



**UJI KINETIKA DAN OPTIMASI KONSENTRASI ENZIM
ENDO- β -1,4-D-XILANASE PADA PROSES HIDROLISIS
XILAN KULIT KOPI UNTUK PRODUKSI
XILOOLIGOSAKARIDA**

SKRIPSI

Oleh

**Riza Maulana Sari
NIM 131810301039**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**UJI KINETIKA DAN OPTIMASI KONSENTRASI ENZIM
ENDO- β -1,4-D-XILANASE PADA PROSES HIDROLISIS
XILAN KULIT KOPI UNTUK PRODUKSI
XILOOLIGOSAKARIDA**

SKRIPSI

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

Oleh

**Riza Maulana Sari
NIM 131810301039**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. almarhumah nenek Holifah dan almarhum kakek Syafi'i yang sangat berkeinginan besar melihat saya menyelesaikan studi di Universitas Jember dan menghadiri acara wisuda di kemudian hari;
2. ayahanda Sunari, ibunda Zakiyatul Hikmah, ayah mertua Surlis, ibu mertua Lani, adik- adik tersayang Ridho Firmansyah dan Ahmad Sadid serta seluruh keluarga besarku yang telah menyayangiku sepenuh hati tanpa pamrih. Terimakasih atas motivasi dan dukungan baik moral dan materil yang selalu ikhlas diberikan;
3. orang teristimewa dalam hidup saya, suami tercinta Junaidi, yang selalu ada dalam suka dan duka serta turut memberikan dukungan baik moral maupun materil yang sangat mendorong saya untuk terus berusaha dalam menyelesaikan skripsi ini demi terwujudnya cita- cita untuk memperoleh gelar S.Si dari Universitas Jember;
4. guru – guru di TK Tarbiyatun Nafi'ah, MIMA 3 Miftahul Ulum Gumelar, MTs Wahid Hasyim Balung, SMA Unggulan Hafsa Zainul Hasan BPPT Genggong- Probolinggo, serta dosen-dosen di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember;
5. almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
6. sahabat sekaligus saudara baru, Mamluah Husnul A.Z, Lia Zakiatul Faidzah, Efa Uswatun K, terima kasih atas keceriaan dan kebersamaan selama ini;
7. teman- teman *XOS Squad*, Mbak Dewanti, Mbak Handa, Mbak Vike, Mbak Rere, Mbak Linda, Kak Shelly yang telah memberikan semangat dan do'a;
8. teman- teman kimia TITANIUM angkatan 2013, terimakasih atas semangat, bantuan, saran, perhatian, dan kenangan yang diberikan;
9. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

MOTO

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap
(Terjemahan Surat *Al-Insyirah* ayat 6-8) *)



UPT Perpustakaan Universitas Jember

*⁾ Departemen Agama RI. 2006. *Al Qur'an dan Terjemahnya*. Bandung: CV Penerbit Diponegoro.



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Riza Maulana Sari

NIM : 131810301039

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Kinetika dan Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase pada Proses Hidrolisis Xilan Kulit Kopi untuk Produksi Xilooligosakarida” adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun 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 di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 10 Juli 2018

Yang menyatakan,

Riza Maulana Sari

NIM 131810301039

SKRIPSI

**UJI KINETIKA DAN OPTIMASI KONSENTRASI ENZIM
ENDO- β -1,4-D-XILANASE PADA PROSES HIDROLISIS
XILAN KULIT KOPI UNTUK PRODUKSI
XILOOLIGOSAKARIDA**

Oleh

Riza Maulana Sari
NIM 131810301039

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Kinetika dan Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase pada Proses Hidrolisis Xilan Kulit Kopi untuk Produksi Xilooligosakarida” karya Riza Maulana Sari telah diuji dan disahkan pada:
hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

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

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

Anggota II,

Anggota III,

Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc.
NIP 198010012003122001

I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si.
NIP 197105011998021002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

Drs. Sujito, Ph.D.
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Uji Kinetika dan Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase pada Proses Hidrolisis Xilan Kulit Kopi untuk Produksi Xilooligosakarida; Riza Maulana Sari, 131810301039; 2018; 45 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Xilooligosakarida (XOS) merupakan oligomer gula hasil hidrolisis enzim xilanase dengan substrat xilan. Xilan dapat bersumber dari berbagai biomassa, salah satunya yaitu limbah kulit kopi. Limbah kulit kopi merupakan salah satu produk samping dari pengolahan kopi yang biasanya tidak dilakukan penanganan limbah secara benar sehingga cenderung mencemari lingkungan. Limbah kulit kopi merupakan limbah berlignoselulosa yang memiliki kandungan utama berupa lignin, selulosa dan hemiselulosa, sehingga limbah kulit kopi dapat dijadikan sebagai pengasil substrat xilan. Xilan yang dihasilkan selanjutnya dapat dihidrolisis secara enzimatik menggunakan enzim endo- β -1,4-D-xilanase menjadi xilooligosakarida. Reaksi enzimatik dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya yaitu konsentrasi enzim dan konsentrasi substrat yang digunakan pada saat reaksi hidrolisis enzimatik. Penelitian ini melakukan uji kinetika dan optimasi konsentrasi enzim endo- β -1,4-D-xilanase dan substrat kulit kopi yang digunakan, untuk mengetahui konsentrasi enzim dan konsentrasi substrat optimum sehingga produk hidrolisis xilan kulit kopi berupa xilooligosakarida yang dihasilkan optimum.

Optimasi konsentrasi enzim dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi enzim yaitu konsentrasi 0,004 U/mL sampai dengan 0,164 U/mL dengan rentang 0,020 U/mL. Hasil optimasi menunjukkan bahwa konsentrasi enzim endo- β -1,4-D-xilanase optimum yaitu sebesar 0,104 U/mL. Hasil optimasi konsentrasi enzim digunakan untuk optimasi konsentrasi substrat. Optimasi konsentrasi substrat dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi substrat yaitu konsentrasi 0,4% sampai dengan 1,2% dengan rentang 0,2%. Hasil optimasi konsentrasi enzim dan substrat dilihat menggunakan parameter total gula pereduksi. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kondisi

optimum enzim endo- β -1,4-D-xilanase yaitu pada konsentrasi enzim 0,104 U/mL dengan kadar total gula pereduksi sebesar 0,508 mg/mL dan konsentrasi substrat 0,8% dengan kadar total pereduksi sebesar 0,497 mg/mL.

Pengujian selanjutnya yang dilakukan yakni uji kinetika enzim. Uji kinetika enzim yang dilakukan menghasilkan beberapa parameter kinetika berupa nilai K_M , V_{Max} , dan k_{Cat} yang dapat memberikan informasi mengenai reaksi enzimatik dari enzim endo- β -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan kulit kopi. Uji kinetika enzim dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim endo- β -1,4-D-xilanase pada beberapa variasi konsentrasi substrat yaitu konsentrasi 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1,0% dan 1,2% dengan variasi waktu inkubasi selama 24 jam dengan rentang waktu 4 jam. Konsentrasi enzim yang digunakan yaitu konsentrasi enzim optimum yaitu sebesar 0,104 U/mL. Parameter nilai kinetika yang dihasilkan yaitu nilai K_M sebesar 0,004 mg/mL, nilai V_{Max} sebesar 0,009 mg/mL.jam, dan nilai k_{Cat} sebesar 0,087 per sekon.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Uji Kinetika dan Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase pada Proses Hidrolisis Xilan Kulit Kopi untuk Produksi Xilooligosakarida”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember.

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

1. Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si, selaku dosen pembimbing utama dan drh. Wuryanti Handayani, M.Si, selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan materil dalam penulisan skripsi ini;
2. Ika Oktavianawati S.Si., M.Sc, selaku dosen penguji I dan I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si, selaku dosen penguji II yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga guna menguji serta menyempurnakan skripsi ini;
3. Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing akademik dan Dwi Indarti S.Si., M.Si, selaku dosen pembimbing akademik pengganti yang telah membimbing penulis selama menempuh studi di Universitas Jember;
4. Prof. Bambang Sugiharto dan Prof. Tri Agus Siswoyo selaku pimpinan laboratorium *Centre for Development of Advance Sciences and Technology* (CDAST) terimakasih atas bantuan, semangat, dan telah menerima penulis untuk melaksanakan penelitian di CDAST Universitas Jember;
5. segenap dosen pengajar jurusan kimia FMIPA Universitas Jember.

Penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pembaca.

Jember, 10 Juli 2018

Penulis

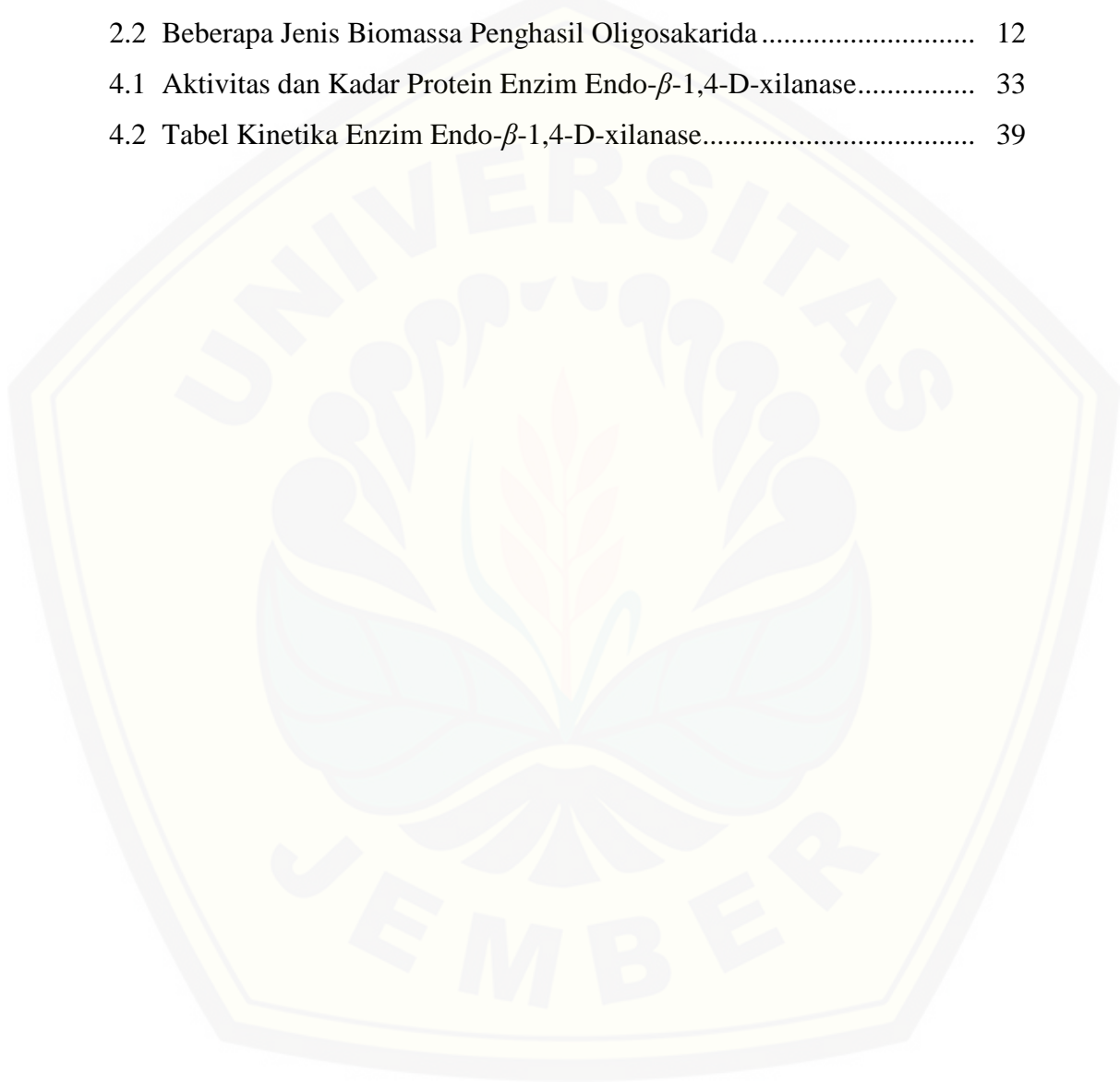
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Batasan Masalah	3
1.5 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Enzim	5
2.1.1 Definisi Enzim	5
2.1.2 Kinetika Enzim	5
2.2 Xilan	8
2.3 Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase	9
2.4 Xilooligosakarida (XOS)	11
2.5 Kulit Kopi	14
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	16
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	16
3.2 Alat dan Bahan	16
3.2.1 Alat	16
3.2.2 Bahan	16
3.3 Diagram Alir Penelitian	18
3.4 Prosedur Penelitian	19
3.4.1 Preparasi Media dan Reagen	19
3.4.2 Isolasi dan Pemurnian Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase..	21
3.4.3 Ekstraksi Xilan dari Limbah Kulit Kopi.....	25
3.4.4 Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase ..	25

3.4.5 Uji Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase terhadap Substrat Xilan Kulit Kopi	26
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAAN	28
4.1 Substrat Xilan Kulit Kopi	28
4.1.1 Kulit Kopi Terdelignifikasi	28
4.1.2 Ekstrak Kasar Xilan Kulit Kopi.....	29
4.2 Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase	30
4.2.1 Ekstrak Kasar Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase.....	30
4.2.2 Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase Murni	31
4.3 Konsentrasi Enzim Endo-β-1,4-D-xilanase dan Konsentrasi Substrat Xilan Kulit Kopi Optimum	34
4.3.1 Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-xilanase Optimum	34
4.3.2 Konsentrasi Substrat Xilan Kulit Kopi Optimum	36
4.4 Parameter Kinetika Enzim Endo-β-1,4-D-xilanase	37
BAB 5. PENUTUP	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Beberapa Mikroorganisme Penghasil Enzim Xilanase	10
2.2 Beberapa Jenis Biomassa Penghasil Oligosakarida	12
4.1 Aktivitas dan Kadar Protein Enzim Endo- β -1,4-D-xilanase.....	33
4.2 Tabel Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-xilanase.....	39



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap laju reaksi	7
2.2 Kurva <i>Lineweaver-Burk</i>	7
2.3 Struktur O-asetil-4-O-metilglukoronoxilan dari kayu keras atau <i>hard word</i>	9
2.4 Posisi penyerangan Endo- β -1,4-D-xilanase.....	11
2.5 Beberapa struktur xilooligosakarida dari material lignoselulosa.....	13
3.1 Diagram alir penelitian	18
4.1 Hasil peremajaan bakteri pada media LB padat	31
4.2 Kurva optimasi konsentrasi enzim endo- β -1,4-D-xilanase	35
4.3 Kurva optimasi konsentrasi substrat xilan kulit kopi	36
4.4 Kurva penentuan kinetika enzim	37
4.5 Kurva <i>Lineweaver- Burk</i>	38

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Kurva Standar	46
a. Kurva Standar Xilosa	46
b. Kurva Standar BSA	47
4.1 Produksi Substrat Xilan	48
a. Produksi Xilan Ulangan Pertama	48
b. Produksi Xilan Ulangan Kedua	48
c. Produksi Xilan Ulangan Ketiga	49
4.2 Penentuan Karakteristik Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase	50
a. Rumus Aktivitas Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase	50
b. Hasil Penentuan Aktivitas Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase	50
c. Rumus Kadar Protein Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase	51
d. Rumus Aktivitas Spesifik Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase	51
e. Hasil Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase.....	51
4.3 Optimasi Konsentrasi Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase dan Konsentrasi Substrat Xilan Kulit Kopi	52
a. Rumus Perhitungan Kadar Gula Pereduksi.....	52
b. Rumus Perhitungan Total Gula Pereduksi.....	52
c. Hasil Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase	53
d. Kurva Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase	54
e. Hasil Optimasi Konsentrasi Substrat Xilan Kulit Kopi	54
f. Kurva Optimasi Konsentrasi Substrat Xilan Kulit Kopi.....	55

4.4 Kinetika Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase terhadap Substrat Xilan Kulit Kopi ..	56
a. Tabel Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase terhadap Substrat Xilan Kulit Kopi	56
b. Kurva Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase terhadap Substrat Xilan Kulit Kopi	57
c. Plot <i>Lineweaver- Burk</i>	57
d. Nilai V_{Max}	58
e. Nilai K_M	58
f. Nilai K_{Cat}	59
4.5 Dokumentasi Penelitian	60

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Xilan merupakan salah satu penyusun hemiselulosa yang termasuk dalam jenis polisakarida yang terdapat pada dinding sel tanaman. Xilan berada diantara lignin dan kumpulan serat selulosa. Kandungan xilan dapat mencapai jumlah yang cukup besar yaitu sekitar 30%- 35% dari total berat kering (Beg *et al*, 2001). Xilan akan menghasilkan gula sederhana berupa xilooligosakarida, xilobiosa dan xilosa apabila dihidrolisis dengan enzim xilanase. Enzim xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan memecah xilan menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan memutus ikatan glikosidik pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Enzim endo- β -1,4-D-xilanase merupakan salah satu golongan enzim xilanolitik yang mampu menghidrolisis xilan menjadi rantai xilooligomer berupa xilooligosakarida.

Xilooligosakarida (XOS) merupakan oligomer gula yang terdiri dari unit xilosa yang biasanya terdapat pada buah- buahan, sayuran, susu, madu dan sebagainya. Xilooligosakarida terdiri dari xilobiosa, xilotriosa dan sebagainya. Xilooligosakarida dapat merangsang pertumbuhan dan aktivitas satu atau sejumlah bakteri pada kolon, bermanfaat bagi kesehatan dan dapat digunakan sebagai prebiotik, sehingga dapat ditambahkan sebagai komposisi pada bahan pangan (Akpinar, 2009).

Indonesia merupakan produsen kopi terbesar ketiga didunia setelah Brazil dan Vietnam, selain itu Indonesia merupakan pengekspor kopi terbesar keempat di dunia dengan pangsa pasar sebesar 11% (Raharjo, 2013). Pengolahan kopi akan menghasilkan hasil samping atau limbah berupa kulit kopi. Kulit kopi merupakan limbah hasil pengolahan kopi yang biasanya dibuang begitu saja ke lingkungan sehingga sangat berpotensi mencemari lingkungan apabila tidak ditangani dengan benar. Kulit kopi merupakan salah satu jenis lignoselulosa yaitu limbah biomassa tanaman yang tersusun atas selulosa, hemiselulosa dan lignin, oleh karena itu kulit kopi dapat dijadikan substrat xilan untuk produksi xilooligosakarida karena kulit kopi mengandung hemiselulosa.

Penelitian yang telah dilakukan yaitu tentang isolasi xilooligosakarida dari substrat xilan asal limbah kulit kopi menjelaskan bahwa hasil maksimal yang diperoleh pada penelitian tersebut yaitu pada waktu inkubasi selama 24 jam (Masruroh, 2016). Hal ini dapat dilihat bahwa waktu inkubasi berpengaruh pada kerja enzim, selain itu faktor lain yang mempengaruhi kerja enzim yaitu konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim yang digunakan pada saat reaksi hidrolisis enzimatis.

Konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim pada reaksi enzimatis dapat mempengaruhi laju reaksi. Substrat akan berikatan dengan enzim membentuk kompleks enzim-substrat. Penambahan konsentrasi substrat akan menyebabkan peningkatan kecepatan reaksi katalis akibat tersedianya molekul enzim yang berikatan dengan substrat. Kecepatan katalis akan terus bertambah, hingga mencapai suatu titik maksimum yaitu titik pada saat penambahan konsentrasi substrat dan enzim tidak dapat lagi menambah laju reaksi. Kondisi ini dinamakan kondisi optimum.

Berdasarkan uraian diatas, dalam penelitian ini akan dilakukan optimasi konsentrasi substrat kulit kopi dan enzim endo- β -1,4-D-xilanase yang digunakan, sehingga xilooligosakarida yang dihasilkan akan memiliki kadar optimal. Uji kinetika enzim xilanase juga akan dilakukan pada penelitian ini dilakukan dengan asas keseimbangan menurut Michaelis- Menten. Uji kinetika enzim yang dilakukan akan menghasilkan beberapa parameter kinetika berupa nilai K_M , V_{Max} , dan k_{Cat} yang dapat memberikan informasi mengenai reaksi enzimatis dari enzim endo- β -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan kulit kopi.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Berapakah konsentrasi enzim endo- β -1,4-D-xilanase yang dapat menghasilkan konsentrasi produk xilooligosakarida tertinggi pada proses hidrolisis enzimatis?

2. Berapakah konsentrasi substrat xilan kulit kopi yang dapat menghasilkan konsentrasi produk xilooligosakarida tertinggi pada proses hidrolisis enzimatis?
3. Berapakah nilai K_M , V_{Max} dan k_{Cat} dari enzim endo- β -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan kulit kopi?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bubuk kulit kopi yang digunakan pada penelitian ini adalah bubuk kulit kopi Robusta yang digunakan pada penelitian sebelumnya dari limbah penggilingan kopi di Kecamatan Silo, Kabupaten Jember.
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 enzimatis yang digunakan yaitu pada waktu inkubasi 24 jam, pH 5 dan suhu 40°C.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui konsentrasi enzim endo- β -1,4-D-xilanase yang dapat menghasilkan konsentrasi produk xilooligosakarida tertinggi pada proses hidrolisis enzimatis.
2. Mengetahui konsentrasi substrat xilan kulit kopi yang dapat menghasilkan konsentrasi produk xilooligosakarida tertinggi pada proses hidrolisis enzimatis.
3. Mengetahui beberapa parameter kinetika berupa nilai K_M , V_{Max} , dan k_{Cat} dari enzim endo- β -1,4-D-xilanase dengan substrat xilan kulit kopi.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Memberikan nilai guna pada kulit kopi yang biasanya hanya dijadikan limbah menjadi penghasil xilan.

2. Memberikan informasi kepada masyarakat bahwa xilan kulit kopi dapat digunakan untuk produksi xilooligosakarida yang berpotensi sebagai prebiotik.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

2.1.1 Definisi Enzim

Enzim berasal dari bahasa Yunani yang terdiri dari dua kata yaitu “*en*” yang artinya di dalam dan “*zyme*” yang artinya ragi. Enzim adalah salah satu senyawa organik yang tersusun atas protein, dihasilkan oleh sel serta berperan sebagai biokatalisator dalam reaksi kimia di dalam tubuh makhluk hidup, baik manusia, hewan dan tumbuhan. Enzim adalah biokatalisator organik yang dihasilkan organisme hidup di dalam protoplasma. Enzim berfungsi sebagai senyawa yang mempercepat proses reaksi kira-kira sampai dengan $10^8 - 10^{11}$ kali lebih cepat namun tidak habis bereaksi. Enzim berfungsi menurunkan energi aktivasi pada suatu reaksi. Energi aktivasi yaitu energi minimum yang harus ada pada sistem kimia untuk melangsungkan reaksi kimia. Enzim terdiri atas protein atau suatu senyawa yang berikatan dengan protein, hampir semua enzim merupakan protein. Pemakaian enzim memiliki banyak keunggulan seperti menghemat energi, mengurangi kebutuhan bahan kimia dan masih banyak keunggulan lain yang dimiliki enzim (Lehninger, 1982).

2.1.2 Kinetika enzim

Kinetika reaksi berhubungan dengan laju reaksi. Kinetika reaksi enzimatis dapat diukur dengan cara menghitung jumlah substrat yang diubah atau produk yang dihasilkan per satuan waktu. Reaksi enzimatis berlangsung melalui pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Faktor-faktor yang mempengaruhi laju reaksi enzimatis antara lain yaitu:

a. Konsentrasi enzim

Pengaruh konsentrasi enzim terhadap laju reaksi yaitu linier. Konsentrasi enzim yang semakin tinggi akan menyebabkan laju atau kecepatan reaksi akan meningkat hingga batas konsentrasi tertentu, namun hasil hidrolisis substrat akan konstan dengan naiknya konsentrasi enzim yang disebabkan penambahan enzim sudah tidak efektif lagi (Reed, 1975).

b. Temperatur atau suhu

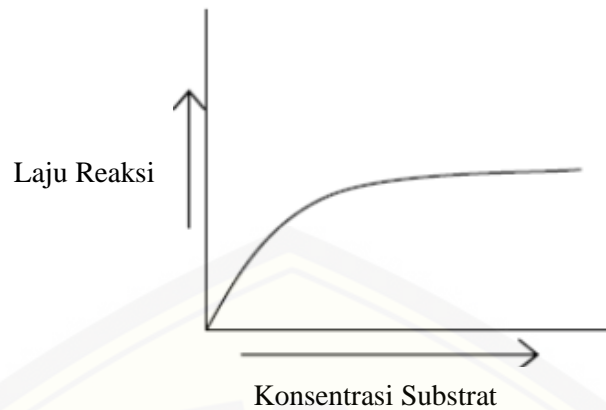
Enzim sangat sensitif terhadap perubahan suhu. Kecepatan reaksi yang dikatalis oleh enzim akan mengalami kenaikan apabila suhu naik pada batas-batas suhu tertentu. Peningkatan suhu akan mempercepat laju reaksi karena molekul substrat dan enzim akan lebih sering bertumbukan sehingga terbentuknya produk akan semakin cepat pula. Kecepatan reaksi paling tinggi terjadi pada suhu optimum. Suhu yang terlalu tinggi akan mengakibatkan enzim mengalami denaturasi (Poedjiadi, 1994). Enzim akan mengalami inaktif (tidak aktif) pada suhu sebesar 0°C dan kembali aktif pada suhu normal (Lay and Sugyo, 1992).

c. Derajat keasaman atau pH

Enzim umumnya bersifat amfolitik, yaitu suatu keadaan dimana enzim memiliki konstanta disosiasi pada gugus basa dan gugus asamnya. Lingkungan enzim sangat erat hubungannya dengan aktivitas enzim. Aktivitas enzim akan terganggu apabila enzim berada pada lingkungan pH yang tidak sesuai, hal tersebut dikarenakan lingkungan pH dapat menyebabkan perubahan-perubahan ionisasi pada enzim. Nilai pH larutan harus benar-benar diperhatikan agar aktivitas atau kerja enzim benar-benar maksimal dalam mengkatalis suatu reaksi enzimatik (Nelson *et al*, 2008).

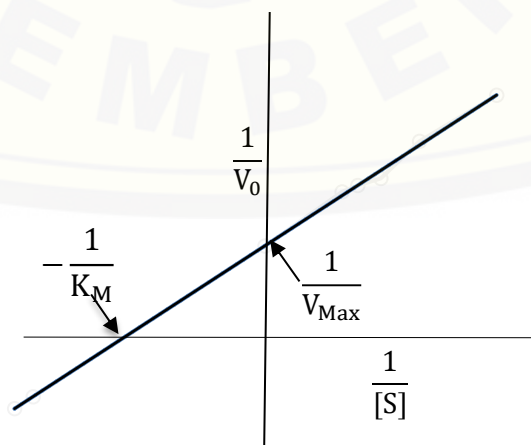
d. Konsentrasi substrat

Konsentrasi substrat umumnya mempengaruhi suatu kecepatan enzimatik. Peningkatan laju reaksi berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi substrat, dimana konsentrasi substrat yang semakin meningkat akan menyebabkan laju reaksi semakin meningkat pula, sebaliknya konsentrasi substrat yang semakin menurun akan menyebabkan menurunnya laju reaksi. Laju reaksi dari suatu reaksi enzimatik akan meningkat seiring dengan penambahan substrat, akan tetapi pada keadaan tertentu laju reaksi akan mencapai nilai maksimum (V_{Maks}) apabila semua enzim dalam keadaan enzim-substrat (ES) atau dengan kata lain, sistem jenuh oleh substrat sehingga penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit mempengaruhi laju reaksi (Lehninger, 1982).



Gambar 2.1 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap laju reaksi (Poedjiadji, 1994).

Kinetika enzim juga mempelajari bagaimana enzim mengikat substrat dengan mengubahnya menjadi produk. Ukuran afinitas enzim-substrat (ES) merupakan suatu ukuran atau indikator kekuatan ikatan kompleks enzim-substrat (ES) yang dapat diketahui dengan mencari nilai K_M atau konstanta Michaelis-Menten. Nilai K_M diketahui apabila kecepatan reaksi suatu enzim telah mencapai setengah dari nilai maksimum (V_{Max})nya. Persamaan Michaelis-Menten yaitu suatu hubungan kuantitatif antara konsentrasi substrat dan laju aktivitas enzim yang dapat digambarkan apabila V_{Max} dan K_M diketahui. Persamaan tersebut cukup rumit, hal tersebut dikarenakan harga V_{Max} dan K_M sangat sulit dicari secara langsung. Persamaan Michaelis-Menten harus ditransformasikan melalui metode kurva *Lineweaver-Burk* yang merupakan bentuk sederhana dari persamaan Michaelis-Menten (Murray, 2003).



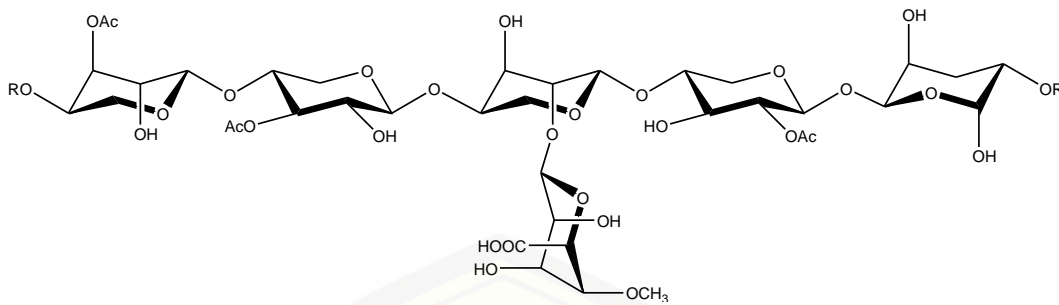
Gambar 2.2 Kurva *Lineweaver-Burk*

2.2 Xilan

Biomassa lignoselulosa merupakan bahan organik yang paling melimpah di alam dengan perkiraan produksi sekitar 10-50 miliar ton kering per tahunnya di seluruh dunia, termasuk residu pertanian (seperti: bonggol jagung, jerami tanaman, ampas tebu), residu kehutanan (seperti *switchgrass*), tanaman berkayu (kayu keras dan kayu lunak), limbah dari produksi kertas dan limbah rumah tangga. Lignoselulosa terdiri dari tiga komponen utama yaitu hemiselulosa (20-35%), selulosa (35-50%) dan lignin (10-25%). Struktur lignoselulosa amat kompleks sehingga perlu dipecah terlebih dahulu agar lebih mudah diserang enzim selama proses hidrolisis, hal ini dikarenakan material lignoselulosa tersusun atas matrix selulosa dan lignin yang berikatan melalui rantai hemiselulosa (Sjostrom, 1998).

Hemiselulosa merupakan kelompok polisakarida heterogen atau kelompok heteropolisakarida yang dibentuk melalui jalan biosintesis yang berbeda dengan selulosa. Hemiselulosa sangat mudah dihidrolisis menjadi monomer- monomernya, antara lain yaitu D- manosa, D- galaktosa, D- xilosa, D- glukosa, L- arabinosa dan sejumlah kecil L- ramnosa. Hemiselulosa banyak terdapat pada kayu lunak dan kayu keras. Jenis komponen penyusun utama yang paling umum dari polimer hemiselulosa adalah xilan (Shallom *and* Shoham, 2003).

Xilan merupakan komponen paling melimpah dalam hemiselulosa tanaman yang terikat pada pektin, lignin, selulosa dan polisakarida lainnya untuk membentuk sel tanaman. Xilan adalah heteropolisakarida dengan rantai samping yang dibentuk oleh subunit homopolimer xilosa. Xilan merupakan polimer dari xilosa yang berikatan β -1,4-gliosidik dengan jumlah unit monomer sebanyak 150 sampai dengan 200 unit. Jenis cabang yang terikat pada rantai utama xilan tergantung pada sumber xilan yaitu dapat berupa α -L-arabinofuranosil, glukuronosil, asetil, feruloil, 4-O-metil-D-glukuronopiranosil dan residu *p*-kumaroil. Berikut merupakan salah satu struktur xilan dari kayu keras yaitu:



Gambar 2.3 Struktur O-asetil-4-O-metilglukoronoxilan dari kayu keras atau *hard wood* (Buruiana and Vizireanu, 2014)

Xilan merupakan komponen struktural penting dari biomassa tanaman yang tersisa pada limbah pertanian. Xilan dapat bersumber dari berbagai biomassa, salah satunya yaitu terkandung dalam kayu lunak (*soft wood*) dan kayu keras (*hard wood*). Kandungan xilan dalam kayu keras (*hard wood*) yaitu sekitar 20-25% sedangkan kandungan xilan dalam kayu lunak (*soft wood*) yaitu sekitar 7-12%. Selain itu, xilan juga tidak hanya terkandung dalam jenis kayu-kayuan tetapi juga di berbagai tanaman lain seperti rumput, sereal, dan rempah-rempah, dimana kandungan xilan dalam berbagai jenis tanaman tersebut yaitu berkisar antara 5-35% bobot kering (Kumar *et al*, 2012).

2.3 Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

Enzim merupakan molekul biopolimer yang memegang peranan penting dalam berbagai reaksi kimia di dalam sel, salah satunya yaitu enzim xilanase. Enzim xilanase merupakan biokatalis yang berperan dalam proses hidrolisis xilan menjadi gula pereduksi. Enzim xilanase merupakan salah satu jenis enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis komponen utama hemiselulosa berupa polisakarida β -1,4-xilan menjadi xilooligosakarida dan xilosa. Jamur dan bakteri merupakan jenis mikroorganisme yang sudah umum menghasilkan enzim xilanase, dimana terdapat beberapa jenis bakteri dan jamur yang diketahui dapat menghasilkan enzim xilanase secara ekstraseluler. Berdasarkan sifat fisika dan kimianya (titik isoelektrik dan massa molekul relatif), enzim xilanase yang berasal dari mikroorganisme telah diklasifikasikan ke dalam dua famili utama yaitu famili

GH10 atau famili F dan famili GH11 atau famili G. Berikut beberapa jenis enzim xilanase yang dihasilkan oleh beberapa jenis mikroorganisme antara lain yaitu:

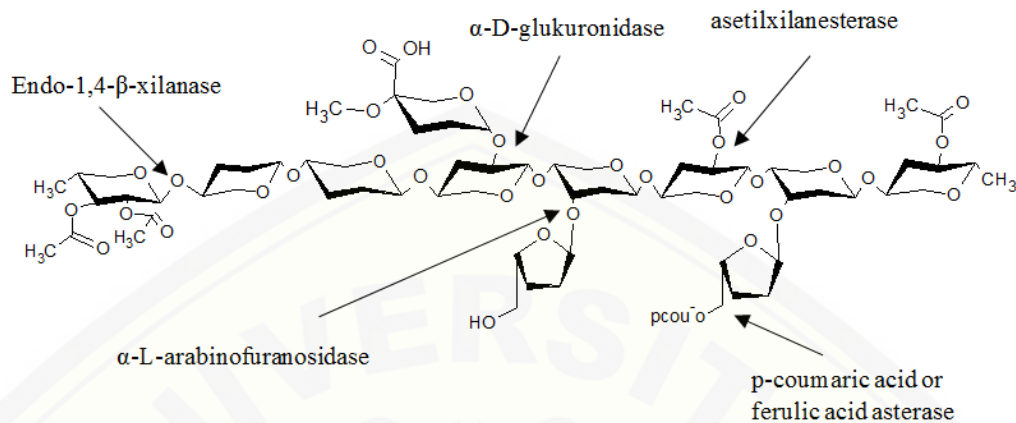
Tabel 2.1 Beberapa Mikroorganisme Penghasil Enzim Xilanase

Mikroorganisme	Kondisi		Karakteristik Enzim
	Fermentasi		
	Suhu Tumbuh (°C)	Suhu Optimum (°C)	pH
<i>Aspergillus sp</i>	24- 30	45- 60	4,5 -6,0
<i>Bipolaris sorokinana</i>	28	70	5,5
<i>Fusarium oxysporium</i>	20	55	4,5
<i>Criptococcus flavus</i>	26	50	5,0
<i>Gloephyllum trabeum</i>	22	80	4,0
<i>Humicola grisea</i>	40	70	5,5
<i>Trichoderma sp</i>	25- 30	50- 60	3,5- 6,5

(Sunna and antranikian, 1997).

Enzim xilanase dapat dibedakan menjadi beberapa bagian berdasarkan substrat yang dihidrolisis antara lain yaitu enzim β -1,4-D-xilosidase, endo- β -1,4-D-xilanase, eksoxilanase, α - L- arabinofuranosidase, α - glukoronidase, asetil-xilan esterase dan asam fenolat esterase. Enzim β -1,4-D-xilosidase (EC 3.2.1.37) merupakan enzim xilanase yang dapat menghidrolisis xilooligosakarida dan xilobiosa rantai pendek menjadi produk hidrolisis berupa xilosa yang juga berperan sebagai inhibitor bagi enzim β -1,4-D-xilosidase sedangkan enzim endo- β -1,4-D-xilanase (E.C 3.2.1.8) merupakan enzim xilanase yang mampu memutus ikatan pada rantai utama xilan dan akan membentuk produk hidrolisis berupa molekul oligosakarida. Enzim endo- β -1,4-D-xilanase juga memegang peranan penting dalam mendegradasi polimer xilan yang banyak ditemukan pada dinding sel tanaman berkayu. Enzim endo- β -1,4-D-xilanase mampu memutus ikatan β -1,4 pada bagian dalam xilan secara teratur. Pemutusan ikatan β -1,4 pada xilan tidak dilakukan secara acak, melainkan ditentukan berdasarkan derajat percabangan, panjang rantai substrat, ada atau tidak adanya gugus substitusi dan pola pemutusan

dari enzim hidrolase. Posisi penyerangan enzim endo- β -1,4-D-xilanase terhadap substrat xilan ditunjukkan oleh gambar dibawah ini:



Gambar 2.4 Posisi Penyerangan Endo- β -1,4-D-xilanase (Sunna *and* antranikian, 1997)

Produk utama yang dihasilkan selama awal hidrolisis xilan yaitu berupa xilooligosakarida yang selanjutnya akan dihidrolisis lebih lanjut menjadi beberapa produk hidrolisis berupa xilotriosa, xilobiosa dan xilosa. Enzim endoxilanase banyak dihasilkan oleh mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. Enzim endoxilanase kebanyakan bekerja optimal pada suhu berkisar antara 45-75°C dan hanya sejumlah kecil bakteri dan jamur yang dimurnikan yang menunjukkan aktivitas maksimal pada suhu di atas 80°C salah satunya yaitu endoxilanase yang dimurnikan dari berbagai spesies yang termasuk kedalam genus *Thermotoga* yang bekerja secara optimal pada suhu 80 dan 105°C selain itu, berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Ratnadewi *et al* (2007) menyatakan bahwa enzim endo- β -1,4-D-xilanase dapat diisolasi dari bakteri sistem intestinal rayap yang bekerja optimum pada suhu 40°C dan pH 5,0 dengan aktivitas spesifik mencapai 0,65 Unit.mg⁻¹ (Sunna *and* antranikian, 1997).

2.4 Xilooligosakarida (XOS)

Oligosakarida merupakan kelompok karbohidrat penting yang ditemukan baik dalam bentuk bebas atau bentuk gabungan pada semua organisme hidup. Menurut nomenklatur IUB-IUPAC, oligosakarida dapat didefinisikan sebagai oligomer yang terdiri dari 2-10 residu monosakarida yang dihubungkan oleh ikatan

glikosidik dan mudah dihidrolisis oleh enzim atau asam. Oligosakarida dapat ditemukan secara alami dalam buah-buahan, sayuran, susu dan madu. Oligosakarida dapat digunakan sebagai bahan makanan fungsional yang memiliki potensi besar dalam meningkatkan kualitas berbagai jenis makanan. Berikut berbagai jenis oligosakarida yang dihasilkan dari berbagai biomassa yaitu:

Tabel 2.2 Beberapa Jenis Biomassa Penghasil Oligosakarida

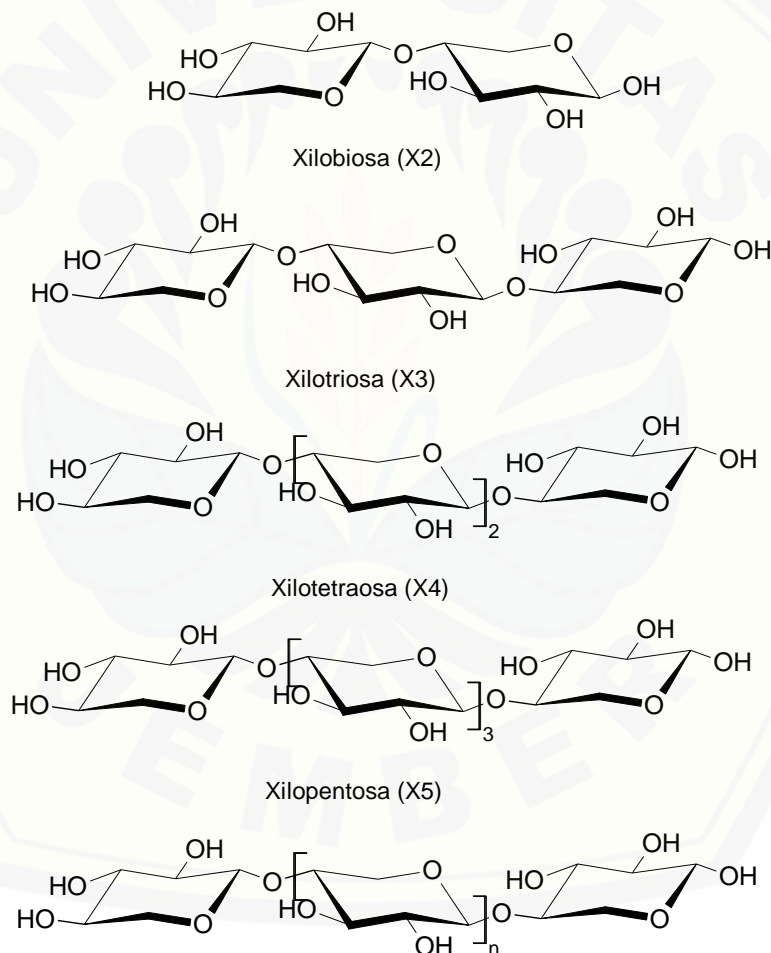
Tipe Oligosakarida	Sumber	Metode Produksi
Laktulosa	Susu sapi	Isomerisasi laktosa
Laktosukrosa, Glikosukrosa	<i>Beet</i>	Ekstraksi dan transglikosilasi sukrosa
Xilooligosakarida	Kacang kedelai	Hidrolisis poli-xilan
Rafinosa, <i>Stacchyose</i>	<i>Beet</i> , Kacang kedelai	Sintesis pati
Fruktooligosakarida	Buah- buahan, Sayur- sayuran	Sintesis dan ekstraksi sakarosa
Galaktooligosakarida	ASI, Susu sapi	Sintesis enzimatis laktosa

(Kumar *et al*, 2012).

Xilooligosakarida (XOS) merupakan oligomer gula yang dihasilkan selama hidrolisis hemiselulosa yang kaya xilan dan terdiri dari unit xilosa yang terdapat secara alami dalam buah-buahan, sayuran, susu dan madu. XOS memiliki struktur bercabang yang mengandung 2-7 unit xilosa (seperti xilobiosa, xilotriosa dan sebagainya) dihubungkan oleh ikatan β -(1→4) dengan berbagai substituen seperti kelompok asetil, asam uronat dan arabinosa unit. Produksi xilooligosakarida dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu isolasi xilan melalui fraksinasi kimia dan hidrolisis enzimatik, hidrolisis enzimatik langsung dari bahan yang kaya xilan dan autohidrolisis (Caparros *et al*, 2007).

Xilooligosakarida memiliki beberapa sifat fisika- kimia yaitu memiliki tingkat kemanisan dan kepahitan tertentu, higroskopis, dapat berperan sebagai agen penguat untuk minuman, agen menstabilkan zat aktif dan sebagainya. Xilooligosakarida juga stabil dalam berbagai pH dan suhu dan memiliki karakteristik organoleptik yang cocok untuk dimasukkan sebagai bahan tambahan dalam makanan. Kestabilan xilooligosakarida dari satu sumber dengan sumber

yang lain dapat berbeda jauh tergantung pada jenis oligosakarida dan residu gula, keterkaitan, bentuk cincin dan konfigurasi anomernya. Oligosakarida umumnya mudah dihidrolisis sehingga mengakibatkan hilangnya nutrisi dan sifat fisikokimianya pada pH <4,0 dan saat diperlakukan pada suhu tinggi pada jangka waktu yang singkat, atau ketika mengalami penyimpanan lama di bawah kondisi ruangan. Namun demikian, Xilooligosakarida stabil dalam berbagai pH (2.5- 8,0) dan juga stabil pada suhu hingga 100°C, oleh karena itu xilooligosakarida dapat dikatakan lebih menguntungkan dibandingkan jenis oligosakarida lainnya seperti fruktooligosakarida dan inulin (Carvalho *et al*, 2013).



Gambar 2.5 Beberapa struktur xilooligosakarida (XOS) dari material lignoselulosa (Carvalho *et al*, 2013).

Permintaan makanan fungsional dan potensi untuk pengembangan produk menjanjikan pasar untuk xilooligosakarida pada berbagai bidang industri, termasuk

makanan, pakan, pertanian dan industri farmasi. Penggunaan utama xilooligosakarida umumnya digunakan dalam berbagai jenis makanan dan minuman seperti kopi, kakao, teh, soda, minuman kesehatan dan minuman beralkohol dan produk susu (susu bubuk, es krim dan susu fermentasi) serta sebagai pakan untuk hewan peliharaan seperti ikan, sedangkan pada industri farmasi, xilooligosakarida efektif untuk mengurangi sembelit parah pada wanita hamil tanpa efek samping. Xilooligosakarida memiliki aktivitas imunomodulator, aktivitas anti-kanker, aktivitas anti-mikroba, regulator aktivitas pertumbuhan dan aktivitas-aktivitas biologis lainnya seperti antioksidan, anti-alergi, anti-inflamasi dan lainnya (Kumar *et al*, 2012).

2.5 Kulit Kopi

Kopi merupakan salah satu jenis minuman yang telah dikonsumsi selama lebih dari 1.000 tahun dan paling banyak dikonsumsi di dunia (lebih dari 400 miliar cangkir per tahun). Saudi Arabia bertanggung jawab dalam penyebaran budaya kopi, hal tersebut berdasarkan keterangan dari kebanyakan naskah kuno yang menyebutkan bahwa terdapat budaya tanggal kopi (*coffee date*) mulai tahun 575 M di Yaman, namun pembuatan minuman kopi dari kopi panggang seperti yang kita kenal sekarang baru terjadi pada abad XVI di Persia (Neves, 1974).

Indonesia sendiri telah mampu memproduksi lebih dari 400 ribu ton kopi per tahunnya, selain itu Indonesia juga pernah menjadi negara pengekspor kopi nomor 3 terbesar di dunia setelah Brazil dan Columbia pada era tahun 1990-an. Permintaan konsumen terhadap kopi yang semakin meningkat menyebabkan kopi menjadi komoditas yang diperdagangkan terbesar kedua setelah minyak bumi. Pengolahan kopi juga menghasilkan produk samping. Produk samping kopi banyak yang tidak dimanfaatkan seperti *coffee spent grounds* (CSG) atau ampas kopi dan *coffee silver skin* (CS) atau kulit kopi. Ampas kopi merupakan produk samping dari bubuk kopi yang telah diseduh yang memiliki ukuran sangat halus dengan kelembaban tinggi serta mengandung banyak senyawa organik, sementara kulit kopi merupakan residu yang larut dalam serat makanan dengan konsentrasi tinggi. Komposisi kimia dari kedua produk samping kopi tersebut menurut Borrelli *et al*

(2004), antara lain yaitu selulosa, hemiselulosa, protein, lemak, polifenol, mineral dan produk lain yang dihasilkan melalui reaksi Maillard selama proses pemanggangan biji kopi, seperti melanoidins (Borrelli *et al*, 2004).

Pengolahan kopi dapat dilakukan dengan metode basah dan metode kering, dimana kedua metode tersebut akan menghasilkan limbah padat berupa limbah kulit kopi berupa campuran bagian kulit luar, daging kulit dan kulit tanduk. Ketiga limbah kopi merupakan limbah berlignoselulosa yang mengandung utama yaitu lignin, selulosa dan hemiselulosa. Berikut komposisi komponen kimia dalam limbah kulit kopi yaitu:

- a. Kulit luar yang dihasilkan pada proses punggupasan kulit buah (*pulping*) mengandung selulosa, hemiselulosa dan lignin berturut-turut sebesar 17,8%, 13,1%, dan 1%.
- b. Kandungan lignin, selulosa dan hemiselulosa pada daging kulit kopi berturut-turut adalah sebesar 17,5%, 63% dan 2,3%.
- c. Kulit tanduk yang dihasilkan pada saat penggerbusan (*hulling*) mengandung selulosa, hemiselulosa dan lignin berturut-turut sebesar 43%, 7%, dan 9%.

(Murthy *and* Naidu, 2010).

Menurut Napitulu *et al* (2010), produksi perkebunan kopi selama lima tahun terakhir mengalami kenaikan pertumbuhan sekitar 6%, pada tahun 2008 dan diperkirakan mencapai 683 ribu ton. Berdasarkan hasil produksi kopi tahunan Indonesia tersebut, dapat diestimasikan bahwa dari 683 ribu ton yang dihasilkan per tahun juga dihasilkan limbah kulit kopi sebesar 310 ribu ton. Limbah yang dihasilkan dari proses pengolahan kopi tersebut umumnya tidak dilakukan penanganan limbah secara benar sehingga mencemari lingkungan. Kulit buah (*pulp*) kopi umumnya ditumpuk di sekitar lokasi pengolahan selama beberapa bulan, hal tersebut akhirnya menyebabkan perubahan sifat dari limbah kopi tersebut, sehingga menyebabkan timbulnya bau busuk dan cairan yang mencemari lingkungan seperti air sungai dan jika ditinjau dari segi estetika kurang menguntungkan (Pujiyanto, 2007).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2017 sampai dengan Februari 2018 di CDAST (*Center of Development for Advance Science and Technology*) Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu erlenmeyer, cawan petri, gelas beaker, labu ukur, gelas ukur, pipet tetes, pipet volume, pipet Mohr, corong gelas, kawat ose, mikropipet, eppendorf, tip, mortar, alu, botol semprot, spatula, kertas label, masker, tisu, sarung tangan, autoklaf (TOMY ES-315), LAF (*Laminar Air Flow*), lemari asam (*Javva Fumehood* FH180), spektrofotometer UV-Vis (*Hitachi* U-2900), pH meter, *water bath*, lemari pendingin, sentrifugator dan *shaker incubator*.

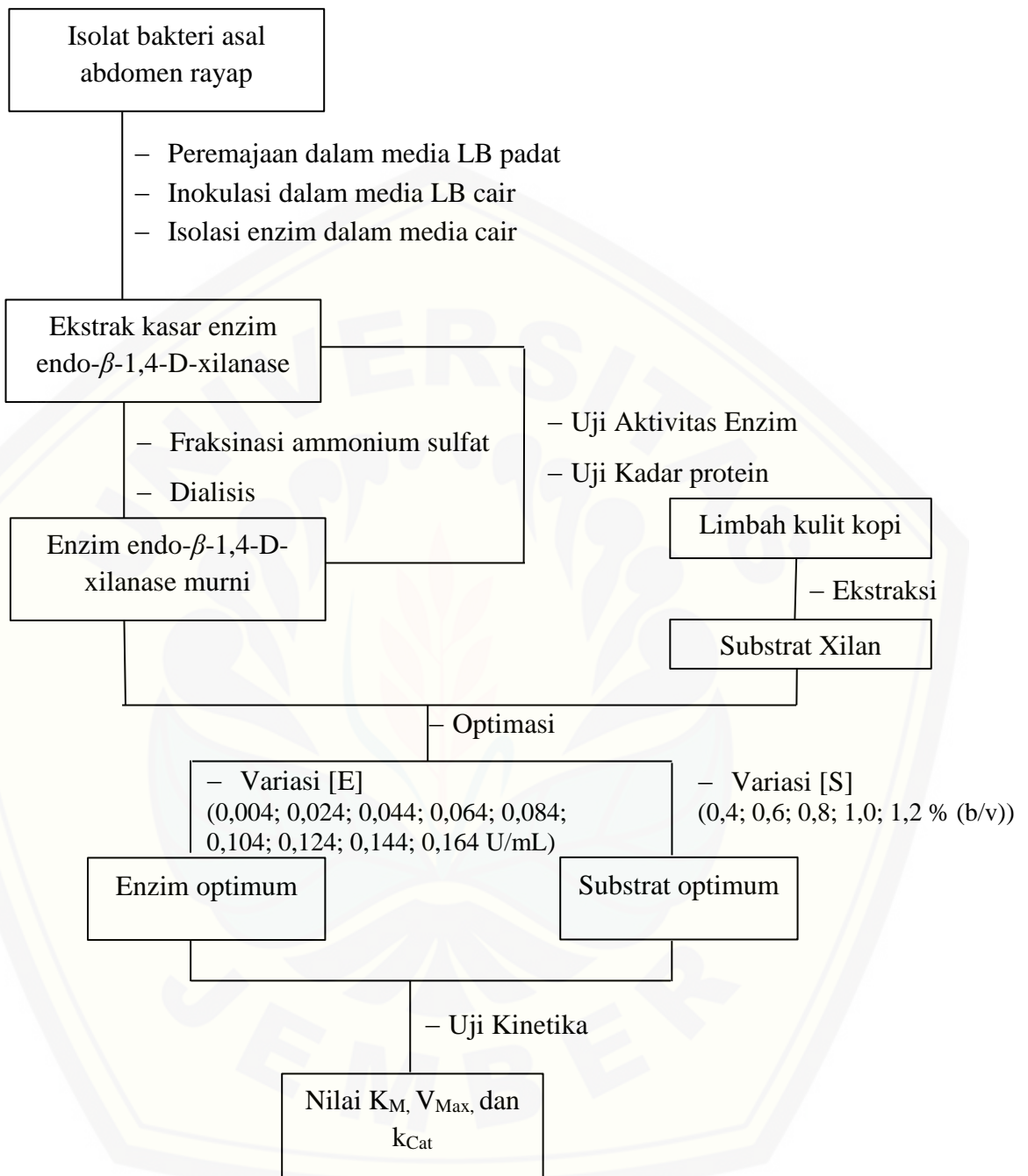
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Limbah kulit kopi, ragi, akuades, kasa, kapas, *xylan oat*, kertas *Whatman*, CBB (*Coomassie Brilliant Blue*), larutan xilosa, es, larutan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*), reagen Bradford, isolat bakteri, reagen Miller, triptofan (Oxoid), *bacto* agar (Oxoid), NaCl (E-Merck, Mr: 58,44 g/mol, ρ : 2,16 g/ml), NaOH (E-Merck, Mr: 39,99 g/mol, ρ : 2,10 g/mL), natrium pottasium tartrat (E-Merck, Mr: 282,1 g/mol, ρ : 0,63 g/mL), asam 3,5-dinitrosalisilat (E-Merck, Mr: 228,12 g/mol), natrium sulfit (E-Merck, Mr: 126,04 g/mol, ρ : 1,56 g/mL), fenol (E-Merck, Mr: 94,11 g/mol, ρ : 1,07 g/mL), etanol (E-Merck, Mr: 46,07 g/mol, ρ : 0,789 g/mL), asam fosfat 85% (E-Merck, Mr: 97,99 g/mol, ρ : 1,685 g/mL), asam sitrat (E-Merck, Mr: 210,14 g/mol, ρ : 1,50 g/mL), dinatrium hidrogen fosfat dihidrat (E-Merck, Mr: 177,96 g/mol, ρ : 1,70 g/mL), ammonium sulfat (E-Merck, Mr: 132,14 gr/mol, ρ : 1,769 g/mL), NaOCl (E-Merck,

Mr: 74,44 g/mol, ρ : 1,11 g/mL), dan HCl (E-Merck, Mr: 36,46 g/mol, ρ : 1,477 g/mL).



3.3 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Media dan Reagen

a. Pembuatan Media Luria Bertani (LB) Padat

Media Luria Bertani (LB) padat dibuat dengan mencampurkan 1,0% (b/v) triptofan, 1,0% (b/v) NaCl, 0,5% (b/v) ragi dan 1,0% (b/v) *bacto* agar ke dalam sebuah erlenmeyer 100 mL. Erlenmeyer yang telah berisi campuran tersebut ditambahkan akuades sebanyak 100 mL, kemudian erlenmeyer ditutup dengan kasa dan kapas. Media campuran dalam erlenmeyer tersebut kemudian dipanaskan dalam *autoclave* selama 15 menit dan dibiarkan sampai dengan larutan didalamnya menjadi hangat. Media kemudian dituangkan ke dalam cawan petri yang dilakukan di dalam laminar dengan tujuan agar tidak terjadi kontaminasi dengan bahan lain dan steril. Media yang berada di dalam cawan petri selanjutnya ditunggu sampai padat dan kemudian disimpan di dalam lemari pendingin.

b. Pembuatan Media Inokulum Cair

Media inokulum cair dibuat dengan mencampurkan 0,5% (b/v) triptofan, 0,5% (b/v) NaCl, 0,25% (b/v) ragi dan 0,25% (b/v) *xylan oat* di dalam labu ukur 50 mL, kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas. Langkah selanjutnya yaitu menyiapkan 5 buah tabung reaksi, kemudian masing- masing tabung reaksi diisi larutan hasil pengenceran sebanyak 10 mL dan ditutup dengan penutup kapas dan kasa. Media campuran dalam tabung reaksi tersebut kemudian dipanaskan dalam *autoclave* selama 15 menit dan dibiarkan sampai dengan suhu larutan sama dengan suhu ruang. Tabung reaksi yang berisi media campuran selanjutnya disimpan di dalam lemari pendingin.

c. Pembuatan Media Produksi

Media produksi dibuat dengan mencampurkan 0,5% (b/v) triptofan, 0,5% (b/v) NaCl dan 0,25% (b/v) ragi di dalam labu ukur 50 mL, kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas. Media campuran kemudian dipindahkan ke dalam erlenmeyer 100 mL. kemudian erlenmeyer ditutup dengan kasa dan kapas. Media campuran dalam erlenmeyer tersebut kemudian dipanaskan dalam *autoclave* selama 15 menit dan dibiarkan sampai dengan suhu larutan sama dengan suhu ruang.

d. Pembuatan Reagen Miller

Reagen Miller dibuat dengan melarutkan 1 gram NaOH, 18,2 gram natrium potassium tartrat, 1,0 gram asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS), 0,05 gram natrium sulfit, dan 0,2 gram fenol ke dalam 60 mL akuades satu persatu dan secara berurutan di dalam gelas beaker dan di lakukan pengadukan dengan *magnetic stirer* pada setiap penambahan agar campuran menjadi homogen. Campuran kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas (Miller, 1959).

e. Pembuatan Reagen Bradford

Pembuatan reagen Bradford dilakukan dengan membuat 2 jenis larutan yaitu larutan stok dan larutan kerja. Larutan stok dibuat dengan melarutkan CBB sebanyak 350 mg ke dalam campuran etanol 95% sebanyak 100 ml dan asam fosfat 85% sebanyak 200 ml, kemudian campuran disimpan pada suhu ruang. Larutan kerja dibuat dengan mencampurkan larutan stok sebanyak 30 mL dengan etanol 95% sebanyak 15 mL dan asam fosfat 85% sebanyak 30 mL pada labu ukur 500 ml, kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas. Larutan kerja kemudian disaring dengan kertas *Whatman* dan disimpan di dalam botol gelap pada suhu ruang. Larutan kerja yang telah dibuat selanjutnya dapat digunakan dalam beberapa minggu, namun setiap kali penggunaan harus dilakukan penyaringan terlebih dahulu (Bollag *and* Edelstein, 1996).

f. Pembuatan Larutan Buffer Sitrat-fosfat

Pembuatan larutan buffer sitrat- fosfat dilakukan dengan mencampurkan 2 jenis larutan, yaitu larutan sitrat 0,1 M dan larutan fosfat 0,2 M. Larutan sitrat 0,1 M dibuat dengan melarutkan asam sitrat sebanyak 9,605 gram di dalam labu ukur 500 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas sedangkan larutan fosfat 0,2 M dibuat dengan melarutkan dinatrium hidrogen fosfat dihidrat sebanyak 17,799 gram di dalam labu ukur 500 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Larutan buffer sitrat- fosfat dibuat dengan mencampurkan larutan asam sitrat 0,1 M sebanyak 243 mL dengan larutan dinatrium hidrogen fosfat dihidrat 0,2 M sebanyak 257 mL di dalam labu ukur 1000 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas.

Pengukuran pH dilakukan terhadap campuran larutan dengan menggunakan pH meter sampai dihasilkan campuran larutan dengan pH 5 (Deutscher, 1990).

g. Pembuatan Kurva Standar Xilosa

Pembuatan kurva standar xilosa dilakukan dengan cara menyiapkan larutan xilosa dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu konsentrasi 0,07-0,32 mg/ml dengan interval 0,05 mg/ml. Larutan standar xilosa diambil sebanyak 250 μ l untuk masing-masing konsentrasi larutan dan dicampurkan dengan reagen Miller sebanyak 750 μ l. Campuran larutan tersebut kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dalam air es selama 20 menit. Larutan berwarna yang dihasilkan dari campuran larutan dari masing-masing konsentrasi kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Nilai absorbansi yang dihasilkan dari pengukuran masing-masing konsentrasi larutan kemudian dijadikan data untuk pembuatan kurva standar xilosa dimana sumbu x merupakan konsentrasi dan sumbu y merupakan absorbansi.

h. Pembuatan Kurva Standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)

Pembuatan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) dibuat dengan menyiapkan larutan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu konsentrasi 0,025-0,300 mg/ml dengan interval 0,025 mg/ml. Larutan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) diambil sebanyak 100 μ l untuk masing-masing konsentrasi larutan dan ditambahkan dengan reagen kerja Bradford sebanyak 1 mL dalam tabung reaksi dan kemudian dihomogenkan. Campuran yang dihasilkan kemudian didinginkan selama 2-5 menit dan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 594 nm. Nilai absorbansi yang dihasilkan dari pengukuran masing-masing konsentrasi larutan kemudian dijadikan data untuk pembuatan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) dimana sumbu x merupakan konsentrasi dan sumbu y merupakan absorbansi.

3.4.2 Isolasi dan Pemurnian Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

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

Peremajaan bakteri pensекреksi enzim endo- β -1,4-D-xilanase dilakukan dengan mengambil isolat bakteri menggunakan jarum *ose*. Isolat bakteri yang telah terpilih kemudian digoreskan pada media Luria Bertani (LB) padat yang terdapat di dalam cawan petri. Media Luria Bertani (LB) padat yang berisi isolat bakteri tersebut kemudian diinkubasi pada suhu sebesar 37°C selama 16 jam.

b. Inokulasi Bakteri pada Media Inokulum Cair

Inokulasi bakteri ada media inokulum cair dilakukan dengan mengambil isolat bakteri menggunakan jarum *ose* dan diletakkan pada media inokulum cair. Media inokulum cair yang telah berisi isolat bakteri terpilih tersebut kemudian digojok dalam *shaker* pada suhu sebesar 37°C selama 16 jam dengan kecepatan 150 rpm.

c. Produksi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

Produksi enzim endo- β -1,4-D-Xilanase dilakukan dengan mengambil 1% (b/v) isolat bakteri terpilih dari media inokulum cair dan dimasukkan ke dalam media produksi sebanyak 50 ml. Media produksi yang berisi isolat bakteri terpilih tersebut kemudian digojok dalam *shaker* pada suhu sebesar 37°C selama 16 jam dengan kecepatan 150 rpm.

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

Isolasi ekstrak kasar enzim endo- β -1,4-D-xilanase dilakukan pada media produksi yang berisi isolat bakteri terpilih, kemudian disentrifugasi pada suhu sebesar 25°C selama 20 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. Pemisahan dilakukan terhadap supernatan dan pelet yang dihasilkan dari proses sentrifugasi. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar endo- β -1,4-D-xilanase.

e. Penentuan Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

Penentuan aktivitas ekstrak kasar enzim endo- β -1,4-D-xilanase dilakukan berdasarkan metode Miller yaitu dengan mencampurkan 125 μ l *xylan oat* 0,8% (b/v) dalam buffer sitrat-fosfat ke dalam ekstrak kasar enzim endo- β -1,4-D-xilanase sebanyak 125 μ l. Campuran ekstrak kasar enzim dan substrat berupa *xylan oat* tersebut diinkubasi selama 60 menit pada suhu 40°C dan ditambahkan 750 μ l reagen Miller serta kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit, selanjutnya didinginkan dalam air es selama 20 menit. Campuran yang telah

didinginkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang sebesar 550 nm menggunakan spektrofotometer.

Penentuan aktivitas ekstrak kasar enzim endo-β-1,4-D-xilanase juga membutuhkan larutan perbandingan berupa larutan kontrol. Pembuatan larutan kontrol sama halnya dengan pembuatan larutan sampel, namun enzim endo-β-1,4-D-xilanase pada larutan kontrol dibuat inaktiv terlebih dahulu dengan cara memanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam sebelum dicampurkan dengan substrat berupa *xylan oat*. Data yang diperoleh dari percobaan yang telah dilakukan selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas ekstrak kasar enzim endo-β-1,4-D-xilanase menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Enzim (U.ml}^{-1}\text{)} = \frac{([s] - [k]) \times Fp \times \left(\frac{V_{total}}{V_{enzim}}\right)}{t \times BM \text{ xilosa}} \dots\dots\dots (3.1)$$

dimana,

- [s] : konsentrasi sampel (mg/ml)
- [k] : konsentrasi kontrol (mg/ml)
- Fp : faktor pengenceran
- V_t : volume total (μl)
- V_e : volume enzim (μl)
- t : waktu hidrolisis substrat oleh enzim
- BM : berat molekul xilosa (g/mol)

Konsentrasi sampel dan kontrol dapat diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi pada persamaan regresi dari kurva standar xilosa yang diperoleh pada metode 3.4.1 poin g.

f. Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase

Penentuan kadar protein ekstrak kasar enzim endo-β-1,4-D-Xilanase dilakukan berdasarkan metode Bradford (Bollag *et al*, 1996) yaitu dengan menambahkan reagen Bradford sebanyak 1 mL kedalam 100 μl ekstrak kasar enzim endo-β-1,4-D-xilanase. Campuran enzim dan reagen tersebut kemudian dikocok menggunakan vortex dan didiamkan selama 2-5 menit kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang sebesar 595 nm. Penentuan kadar protein ekstrak kasar enzim endo-β-1,4-D-Xilanase selanjutnya dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Kadar Protein } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{abs} \pm C}{m} \dots\dots\dots (3.2)$$

Keterangan,

- Abs : absorbansi pada panjang gelombang 595 nm
- C : nilai *intercept* dari persamaan kurva standar BSA
- m : nilai *gradient* dari persamaan kurva standar BSA
- g. Pemurnian Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

1). Fraksinasi Ammonium Sulfat

Pemurnian enzim endo- β -1,4-D-xilanase dengan menggunakan metode fraksinasi ammonium sulfat bertingkat dilakukan dengan menambahkan ammonium sulfat jenuh dengan konsentrasi 40-50% kedalam ekstrak kasar enzim kasar endo- β -1,4-D-xilanase yang sebelumnya telah dimasukkan ke dalam sebuah erlenmeyer. Campuran ekstrak kasar enzim dan ammonium sulfat selanjutnya disentrifugasi selama 20 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan sebesar 8.000 rpm. Supernatan dan pelet yang diperoleh pada proses sentrifugasi tersebut kemudian dipisahkan. Pelet yang dihasilkan kemudian dilarutkan dalam buffer sitrat dengan volume sebanyak setengah dari volume enzim yang digunakan. Enzim hasil fraksinasi ammonium sulfat tersebut kemudian ditentukan aktivitas enzimnya menggunakan metode pada 3.4.2 poin e dan kadar proteinnya menggunakan metode pada 3.4.2 poin f.

2). Dialisis

Pemurnian enzim endo- β -1,4-D-xilanase dengan menggunakan metode dialisis ini dilakukan untuk menghilangkan kadar ammonium sulfat yang masih tertinggal dalam larutan enzim pada proses pemurnian sebelumnya. Larutan enzim yang dihasilkan pada proses fraksinasi ammonium sulfat dimasukkan ke dalam kantung dialisis dan dicelupkan dalam gelas beaker yang berisi buffer sitrat-fosfat dan anak stirer. Suhu pada proses pemurnian enzim dengan metode dialisis ini adalah sebesar 4°C. Larutan buffer sitrat-fosfat yang digunakan harus diganti pada jam ke 2, 4, 6 dan 12 selama 24 jam. Enzim hasil dialisis tersebut kemudian ditentukan aktivitas enzimnya menggunakan metode pada 3.4.2 poin e dan kadar proteinnya menggunakan metode pada 3.4.2 poin f.

3.4.3 Ekstraksi Xilan dari Limbah Kulit Kopi

Ekstraksi xilan dari limbah kulit kopi dilakukan dengan menggunakan limbah kulit kopi yang sebelumnya telah dilakukan proses delignifikasi. Proses delignifikasi limbah kulit kopi dilakukan dengan menimbang limbah kulit kopi sebanyak 10 gram dan ditambahkan dengan larutan NaOCl 0,5% sebanyak 100 mL. Limbah kulit kopi tersebut kemudian direndam dalam larutan NaOCl pada suhu 28°C selama 5 jam. Limbah kulit kopi yang telah direndam kemudian dibilas dengan akuades dan dilakukan penyaringan dengan kertas saring. Residu hasil penyaringan kemudian dioven dan digunakan untuk proses ekstraksi xilan selanjutnya.

Limbah kulit kopi yang telah didelignifikasi ditambahkan dengan larutan NaOH konsentrasi 12 % dengan perbandingan berat sampel dan banyaknya larutan NaOH sebesar 1:10 (b/v) pada suhu 28°C selama 24 jam. Rendaman kemudian di sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan sebesar 10.000 rpm. Proses ini akan menghasilkan supernatan dan pelet, kemudian supernatan yang diperoleh dipisahkan dari pelet dan diukur nilai pH-nya. Supernatan tersebut kemudian dinetralkan dengan menambah larutan HCl 6 N tetes demi tetes. Sampel yang telah dinetralkan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dari pelet dan ditambah dengan larutan etanol dengan konsentrasi 95% dengan perbandingan supernatan: etanol sebesar 1:3. Campuran larutan tersebut disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Endapan yang dihasilkan kemudian dioven dan ditimbang hingga berat endapan konstan.

3.4.4 Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

Optimasi konsentrasi enzim endo- β -1,4-D-xilanase perlu dilakukan agar diperoleh produk hidrolisis dengan hasil yang maksimal. Optimasi konsentrasi enzim dilakukan melalui pembuatan konsentrasi enzim dengan berbagai variasi konsentrasi. Variasi konsentrasi enzim yang dibuat yaitu sebesar 0,004-0,164 U/mL dengan interval sebesar 0,020 U/mL. Hidrolisis xilan dilakukan dengan menambahkan 125 μ L endo- β -1,4-D-xilanase (variasi konsentrasi) pada larutan

substrat xilan 0,8% (b/v) dalam buffer fosfat-sitrat pH 5. Campuran tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 40°C dan ditambahkan 750 µL asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Campuran kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit, selanjutnya didinginkan dalam air es selama 20 menit. Campuran yang telah didinginkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang sebesar 550 nm menggunakan spektrofotometer.

Proses ini juga membutuhkan larutan pembanding berupa larutan kontrol. Pembuatan larutan kontrol sama halnya dengan pembuatan larutan sampel, namun enzim endo-β-1,4-D-xilanase dibuat inaktiv terlebih dahulu dengan cara memanaskan 125 µL enzim selama 1 jam pada suhu 100°C. Total gula reduksi ditentukan berdasarkan perhitungan dengan menggunakan persamaan regresi dari kurva standar xilosa yang diperoleh pada metode 3.4.1 poin g. Kadar gula reduksi selanjutnya dapat ditentukan dengan memakai persamaan:

$$\text{Kadar Gula Reduksi} = \frac{abs \pm c}{m} \dots\dots\dots(3.3)$$

di mana,

- Abs : nilai absorbansi pada λ₅₅₀ nm.
- c : nilai intersep dari persamaan kurva standar xilosa
- m : nilai kemiringan dari kurva standar xilosa

3.4.5 Uji Kinetika Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase terhadap Substrat Xilan Kulit Kopi

Uji kinetika juga akan dilakukan pada penelitian ini untuk menentukan nilai K_M, V_{Max} dan k_{Cat} dari enzim endo-β-1,4-D-xilanase dengan substrat xilan kulit kopi. Uji Kinetika dilakukan dengan cara memvariasikan konsentrasi substrat xilan kulit kopi dan waktu inkubasi. Uji kinetika ini sekaligus merupakan optimasi konsentrasi substrat xilan dari limbah kulit kopi agar diperoleh produk hidrolisis dengan hasil yang maksimal. Konsentrasi substrat xilan kulit kopi yang digunakan yaitu 0,4-1,2 % (b/v) dengan interval sebesar 0,2 % dengan variasi waktu inkubasi sebesar 0 jam, 4 jam, 8 jam, 12 jam, 16 jam, 20 jam dan 24 jam. Konsentrasi enzim yang digunakan adalah konsentrasi optimum yang diperoleh pada prosedur 3.4.4.

Hidrolisis xilan dilakukan dengan menambahkan 125 µL endo-β-1,4-D-xilanase pada larutan substrat xilan (variasi konsentrasi) dalam buffer fosfat-sitrat

pH 5. Campuran tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 40°C dan ditambahkan 750 μL asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Campuran kemudian dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 100°C selama 15 menit dan didinginkan dalam air es selama 20 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang sebesar 550 nm. Kadar gula reduksi hasil hidrolisis yang diperoleh juga ditentukan seperti pada prosedur 3.4.4. Proses ini juga membutuhkan larutan pembanding berupa larutan kontrol.



DAFTAR PUSTAKA

- Akpinar, O., Erdogan, K., and Bostanci, S. 2009. *Enzymatic Production of Xylooligosaccharide from Selected Agricultural Wastes*. Journal of Food and Bioproducts Processing Vol. 87: 145–151.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G. S. 2001. *Microbial Xylanases and Their Industrial Applications: A review*. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 56: 326–338.
- Bollag, D.M., Rozicky, M.D., and Edelstein, S.J. 1996. *Protein Methods*. Edisi Kedua. New York : John Willey & Sons Inc.
- Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., and Foglianao, V. 2004. *Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 1338-1343.
- Buruiana, CT and Vizireanu C. 2014. *Prebiotic Xylooligosaccharides From Lignocellulosic Materials: Production, Purification and Application: An Overview*. Journal of Food Technology Vol 38(2): 18-31.
- Caparros, S., Garrote, G., Ariza, J., Diaz, M.J., and Lopez, F., 2007. *Xylooligosaccharides Production from Arundo donax*. J. Agric. Food Chem. 55, 5536–5543.
- Carvalho, A.F.A., Neto, P.de O., da Silva, D.F., and Pastore, G.M. 2013. *Xylooligosaccharides from Lignocellulosic Materials: Chemical structure, Health Benefits and Production by Chemical and Enzymatic Hydrolysis*. Food Research International, 51: 75–85.
- Deutscher, M.P. 1990. *Methods in Enzymology : Guide to Protein Purification Vol. 182*. California : Academic Press Inc.
- Khoirullah, D O. 2016. *Studi Kinetika Enzim Endo β -1,4-D-Xilanase dan Optimasi Konsentrasi Substrat Xilan dari Kulit Singkong pada Proses Hidrolisis untuk memproduksi Xilooligosakarida*. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Universitas Jember.

Kubata, Suzuki, Horitsu, Kawai, and 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 GP, Pushpa A, and Prabha H. 2012. *A Review on Xylooligosaccharides*. International Research Journal of Pharmacy.

Kurniawan, Andika. Ade. 2015. *Optimasi Kondisi Hidrolisis Xilan Oat dengan Endo β -1,4-D-Xilanase Asal Mikroorganisme dalam Sistem Abdomenal Rayap untuk Produksi Xylooligosakarida*. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Universitas Jember.

Lay, B. W. and Sugyo, H. 1992. *Mikrobiologi*. Jakarta: Rajawali Press.

Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1* (diterjemahkan oleh : Meggy Thenawijaya). Jakarta : Erlangga.

Masruroh, H. 2016. *Ekstraksi Xilan dari Limbah Kulit Kopi sebagai Substrat Endo β -1,4-D-Xilanase*. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Universitas Jember.

Meryandini, A, Wahyu W, Besty M, Titi C.S, Nisa R, dan Hasrul S. 2009. *Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya*. Jurnal Makara Sains Vol 13 (1): 33-38.

Miller, G.L. 1959. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry Vol. 31 : 426-428.

Murray, R. K. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry 26th Edition*. USA: McGraw-Hill Companies.

Murthy, P.S. and Naidu, M.M. 2010. *Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry by-products*. Journal of Food and Bioprocess Technology.

Napitulu, J. Manurung, F dan Sinaga, SB. 2010. *Bioprocessing Limbah Kulit Kopi Sebagai Sumber Protein Alternatif Dalam Pakan Ikan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Nelson, David L. Cox, and Michael M. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry fifth edition*. New York: W.H. Freeman and Company.

Neves, C. 1974. *A estória do café* (p. 52). Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro do Café.

Poedjiadi, A. 1994. *Dasar– Dasar Biokimia Edisi Revisi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.

Pujiyanto. 2007. *Pemanfaatan Kulit Buah Kopi dan Bahan Mineral Sebagai Amelioran Tanah Alami*. Jurnal Pelita Perkebunan Vol. 23: 2.

Raharjo, B. 2013. *Analisis Penentu Ekspor Kopi Indonesia*. Jurnal Ilmiah Ekonomi dan Bisnis Vol. 1: 1. Malang: Universitas Brawijaya.

Ratnadewi, A.A.I. dan Handayani, W. 2007. *Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Xilanolitik Asal Mikrob dalam Sistem Intestinal Rayap untuk Memproduksi Xilooligosakarida sebagai Pereduksi Resiko Kanker*. Tidak Diterbitkan. Laporan Penelitian Tahun II Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi. Jember: Universitas Jember.

Reed, Gerald. 1975. *Enzymes in Food Processing Second Edition*. New York: Academic Press Inc.

Sadikin, Mohamad. 2002. *Biokimia Enzim*. Jakarta : Widya Medika.

Safaria, S. 2013. *Efektivitas campuran enzim selulase dari Aspergillus niger dan Trichoderma reesei dalam menghidrolisis Substrat sabut kelapa*. ISSN: 2303- 1077, 2(1) : 46- 51.

Shallom, Dalia. and Shoham, Yuval. 2003. *Microbial Hemicellulases*. Israel: Current Opinion in Microbiology 6 : 219-228.

Sjostrom, E. 1998. *Kimia Kayu: Dasar-dasar dan Penggunaannya*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Sunna A and Antranikian G. 1997. *Xylanolytic Enzyme from Fungi and Bacteria*. *Critical Reviews in Biotechnology* 17(1): 39-67.

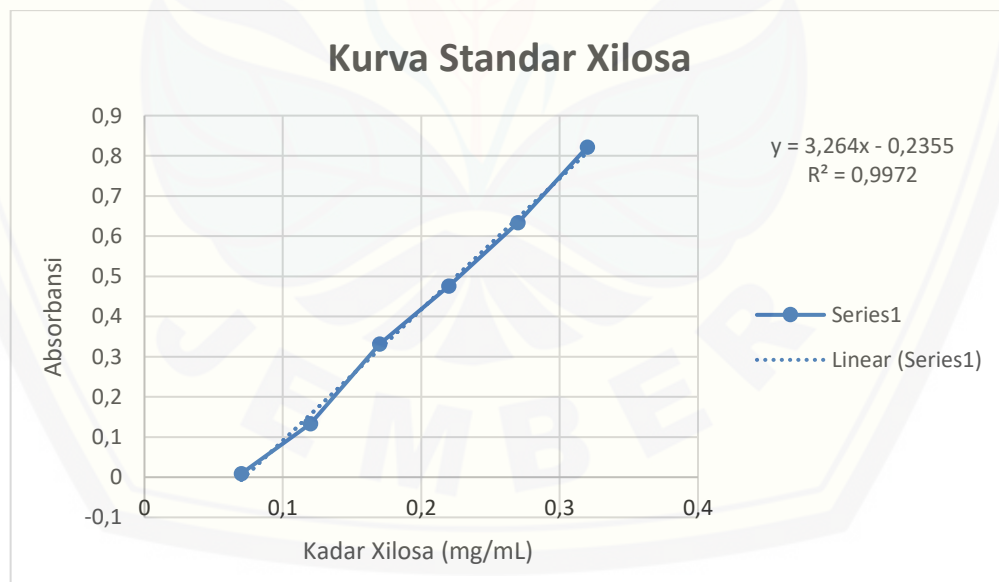


LAMPIRAN

3.1 Kurva Standar

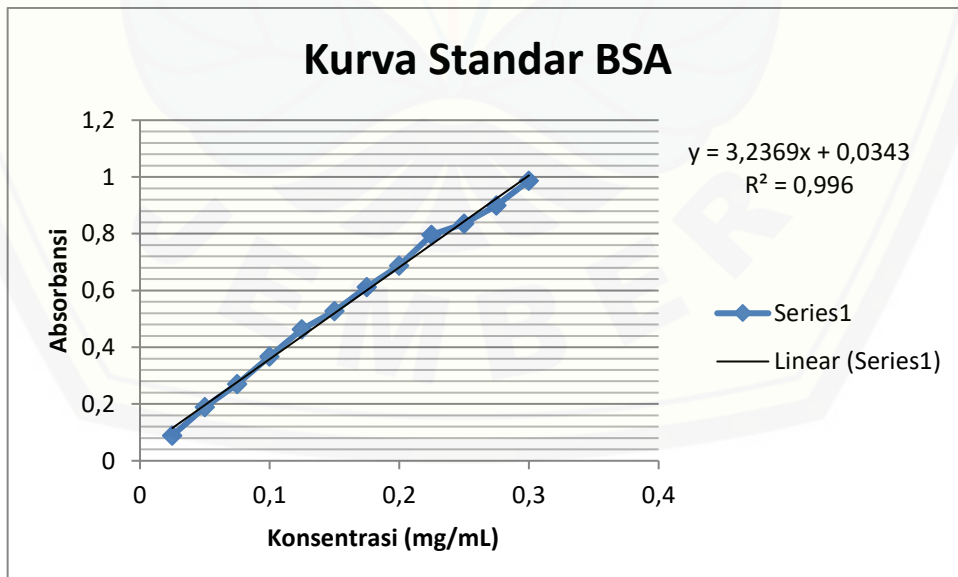
a. Kurva Standar Xilosa (Panjang Gelombang 550 nm)

Konsentrasi Xilosa (mg/mL)	Pengukuran Absorbansi			Rata- rata	Standar Deviasi
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
0,070	0,009	0,012	0,007	0,009	0,003
0,120	0,135	0,140	0,124	0,133	0,008
0,170	0,325	0,329	0,342	0,332	0,009
0,220	0,478	0,479	0,472	0,476	0,004
0,270	0,642	0,635	0,624	0,634	0,009
0,320	0,826	0,818	0,822	0,822	0,004



b. Kurva Standar BSA (Panjang Gelombang 594 nm)

Konsentrasi BSA (mg/mL)	Pengukuran Absorbansi			Rata- rata	Standar Deviasi
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
0,025	0,089	0,088	0,089	0,089	0,001
0,050	0,189	0,184	0,194	0,189	0,005
0,075	0,218	0,334	0,258	0,270	0,058
0,100	0,378	0,338	0,385	0,367	0,025
0,125	0,415	0,536	0,438	0,463	0,064
0,150	0,507	0,504	0,570	0,527	0,037
0,175	0,629	0,606	0,601	0,612	0,014
0,200	0,656	0,700	0,708	0,688	0,028
0,225	0,727	0,814	0,847	0,796	0,062
0,250	0,800	0,892	0,816	0,836	0,049
0,300	0,988	0,978	0,995	0,987	0,008



4.1 Produksi Substrat Xilan Kulit Kopi

a. Produksi Xilan Ulangan Pertama

Data	Hasil
Massa Kulit Kopi	40,00 gram
Massa Kulit Kopi Terdelignifikasi	30,76 gram
Kadar Lignin yang Hilang	23,10%
Massa Ekstrak Kasar Xilan	2,24 gram
Rendemen Xilan	5,60%

Perhitungan:

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = \frac{\text{Massa Kulit Kopi} - \text{Massa Kulit Kopi Terdelignifikasi}}{\text{Massa Kulit Kopi}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = \frac{(40,00 - 30,76) \text{ gram}}{40,00 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = \frac{9,24 \text{ gram}}{40,00 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = 23,10\%$$

$$\text{Rendemen Xilan} = \frac{\text{Massa Ekstrak Kasar Xilan}}{\text{Massa Kulit Kopi}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen Xilan} = \frac{2,24 \text{ gram}}{40,00 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen Xilan} = 5,60\%$$

b. Produksi Xilan Ulangan Kedua

Data	Hasil
Massa Kulit Kopi	40,00 gram
Massa Kulit Kopi Terdelignifikasi	32,25 gram
Kadar Lignin yang Hilang	19,38%
Massa Ekstrak Kasar Xilan	1,40 gram
Rendemen Xilan	3,50%

Perhitungan:

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = \frac{\text{Massa Kulit Kopi} - \text{Massa Kulit Kopi Terdelignifikasi}}{\text{Massa Kulit Kopi}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = \frac{(40,00 - 32,25) \text{ gram}}{40,00 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = \frac{7,75 \text{ gram}}{40,00 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = 19,38\%$$

$$\text{Rendemen Xilan} = \frac{\text{Massa Ekstrak Kasar Xilan}}{\text{Massa Kulit Kopi}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen Xilan} = \frac{1,40 \text{ gram}}{40,00 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen Xilan} = 3,50\%$$

c. Produksi Xilan Ulangan Ketiga

Data	Hasil
Massa Kulit Kopi	40,00 gram
Massa Kulit Kopi Terdelignifikasi	31,40 gram
Kadar Lignin yang Hilang	21,50%
Massa Ekstrak Kasar Xilan	1,90 gram
Rendemen Xilan	4,75%

Perhitungan:

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = \frac{\text{Massa Kulit Kopi} - \text{Massa Kulit Kopi Terdelignifikasi}}{\text{Massa Kulit Kopi}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = \frac{(40,00 - 31,40) \text{ gram}}{40,00 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = \frac{8,60 \text{ gram}}{40,00 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin yang Hilang} = 21,50\%$$

$$\text{Rendemen Xilan} = \frac{\text{Massa Ekstrak Kasar Xilan}}{\text{Massa Kulit Kopi}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen Xilan} = \frac{1,90 \text{ gram}}{40,00 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen Xilan} = 4,75\%$$

4.2 Penentuan Karakteristik Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase

a. Rumus Aktivitas Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase

Aktivitas enzim endo-β-1,4-D-xilanase ditentukan berdasarkan metode Miller menggunakan persamaan sebagai berikut:

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

dimana,

- [s] : konsentrasi sampel (mg/ml)
- [k] : konsentrasi kontrol (mg/ml)
- Fp : faktor pengenceran
- V_t : volume total (μl) yaitu berupa jumlah total volume enzim, substrat dan reagen DNS
- V_e : volume enzim yang digunakan pada saat pengukuran dilakukan (μl)
- t : waktu hidrolisis substrat oleh enzim (menit), 60 menit
- BM : berat molekul xilosa (g/mol), 150,13 g/mol

b. Hasil Penentuan Aktivitas Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase

Nama	Jenis	Pengukuran Absorbansi					SD	KX (mg/ mL)	AE (U/mL)
		Abs 1	Abs 2	Abs 3	\bar{x}				
E.K	Sampel	0,441	0,450	0,452	0,448	0,006	0,209	0,067	
	Kontrol	0,201	0,202	0,198	0,200	0,002			
F. 40-50%	Sampel	0,681	0,670	0,676	0,676	0,006	0,279	0,130	
	Kontrol	0,197	0,198	0,200	0,198	0,001			
Dialisat	Sampel	0,798	0,808	0,813	0,806	0,008	0,319	0,164	
	Kontrol	0,204	0,206	0,203	0,204	0,002			

Keterangan :

- E.K : Ekstrak Kasar Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase
- F. 40-50% : Fraksinasi Bertingkat 40- 50%
- Abs 1 : Absorbansi Pengulangan ke-1
- Abs 2 : Absorbansi Pengulangan ke-2
- Abs 3 : Absorbansi Pengulangan ke-3
- \bar{x} : Rata- rata Pengukuran Absorbansi Pengulangan ke-1 s.d 3
- KX : Kadar Xilosa yang diperoleh berdasarkan pengukuran pada lampiran A.1
- AE : Aktivitas Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase

c. Rumus Penentuan Kadar Protein Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase

Kadar protein enzim endo-β-1,4-D-xilanase ditentukan berdasarkan metode Bradford menggunakan persamaan sebagai berikut:

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

dimana,

- abs : hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 594 nm
- C : nilai *intercept* dari persamaan kurva standar BSA pada lampiran A.2
- Fp : faktor pengenceran
- m : nilai *gradient* dari persamaan kurva standar BSA pada lampiran A.2

d. Rumus Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase

Aktivitas spesifik enzim endo-β-1,4-D-xilanase ditentukan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Spesifik } \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}}\right) = \frac{\text{AE } \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}}\right)}{\text{KP } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}$$

dimana,

- AE : Aktivitas enzim yang diperoleh berdasarkan pengukuran pada lampiran B.1 (U/mL)
- KP : Kadar protein enzim yang diperoleh berdasarkan pengukuran pada lampiran B.2a (mg/mL)

e. Hasil Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase

Nama	Pengukuran Absorbansi					KP (mg/ mL)	AE (U/mL)	AS (U/mg)
	Abs 1	Abs 2	Abs 3	\bar{x}	SD			
E.K	0,502	0,477	0,511	0,497	0,018	0,144	0,067	0,465
F.40-50%	0,346	0,352	0,35	0,349	0,003	0,096	0,130	1,354
Dialisat	0,321	0,311	0,305	0,312	0,008	0,089	0,164	1,843

Keterangan :

- E.K : Ekstrak Kasar Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase
- F. 40-50% : Fraksinasi Bertingkat 40- 50%
- \bar{x} : Rata- rata Pengukuran Absorbansi Pengulangan ke-1 s.d 3
- SD : Standar Deviasi
- KP : Kadar Protein Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase
- AE : Aktivitas Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase
- AS : Aktivitas Spesifik Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase

4.3 Optimasi Konsentrasi Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase dan Konsentrasi Substrat Xilan Kulit Kopi

a. Rumus Perhitungan Kadar Gula Pereduksi

$$\text{Kadar Gula Pereduksi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{abs} \pm C \times Fp}{m}$$

dimana,

abs : hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 550 nm

C : nilai intersep dari persamaan kurva standar xilosa pada lampiran A.1

Fp : faktor pengenceran

m : nilai kemiringan dari kurva standar xilosa pada lampiran A.1

b. Rumus Perhitungan Total Gula Pereduksi

$$\text{TGP } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) = \text{KX}_{\text{sampel}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) - \text{KX}_{\text{kontrol}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)$$

dimana,

TGP : total gula pereduksi (mg/mL)

KX_{sampel} : kadar xilosa sampel yang diperoleh berdasarkan perhitungan pada lampiran B.3a

KX_{kontrol} : kadar xilosa kontrol yang diperoleh berdasarkan perhitungan pada lampiran B.3a

(Kontrol: Enzim inaktif yang telah dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 jam)

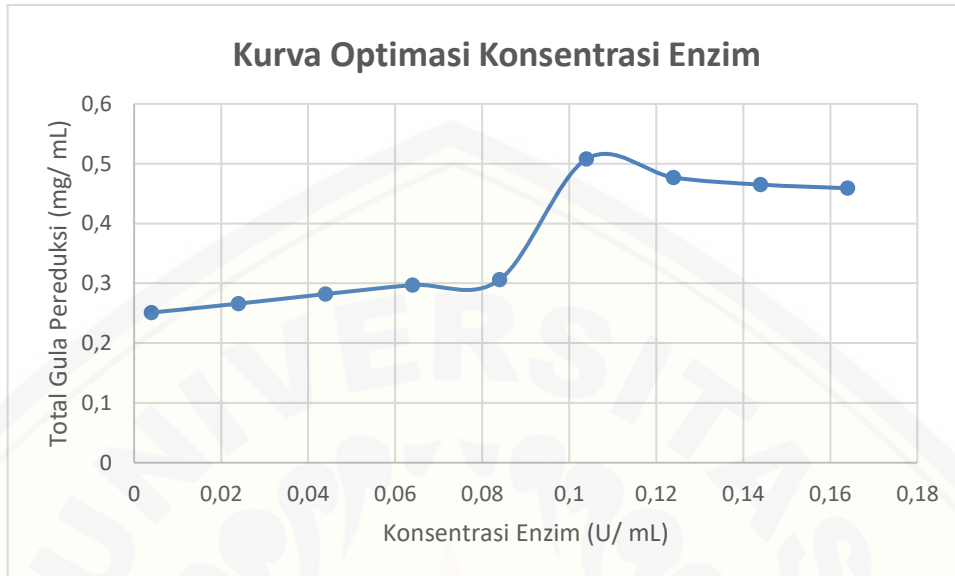
c. Hasil Optimasi Konsentrasi Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase

[E] (U/mL)		Pengukuran Absorbansi					FP	KX (mg/mL)	TGP (mg/mL)
		Abs 1	Abs 2	Abs 3	\bar{x}	SD			
0,004	S	0,398	0,397	0,389	0,395	0,005	2	0,386	0,251
	K	0,208	0,201	0,212	0,207	0,006	1	0,136	
0,024	S	0,414	0,420	0,419	0,418	0,003	2	0,400	0,266
	K	0,201	0,203	0,202	0,202	0,001	1	0,134	
0,044	S	0,442	0,441	0,453	0,445	0,007	2	0,417	0,282
	K	0,208	0,203	0,207	0,206	0,003	1	0,135	
0,064	S	0,472	0,470	0,469	0,470	0,002	2	0,432	0,297
	K	0,204	0,208	0,206	0,206	0,002	1	0,135	
0,084	S	0,487	0,485	0,483	0,485	0,002	2	0,441	0,306
	K	0,204	0,210	0,203	0,206	0,004	1	0,135	
0,104	S	0,820	0,812	0,815	0,816	0,004	2	0,644	0,508
	K	0,207	0,209	0,211	0,209	0,002	1	0,136	
0,124	S	0,634	0,628	0,632	0,631	0,003	2	0,612	0,477
	K	0,203	0,204	0,209	0,205	0,003	1	0,135	
0,144	S	0,626	0,629	0,628	0,628	0,002	2	0,603	0,465
	K	0,216	0,218	0,213	0,216	0,003	1	0,138	
0,164	S	0,619	0,611	0,617	0,616	0,004	2	0,598	0,459
	K	0,218	0,219	0,214	0,217	0,003	1	0,139	

Keterangan :

- [E] : Konsentrasi enzim endo- β -1,4-D-Xilanase dengan berbagai variasi konsentrasi
- Abs 1 : Absorbansi pengulangan ke-1
- Abs 2 : Absorbansi pengulangan ke-2
- Abs 3 : Absorbansi pengulangan ke-3
- \bar{x} : Rata- rata pengukuran absorbansi pengulangan ke-1 s.d 3
- FP : Faktor Pengenceran
- KX : Kadar xilosa yang diperoleh berdasarkan pengukuran pada lampiran A.1
- TGP : Total gula pereduksi
- S : Sampel produk hidrolisis substrat dengan enzim aktif
- K : Kontrol (Produk hidrolisis substrat dengan enzim inaktif)

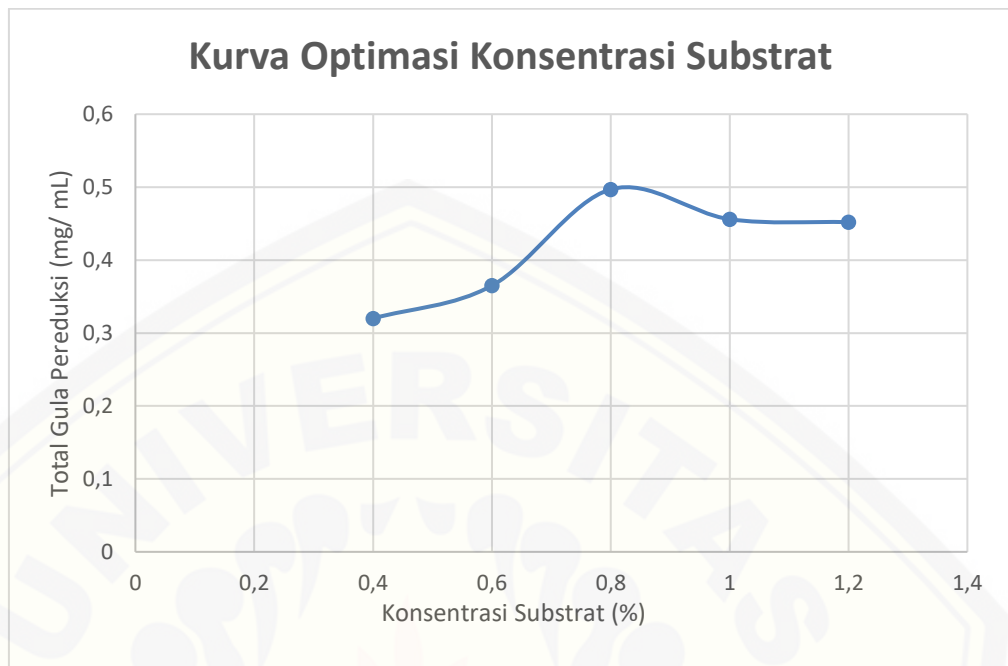
d. Kurva Optimasi Konsentrasi Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase



e. Hasil Optimasi Konsentrasi Substrat Xilan Kulit Kopi

[S] (%)		Pengukuran Absorbansi					FP	KX (mg/mL)	TGP (mg/mL)
		Abs 1	Abs 2	Abs 3	\bar{x}	SD			
0,4	S	0,513	0,510	0,505	0,509	0,004	2	0,510	0,320
	K	0,203	0,208	0,217	0,209	0,007	1	0,136	
0,6	S	0,585	0,578	0,580	0,581	0,004	2	0,500	0,365
	K	0,211	0,200	0,208	0,206	0,006	1	0,135	
0,8	S	0,794	0,789	0,799	0,794	0,005	2	0,631	0,497
	K	0,203	0,200	0,202	0,202	0,002	1	0,134	
1,0	S	0,723	0,735	0,734	0,731	0,007	2	0,592	0,456
	K	0,200	0,213	0,212	0,208	0,007	1	0,136	
1,2	S	0,724	0,716	0,730	0,723	0,007	2	0,585	0,452
	K	0,210	0,206	0,209	0,208	0,002	1	0,136	

f. Kurva Optimasi Konsentrasi Substrat Xilan Kulit Kopi

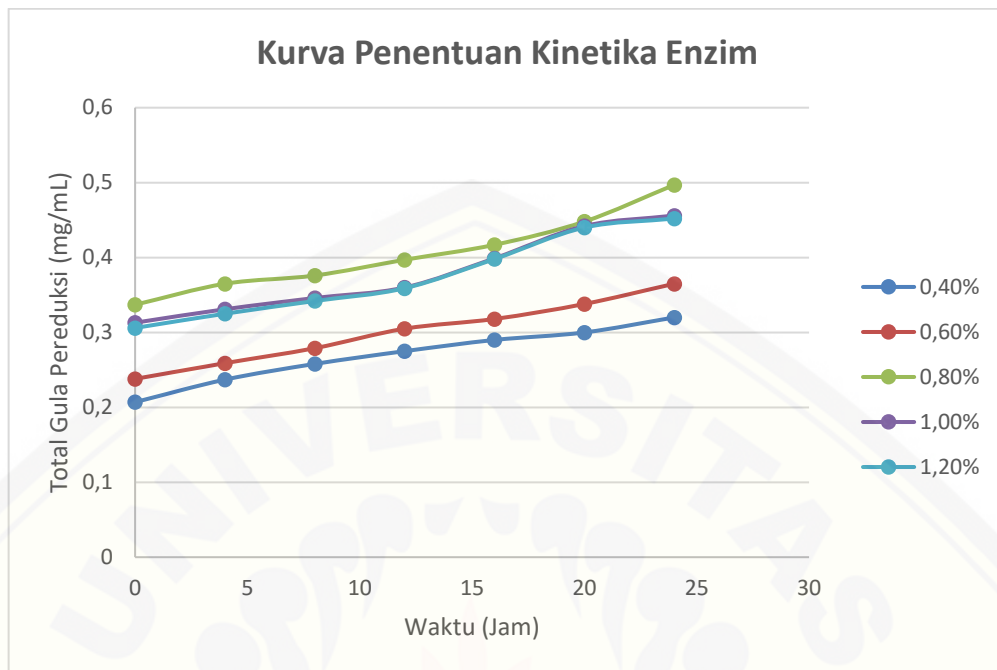


4.4 Kinetika Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase terhadap Substrat Xilan Kulit Kopi

a. Tabel Kinetika Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase terhadap Substrat Xilan Kulit Kopi

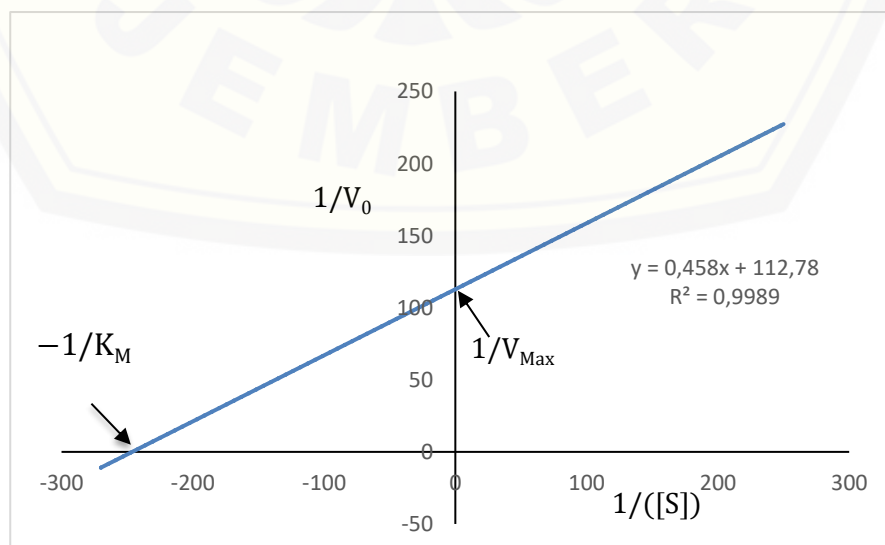
Konsentrasi Substrat (%)	Waktu (Jam)	Kadar Xilosa (mg/mL)		Total Gula Pereduksi (mg/mL)
		Sampel	Kontrol	
0,4	0	0,343	0,135	0,207
	4	0,373	0,136	0,237
	8	0,394	0,137	0,258
	12	0,411	0,136	0,275
	16	0,428	0,137	0,290
	20	0,436	0,136	0,300
	24	0,510	0,136	0,320
	0	0,377	0,138	0,238
0,6	4	0,397	0,138	0,259
	8	0,417	0,137	0,279
	12	0,442	0,137	0,305
	16	0,455	0,137	0,318
	20	0,473	0,135	0,338
	24	0,500	0,135	0,365
	0	0,476	0,138	0,337
	4	0,500	0,135	0,365
0,8	8	0,515	0,139	0,376
	12	0,535	0,138	0,397
	16	0,554	0,137	0,417
	20	0,582	0,134	0,448
	24	0,631	0,134	0,497
	0	0,448	0,136	0,312
	4	0,468	0,136	0,331
	8	0,483	0,136	0,347
1,0	12	0,498	0,136	0,362
	16	0,535	0,136	0,399
	20	0,579	0,137	0,442
	24	0,592	0,136	0,456
	0	0,442	0,135	0,307
	4	0,461	0,136	0,325
	8	0,478	0,137	0,341
	12	0,495	0,138	0,357
1,2	16	0,632	0,137	0,398
	20	0,577	0,137	0,440
	24	0,585	0,136	0,452

b. Kurva Kinetika Enzim Endo-β-1,4-D-Xilanase terhadap Substrat Xilan Kulit Kopi



c. Plot Lineweaver- Burk

[S]	$\frac{1}{[S]}$	V_0	$\frac{1}{V_0}$
0,4 %	250,00	0,0044	227,27
0,6 %	166,67	0,0052	192,31
0,8 %	125,00	0,0061	163,93
1,0 %	100,00	0,0063	158,73
1,2 %	83,33	0,0065	153,85



Keterangan :

$$y = mx + C$$

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

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

$$x = \frac{1}{[S]}$$

$$C = \frac{1}{V_{Max}}; \text{ Jadi, } y = mx + C \leftrightarrow \frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{Max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{Max}}$$

Sehingga,

d. Nilai V_{Max}

$$y = mx + C \leftrightarrow \frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{Max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{Max}}$$

$$y = 0,458x + 112,78$$

Jadi, $C = \frac{1}{V_{Max}}$

$$112,78 = \frac{1}{V_{Max}}$$

$$V_{Max} = \frac{1}{112,78}$$

$$V_{Max} = 0,009 \frac{\text{mg}}{\text{mL} \times \text{jam}}$$

e. Nilai K_M

$$y = mx + C \leftrightarrow \frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{Max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{Max}}$$

$$y = 0,458x + 112,78 \text{ dengan } V_{Max} = 0,009 \frac{\text{mg}}{\text{mL} \times \text{jam}}$$

$$y = \frac{K_M}{V_{Max}}$$

$$0,458 = \frac{K_M}{V_{max}}$$

$$0,458 = \frac{K_M}{0,009}$$

$$K_M = 0,458 \times 0,009$$

$$K_M = 0,004 \text{ mg/mL}$$

f. Nilai K_{cat}

Persamaan yang digunakan yaitu sebagai berikut:

$$K_{Cat} = \frac{V_{Max}}{[E]_0}$$

dengan satuan,

$$K_{Cat} = \frac{V_{Max}}{[E]_0} = \frac{\left(\frac{\text{mol}}{\text{Lxs}}\right)}{\left(\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right)} = \left(\frac{\text{mol}}{\text{Lxs}}\right) \times \left(\frac{\text{L}}{\text{mol}}\right) = \frac{1}{\text{s}}$$

dimana,

V_{Max} : nilai V_{Max} yang diperoleh dari perhitungan

$[E]_0$: konsentrasi awal enzim yang digunakan

Jadi,

$$K_{Cat} = \frac{V_{Max}}{[E]_0}$$

$$K_{Cat} = \frac{0,009}{0,104}$$

$$K_{Cat} = 0,087/\text{s}$$

4.5 Dokumentasi Penelitian



(Sampel kulit kopi dalam bentuk serbuk yang telah dihaluskan)



(Hasil isolasi xilan yang berupa ekstrak kasar xilan dalam Keadaan Basah)



(Ekstrak kasar xilan dalam Keadaan Kering sebelum dihaluskan)



(Ekstrak kasar xilan setelah dihaluskan atau dalam keadaan serbuk)



(Larutan xilan kulit kopi)