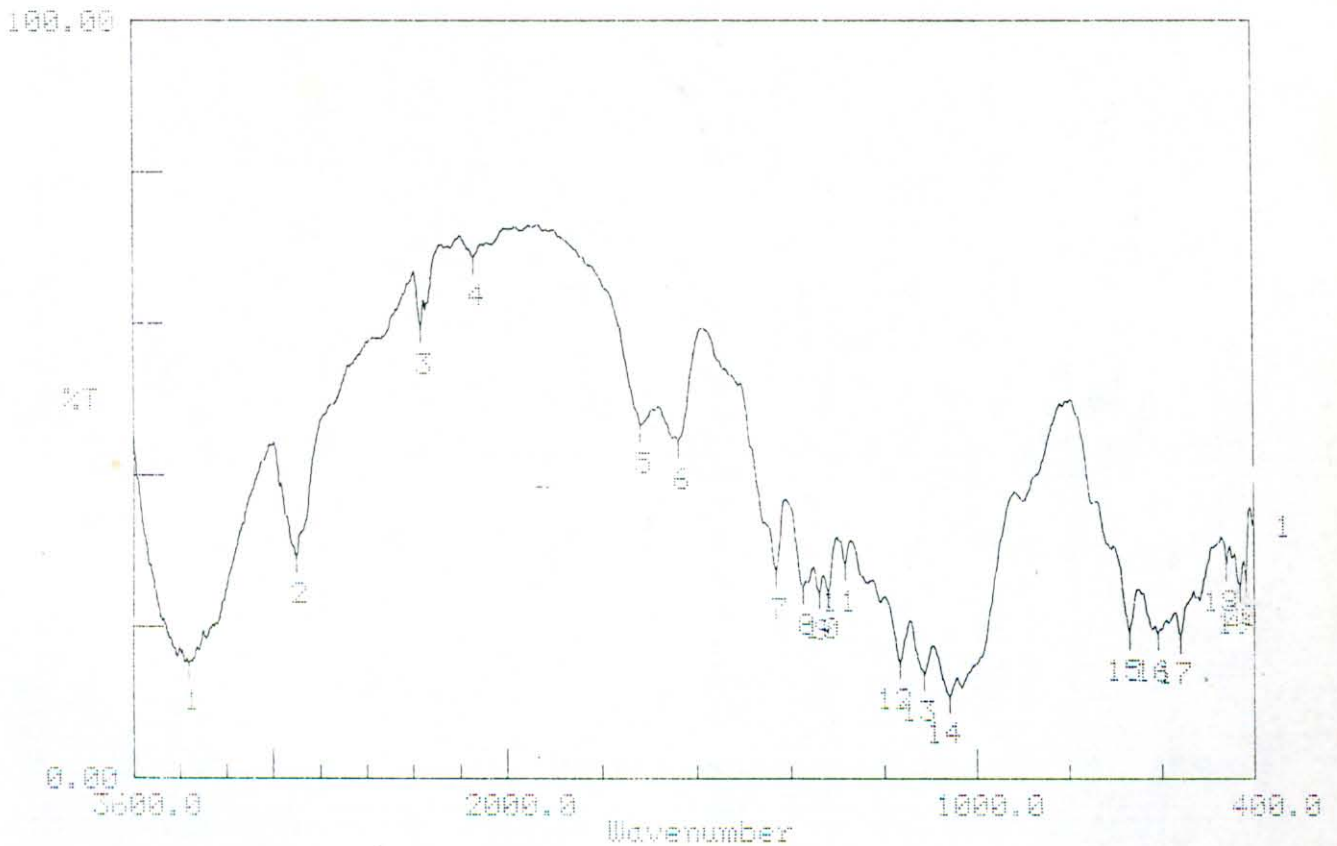
Sample Name: N-MPA.90*

Resolution : 4

Scans : 16

Gain : 10

Apodization: OS



Condition

upper 100.00 lower 0.00 depth 2.00

Peak table

1:	3362.23(15.2)	2:	2897.34(29.5)	3:	2361.08(59.7)
4:	2137.32(68.8)	5:	1716.80(46.7)	6:	1635.78(44.5)
7:	1429.38(27.5)	8:	1371.51(25.3)	9:	1336.79(24.6)
10:	1317.50(24.8)	11:	1280.85(28.5)	12:	1165.11(15.5)
13:	1113.03(13.8)	14:	1059.02(11.0)	15:	667.43(19.3)
16:	607.63(19.3)	17:	559.41(19.0)	18:	459.10(28.5)
19:	430.16(25.5)	20:	416.66(26.5)		

Lampiran 5

Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA T 100°C

JASCO FT/IR-5300

Date : 03/03/07 11:14

File Name :

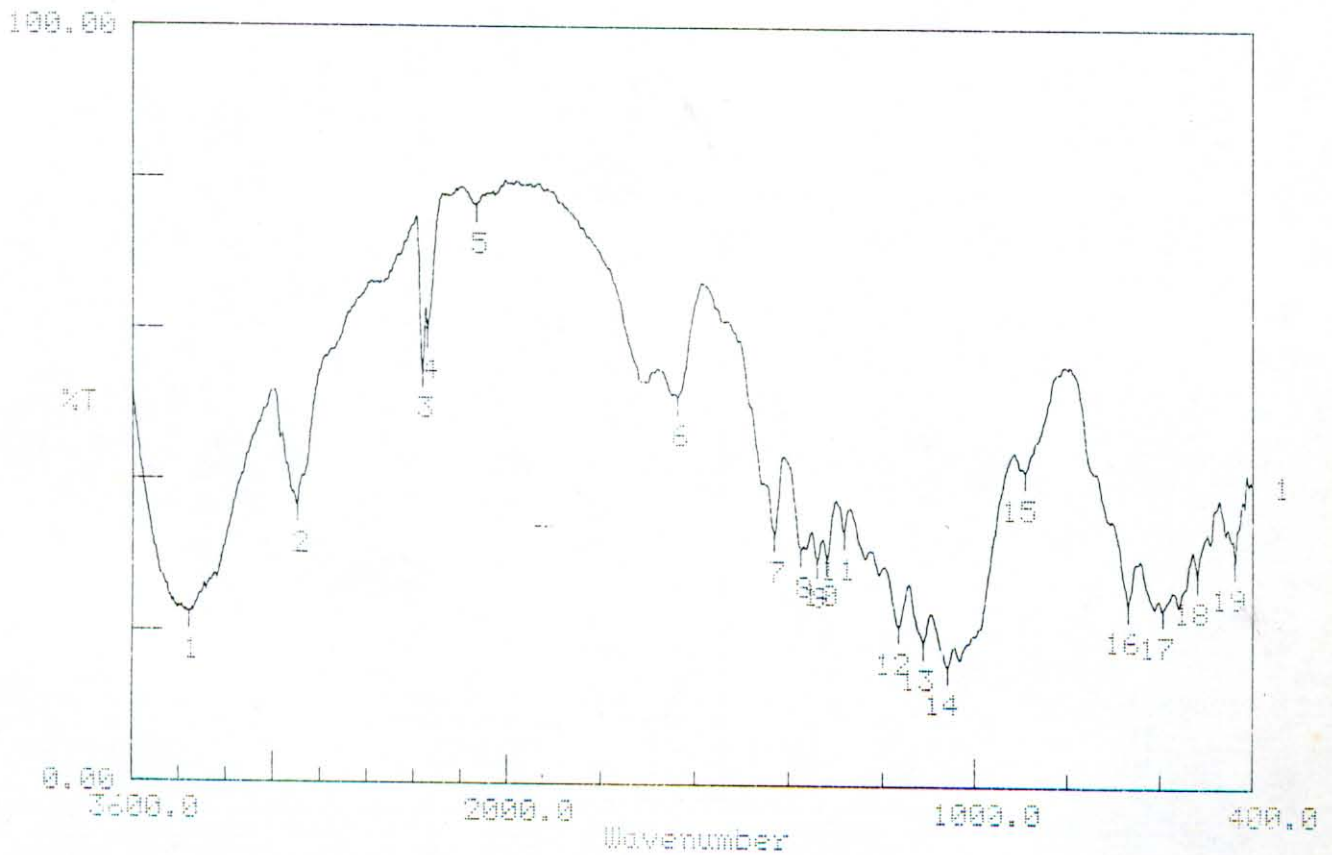
Sample Name: N-MPA.100

Resolution : 4

Scans : 16

Gain : 5

Apodization: CS



Condition
 upper 100.00 lower 0.00 depth 2.00

Peak table

1:	3358.37(22.4)	2:	2895.41(36.7)	3:	2361.08(54.5)
4:	2341.79(59.7)	5:	2133.46(76.5)	6:	1635.78(51.2)
7:	1429.38(33.3)	8:	1373.44(31.3)	9:	1338.72(30.8)
10:	1317.50(30.3)	11:	1298.85(33.7)	12:	1165.11(21.2)
13:	1111.10(19.2)	14:	1059.02(16.0)	15:	889.26(41.7)
16:	667.43(24.2)	17:	594.13(23.6)	18:	518.90(28.3)
19:	457.86(30.2)				

Lampiran 6

Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA-katalase T 80°C

JASCO FT/IR-5300

Date : 03/03/97 11:20

File Name :

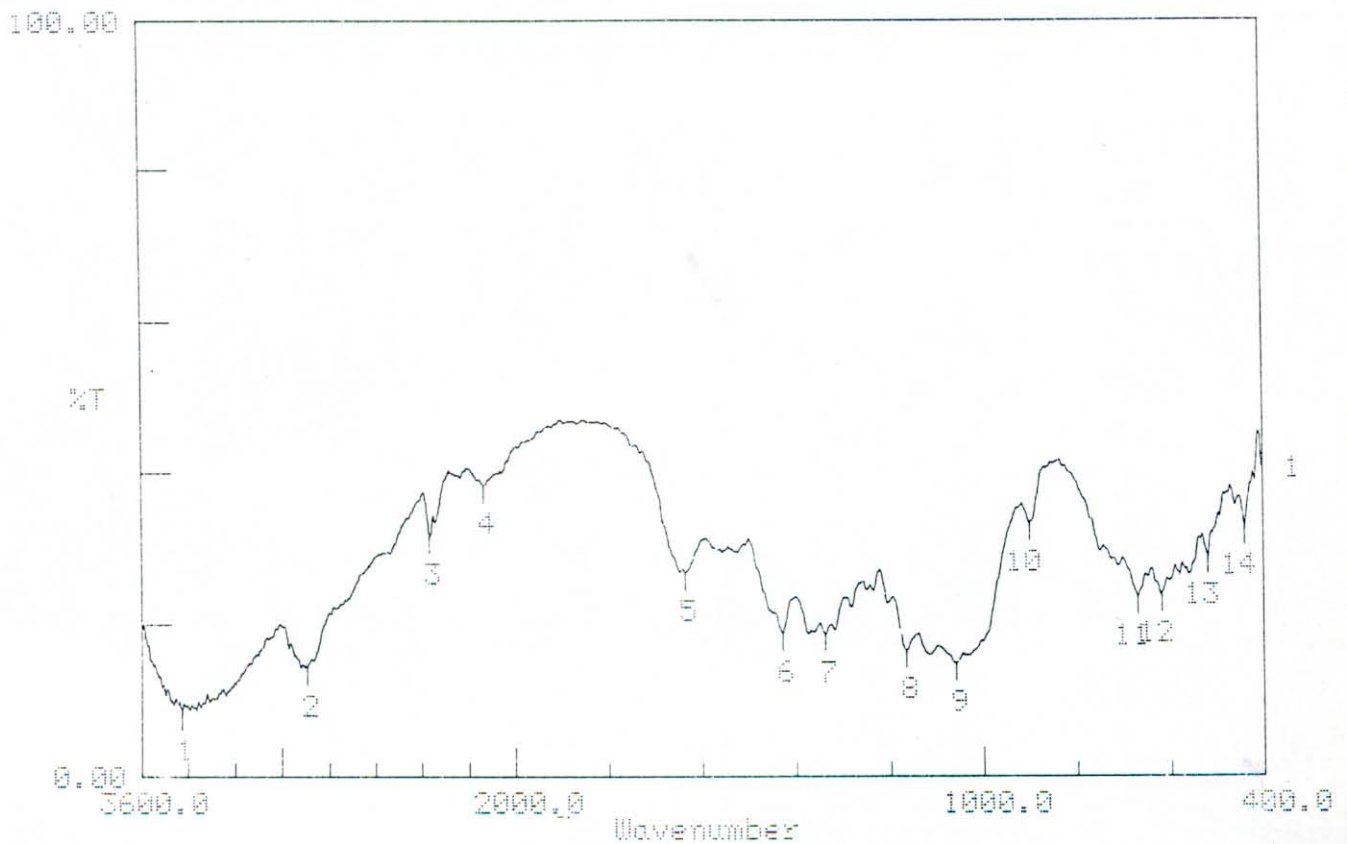
Sample Name: NMPA-K.80

Resolution : 4

Scans : 16

Gain : 10

Apodization: CS



Condition
 upper 100.00 lower 0.00 depth 2.00

Peak table

1:	3427.81(8.6)	2:	2891.56(14.3)	3:	2363.01(31.7)
4:	2133.46(38.3)	5:	1633.85(26.7)	6:	1427.45(18.7)
7:	1336.79(18.7)	8:	1165.11(16.6)	9:	1059.02(14.8)
10:	898.91(33.3)	11:	669.36(23.5)	12:	619.21(23.9)
13:	518.90(28.8)	14:	439.81(32.7)		

Lampiran 7

Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA-katalase T 90°C

JASCO FT/IR-5300

Date : 03/03/07 11:26

File Name :

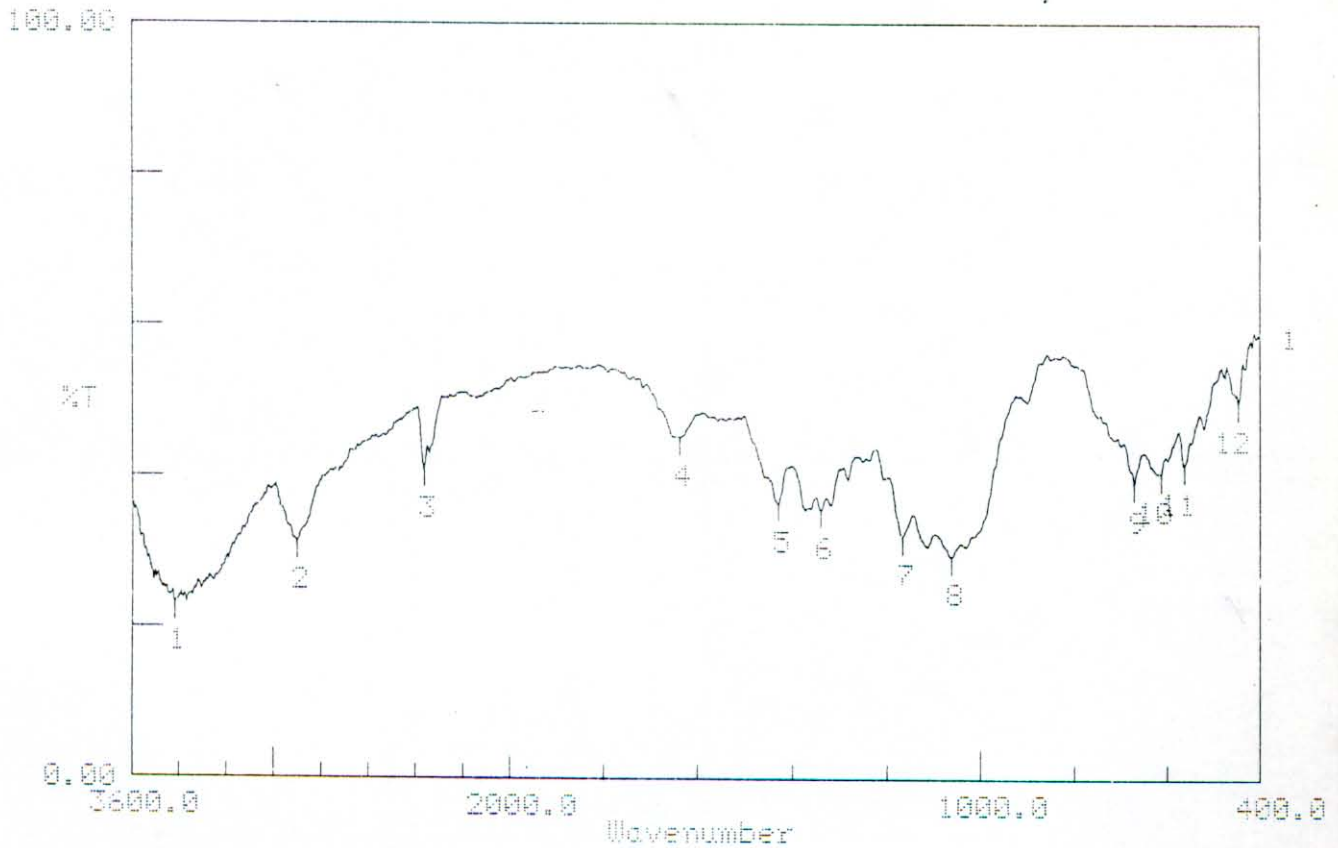
Sample Name: NMPA.K.90

Resolution : 4

Scans : 16

Gain : 10

Apodization: OS



Condition
 upper 100.00 lower 0.00 depth 2.00

Peak table

1:	3418.17(23.1)	2:	2981.20(31.3)	3:	2361.08(40.9)
4:	1635.78(45.2)	5:	1427.45(36.4)	6:	1338.72(35.6)
7:	1165.11(32.2)	8:	1068.94(29.5)	9:	669.36(39.2)
10:	611.49(40.5)	11:	561.34(41.6)	12:	445.60(49.9)

Lampiran 8

Spektra FTIR membran selulosa nata-MPA-katalase T 100°C

JASCO FT/IR-5300

Date : 03/03/07 11:33

File Name :

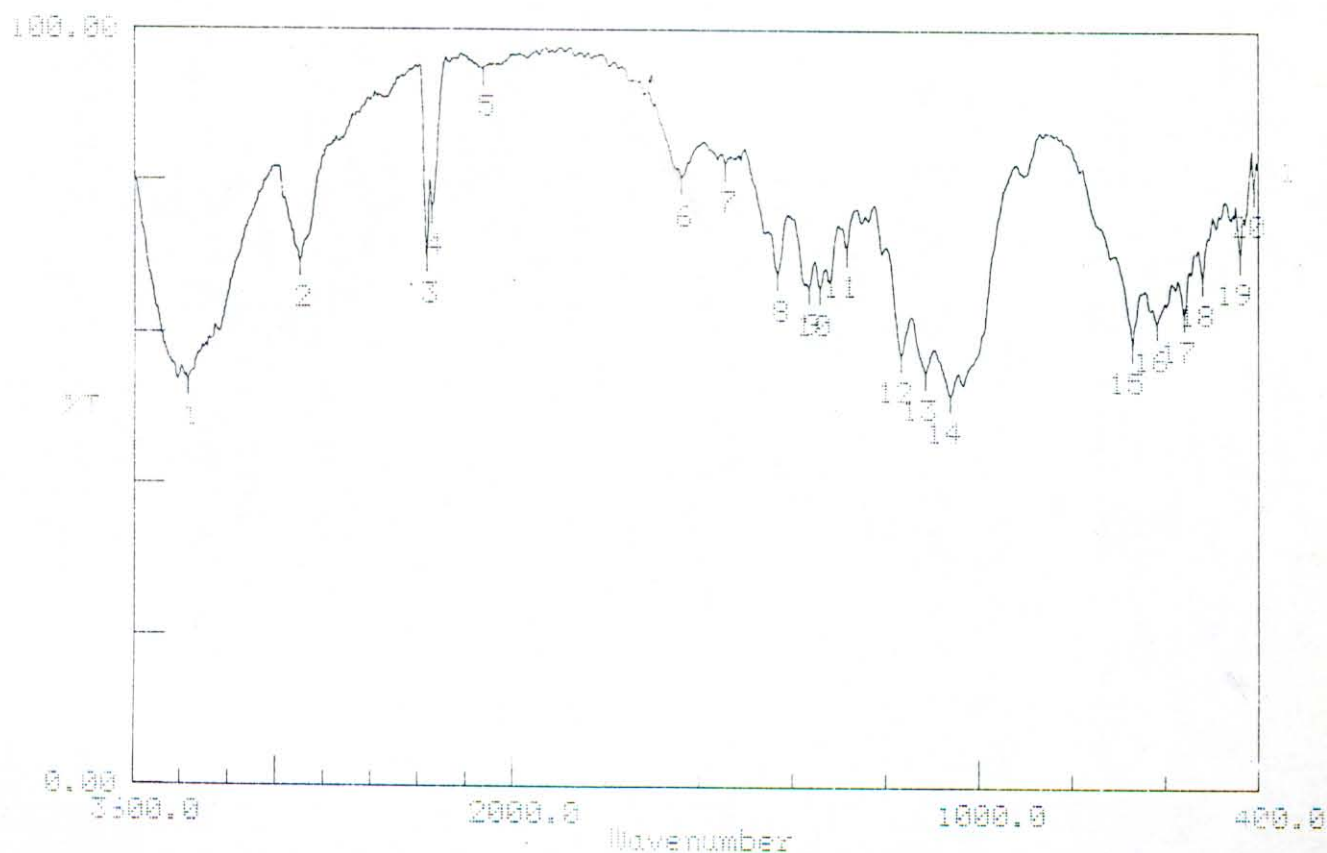
Sample Name: NMPA.K.100

Resolution : 4

Scans : 16

Gain : 5

Apodization: OS



Condition
 upper 100.00 lower 0.00 depth 2.00

Peak table

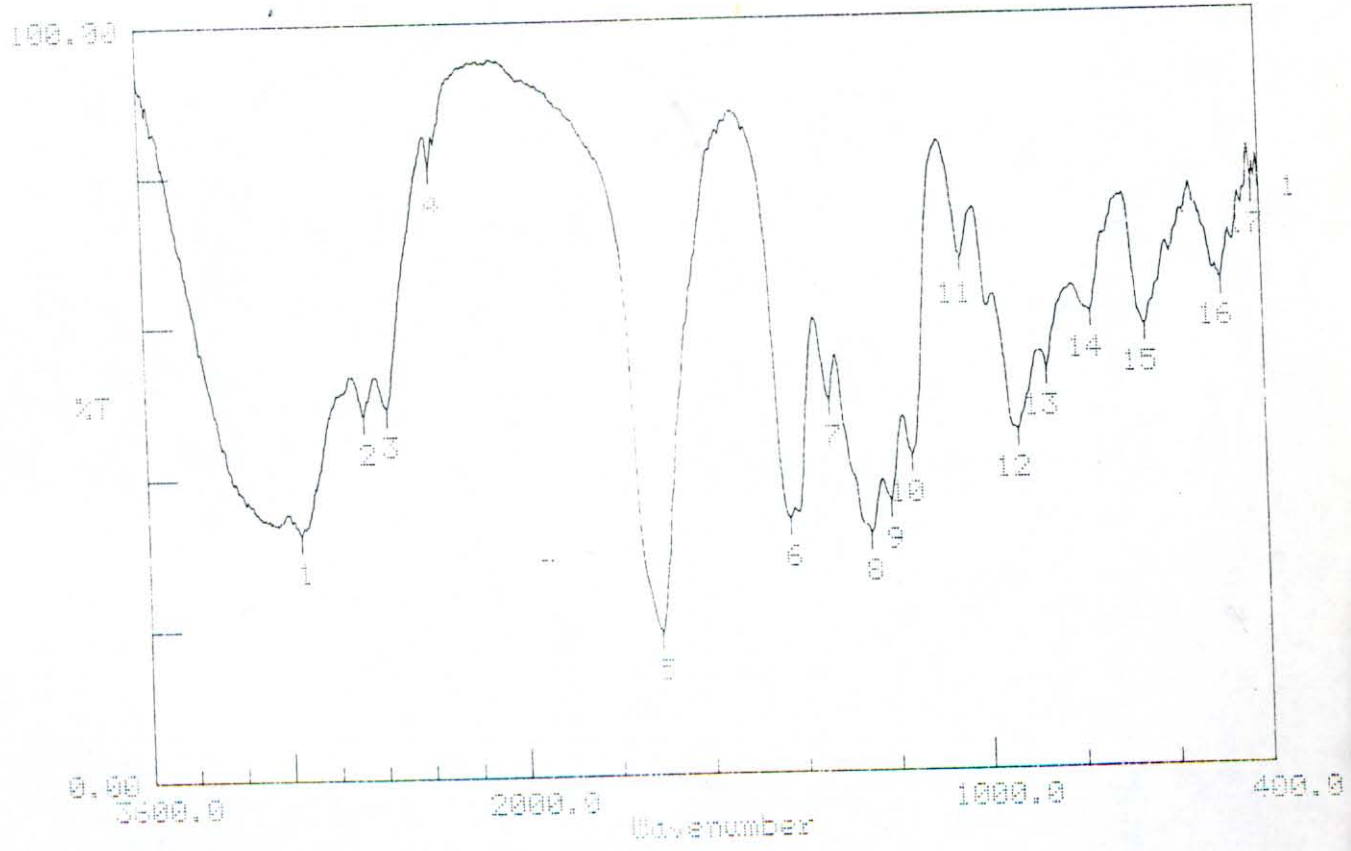
1:	3371.87(53.8)	2:	2999.27(69.6)	3:	2361.98(70.3)
4:	2341.79(76.6)	5:	2123.82(94.8)	6:	1635.78(80.4)
7:	1541.26(82.3)	8:	1429.38(68.0)	9:	1361.87(66.4)
10:	1338.72(66.2)	11:	1290.85(71.4)	12:	1165.11(57.4)
13:	1113.03(55.1)	14:	1060.94(52.1)	15:	669.36(58.8)
16:	617.28(61.8)	17:	559.41(63.1)	18:	518.90(67.9)
19:	437.88(70.8)	20:	408.95(79.5)		

Lampiran 9

Spektra FTIR 3-Mercaptopropionic acid

JASCO FT/IR-5300

Date : 03/03/07 10:47
 File Name :
 Sample Name: 3-MPA
 Resolution : 4
 Scans : 16
 Gain : 5
 Apodization: CS



Condition
 upper 100.00 lower 0.00 depth 2.00

Peak table

1: 2947.50(32.6)	2: 2869.72(48.0)	3: 2571.34(49.0)
4: 2366.87(81.1)	5: 1709.08(18.9)	6: 1425.52(33.6)
7: 1336.79(49.3)	8: 1251.91(31.5)	9: 1207.55(35.7)
10: 1159.32(41.8)	11: 1045.51(67.7)	12: 929.77(44.8)
13: 866.12(52.7)	14: 769.67(60.2)	15: 653.93(58.2)
16: 498.83(64.2)	17: 416.66(76.2)	

Lampiran 10

Spektra FTIR katalase hasil dialisis

JASCO FT/IR-5300

Date : 03/03/07 10:41

File Name :

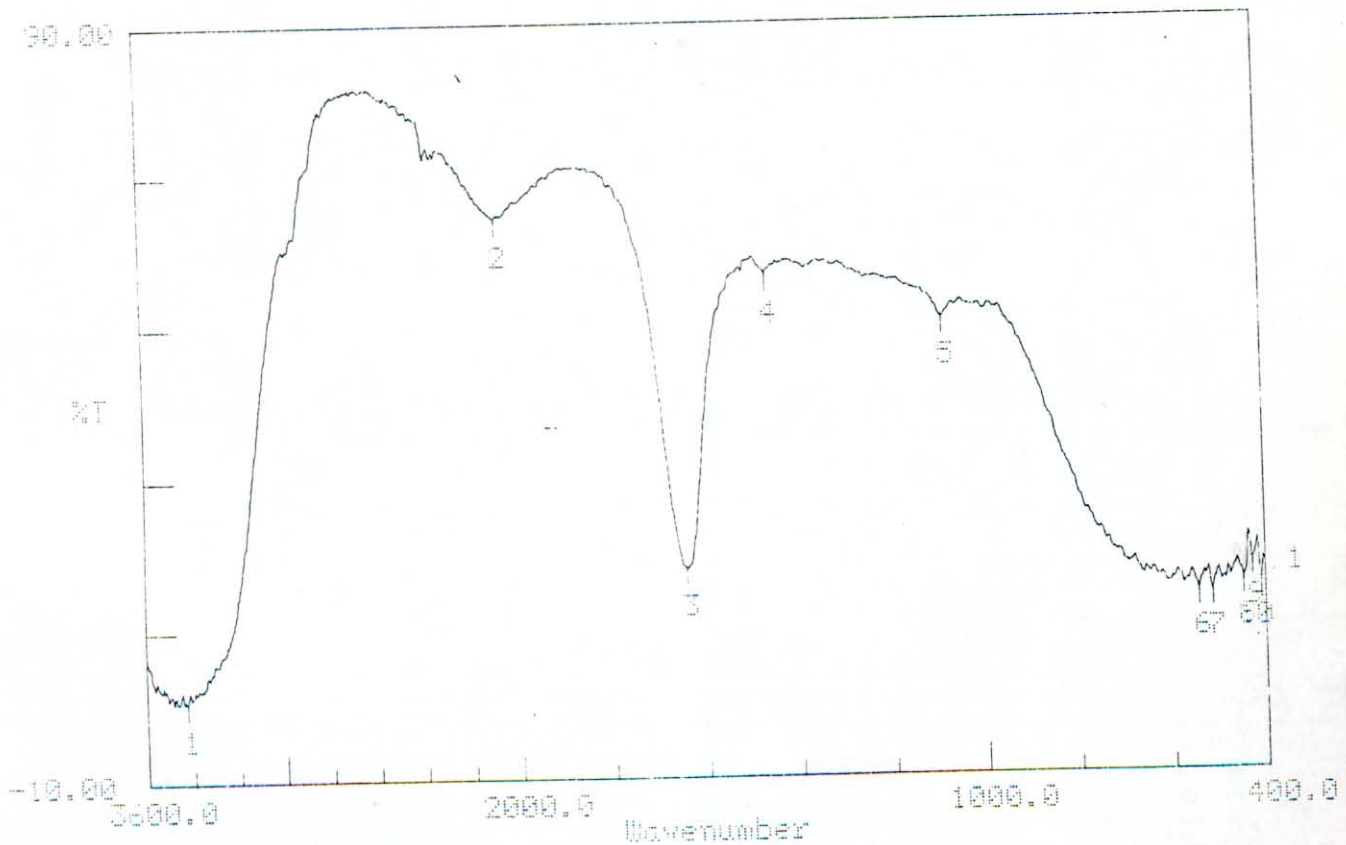
Sample Name: KATALASE

Resolution : 4

Scans : 16

Gain : 5

Apodization: CS



Condition
upper 90.00 lower -10.00 depth 2.00

Peak table

1:	3427.81(0.6)	2:	2973.66(64.2)	3:	1639.64(17.8)
4:	1458.32(56.4)	5:	1082.16(50.5)	6:	542.85(14.1)
7:	513.11(14.1)	8:	445.60(15.5)	9:	426.31(18.0)
10:	408.95(15.4)				

Lampiran 11

Data aktivitas katalase terimmobilisasi estērifikasi 80°C-100°C pada pH immobilisasi 5-9

Data Absorbansi Penentuan Aktivitas katalase Terimmobilisasi Esterifikasi T 80° C

pH	Ulangan			Rerata	Rerata x 50	[KMnO ₄]	[H ₂ O ₂]
	1	2	3				
5	0.704	0.704	0.702	0.703	35.166667	415.67499	1039.187475
6	0.704	0.704	0.704	0.704	35.2	416.07134	1040.178359
7	0.704	0.704	0.706	0.705	35.233333	416.4677	1041.169243
8	0.706	0.708	0.708	0.707	35.366667	418.05311	1045.132778
9	0.704	0.702	0.704	0.703	35.166667	415.67499	1039.187475

Data Absorbansi Penentuan Aktivitas katalase Terimmobilisasi Esterifikasi T 90° C

pH	Ulangan			Rerata	Rerata x 50	[KMnO ₄]	[H ₂ O ₂]
	1	2	3				
5	0.704	0.704	0.704	0.704	35.2	416.07134	1040.178359
6	0.704	0.706	0.704	0.705	35.233333	416.4677	1041.169243
7	0.704	0.706	0.706	0.705	35.266667	416.86405	1042.160127
8	0.706	0.71	0.71	0.709	35.433333	418.84582	1047.114546
9	0.706	0.706	0.71	0.707	35.366667	418.05311	1045.132778

Data Absorbansi Penentuan Aktivitas katalase Terimmobilisasi Esterifikasi T 100° C

pH	Ulangan			Rerata	Rerata x 50	[KMnO ₄]	[H ₂ O ₂]
	1	2	3				
5	0.704	0.706	0.708	0.706	35.3	417.2604	1043.151011
6	0.706	0.706	0.708	0.707	35.333333	417.65676	1044.141895
7	0.706	0.706	0.712	0.708	35.4	418.44946	1046.123662
8	0.71	0.704	0.712	0.709	35.433333	418.84582	1047.114546
9	0.704	0.704	0.708	0.705	35.266667	416.86405	1042.160127

Lampiran 12

Data aktivitas katalase terimmobilisasi pada pH maksimal, data pengaruh absorban terhadap KMnO_4 dan pengaruh absorbansi terhadap bovine serum albumin

Data Absorbansi Penentuan K_m dan kecepatan reaksi (V_{max}) Esterifikasi T 80° C

[H ₂ O ₂]	ulangan			rerata	V	1/V	1/[S]
	1	2	3				
5	1.155	1.165	1.16	1.16	28.287753	0.035351	0.2
10	1.265	1.27	1.275	1.27	31.557669	0.031688	0.1
20	1.28	1.285	1.285	1.283	31.954023	0.031295	0.05
40	1.3	1.305	1.31	1.305	32.598098	0.0306766	0.025
50	1.36	1.37	1.38	1.37	34.530321	0.0289601	0.02
60	1.41	1.42	1.4	1.41	35.719382	0.027996	0.016666667
80	1.42	1.43	1.43	1.427	36.214824	0.027613	0.0125
100	1.44	1.45	1.45	1.447	36.809354	0.027167	0.01
150	1.44	1.45	1.46	1.45	36.908442	0.0270941	0.006666667
500	1.46	1.45	1.46	1.457	37.106619	0.0269494	0.002
1000	0.009	0.01	0.011	0.01	-5.8977408	-0.1695565	0.001

Data Absorbansi Penentuan K_m dan kecepatan reaksi (V_{max}) Esterifikasi T 90° C

[H ₂ O ₂]	ulangan			rerata	V	1/V	1/[S]
	1	2	3				
5	1.145	1.14	1.14	1.142	27.742767	0.0360454	0.2
10	1.38	1.38	1.38	1.38	34.827586	0.0287129	0.1
20	1.65	1.66	1.65	1.653	42.952834	0.0232814	0.05
40	1.66	1.67	1.66	1.663	43.250099	0.0231213	0.025
50	1.43	1.42	1.43	1.427	36.214824	0.027613	0.02
60	1.62	1.61	1.6	1.61	41.664685	0.0240011	0.016666667
80	1.39	1.39	1.39	1.39	35.124851	0.0284699	0.0125
100	1.46	1.47	1.46	1.463	37.304796	0.0268062	0.01
150	1.3	1.305	1.3	1.302	32.499009	0.0307702	0.006666667
500	1.39	1.39	1.39	1.39	35.124851	0.0284699	0.002
1000	0.017	0.016	0.017	0.017	-5.699564	-0.175452	0.001

Data Absorbansi Penentuan K_m dan kecepatan reaksi (V_{max}) Esterifikasi T 100°C

[H ₂ O ₂]	Ulangan			Rerata	V	1/V	1/[S]
	1	2	3				
5	1.026	1.024	1.024	1.025	24.264764	0.041212	0.2
10	1.062	1.06	1.058	1.06	25.315101	0.0395021	0.1
20	1.121	1.215	1.215	1.184	28.99128	0.0344931	0.05
40	1.2	1.195	1.2	1.198	29.427269	0.0339821	0.025
50	1.25	1.245	1.245	1.247	30.864051	0.0324002	0.02
60	1.285	1.28	1.285	1.283	31.954023	0.031295	0.016666667
80	1.285	1.28	1.285	1.283	31.954023	0.031295	0.0125
100	1.285	1.285	1.285	1.285	32.003567	0.0312465	0.01
150	1.44	1.43	1.43	1.433	36.413	0.0274627	0.006666667
500	1.53	1.54	1.53	1.533	39.385652	0.02539	0.002
1000	0.011	0.012	0.013	0.012	-5.8382878	-0.1712831	0.001

Data Pengaruh Absorbansi Terhadap KMnO_4

[KMnO ₄] μmol	Absorbansi (480 nm)
0	0.086
5	0.602
10	1.155
15	1.420
20	1.780

Data absorbansi terhadap bovine serum albumin

Kadar BSA (mikrogram/ml)	Absorbansi
2.5	0.294
5	0.436
10	.754
20	1.04
30	1.468
40	1.79

Lampiran 13

PREPARASI LARUTAN

1. Reagen Warna Bradford (buffer kerja Bradford) (Metode Stoschek, 1990)
Sebanyak 100 mg CBB G-250 dilarutkan dalam campuran 100 melakukan H_3PO_4 85% dan 50 melakukan $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 95%. Setelah larut sempurna, kemudian ditambahkan aquadest dingin hingga volume 1 liter.
2. Pembuatan Larutan albumin Metode Vogel (Svehla *et. al.*, 1996)
Sebanyak 0,1 g dilarutkan dalam 20 melakukan aquadest untuk memperoleh larutan koloid 500 μM .
3. Pembuatan Larutan H_2O_2 1 M
Sebanyak 10,21 ml H_2O_2 30% ($\pm 9,79$ M) dilarutkan dalam 100 ml aquadest
4. Pembuatan Larutan KMnO_4 0,01 N
Sebanyak 0,0316 g KMnO_4 dilarutkan dalam 100 ml aquadest
5. Pembuatan Larutan H_2SO_4 2 M
Sebanyak 11,22 melakukan H_2SO_4 95% ($\pm 17,822$ M) dilarutkan dalam 100 ml aquadest
6. Pembuatan Larutan NaOH 2%
Sebanyak 2 gr NaOH *pellet* dilarutkan dalam 100 ml aquadest
7. Pembuatan Larutan Phenolphthallein 0,5% Metode Vogel (Svehla *et. al.*, 1996)
Sebanyak 0,5 g $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOH})\cdot\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$ dalam 100 ml etanol 96%
8. Pembuatan Larutan Tris 0,1 M Metode Scopes (1982)
Sebanyak 1,214 g Tris dilarutkan dalam 100 ml aquadest
9. Pembuatan Larutan $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$
Sebanyak 0,25-0,3 g dilarutkan dalam 100 ml aquadest
10. Pembuatan Larutan HCl 0,1 M
Sebanyak 1ml HCl 30% (10,093 M) dilarutkan kedalam 100 ml aquaedst.

Lampiran 14

RUMUS PERHITUNGAN

1. Perhitungan Aktivitas (unit)

Data Absorbansi Aktivitas Katalase Terimmobilisasi Esterifikasi 80°C

pH	Ulangan		
	1	2	3
5	1.035	1.035	1.037
6	1.035	1.035	1.035
7	1.035	1.035	1.033
8	1.033	1.031	1.031
9	1.035	1.037	1.035

Data Absorbansi Aktivitas Katalase Terimmobilisasi Esterifikasi 90°C

pH	Ulangan		
	1	2	3
5	1.035	1.035	1.035
6	1.035	1.033	1.035
7	1.035	1.033	1.033
8	1.033	1.029	1.029
9	1.033	1.033	1.029

Data Absorbansi Aktivitas Katalase Terimmobilisasi Esterifikasi 100°C

pH	Ulangan		
	1	2	3
5	1.035	1.033	1.031
6	1.033	1.033	1.031
7	1.033	1.033	1.027
8	1.027	1.035	1.027
9	1.035	1.035	1.031

Data diatas dihitung menggunakan rumus dibawah ini, hasil perhitungan pada lampiran 34.

$$\text{aktivitas (unit)} = \frac{\left(\left(\frac{(1,78 - (A_{480} - A_{\text{blanko}}) \times fp) - 0,1674}{0,0841} \right) \times 2,5 \right)}{1 \text{ menit}}$$

keterangan: 1,78 absorbansi KmnO_4 pada konsentrasi 0,02 M
0,1674 dan 0,0841 diperoleh dari persamaan kurva standar

Perhitungan Aktivitas total (unit/ml)

$$\text{aktivitas total} = \frac{\text{unit}}{\text{ml enzim}}$$

2. Perhitungan Spesifik Total (unit/mg)

$$\text{aktivitas spesifik total} = \frac{\text{aktivitas total}}{\text{mg / ml enzim}}$$

3. Perhitungan Kadar Protein (%)

$$\text{kadar protein} = \frac{(A_{590} \times fp) + 1,225}{0,3103}$$

keterangan : 1,225 dan 0,3103 diperoleh dari persamaan garis kurva standar.

4. Perhitungan Persentase Intensitas Serapan (A)

$$\text{Intensitas \%} = \frac{\Sigma A \text{ perlakuan}}{\Sigma A \text{ banyaknya perlakuan}} \times 100$$

