



**PEMURNIAN PRODUK HIDROLISIS
ENDO- β -1,4-D-XILANASE ASAL *Bacillus sp.*
DENGAN KROMATOGRAFI FILTRASI GEL**

SKRIPSI

Oleh
Luluk Masnia
NIM 101810301032

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

2014



**PEMURNIAN PRODUK HIDROLISIS
ENDO- β -1,4-D-XILANASE ASAL *Bacillus sp.*
DENGAN KROMATOGRAFI FILTRASI GEL**

SKRIPSI

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

Oleh

Luluk Masnia

NIM 101810301032

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

2014

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Siti Chumaiyah dan Ayahanda Abdul Manan tercinta, serta semua keluarga terima kasih atas doa, motivasi, perhatian dan kasih sayang yang tiada henti tercurahkan;
2. guru-guru di RA Muslimat NU Labruk lor, MI Tarbiyatul Mubtadiin, SMPN 1 Sukodono, dan SMAN 1 Lumajang serta dosen-dosen di Jurusan Kimia FMIPA UNEJ yang telah memberikan ilmu, mendidik, dan membimbing dengan penuh kesabaran;
3. Almamater tercinta Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

Ilmu pengetahuan itu pahit pada awalnya, tetapi manis melebihi madu pada akhirnya.^{*)}

Dan mereka yang berjuang dan bersungguh-sungguh datang kepada Kami, Kami pasti akan menunjuki mereka jalan-jalan Kami.
(terjemahan Surat *Al-Ankabuut* ayat 69).^{**)}

Jika engkau telah membuat ketetapan, maka bulatkan tekad mu. Sebab rusaknya pikiran adalah karena keraguan.^{***)}

^{*)} Rais, H. S., dan Almahendra, R. 2013. *99 Cahaya di Langit Eropa: Perjalanan Menapak Jejak Islam di Eropa*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama

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

^{***)} Al-Qarni, A. A. 2006. *Don't Be Sad: Cara Hidup Positif Tanpa Pernah Sedih dan Frustrasi*. Jakarta: Magfirah Pustaka.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Luluk Masnia

NIM : 101810301032

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pemurnian Produk Hidrolisis Endo- β -1,4-D-Xilanase Asal *Bacillus sp.* dengan Kromatografi Filtrasi Gel“ adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 30 Juni 2014

Yang menyatakan,



Luluk Masnia

101810301032

SKRIPSI

PEMURNIAN PRODUK HIDROLISIS ENDO- β -1,4-D-XILANASE ASAL *Bacillus sp.* DENGAN KROMATOGRAFI FILTRASI GEL

Oleh

Luluk Masnia

NIM 101810301032

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

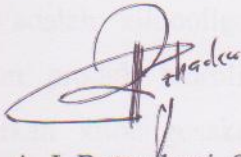
Skripsi berjudul “Pemurnian Produk Hidrolisis Endo- β -1,4-D-Xilanase Asal *Bacillus Sp.* dengan Kromatografi Filtrasi Gel” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : **RABU 16 JUL 2014**

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Tim Penguji;

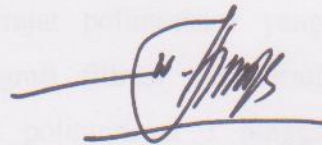
Ketua (DPU),



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

NIP. 197012251997022001

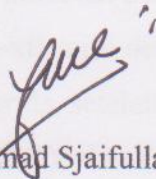
Sekretaris (DPA),



drh. Wuryanti Handayani, S.Si., M.Si.

NIP. 196008221985032002

Penguji I,



Drs. Achmad Sjaifullah M.Sc., Ph.D.

NIP. 196310121987021001

Penguji II,



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

NIP. 197104301998031003

Mengesahkan

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Jember



Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D.

NIP. 196101081986021001

RINGKASAN

Pemurnian Produk Hidrolisis Endo- β -1,4-D-Xilanase Asal *Bacillus sp.* dengan Kromatografi Filtrasi Gel; Luluk Masnia, 101810301032; 2014: 76 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Endo- β -1,4-D-xilanase adalah enzim ekstrakseluler yang dapat menghidrolisis xilan untuk menghasilkan xilooligosakarida dan sedikit xilosa. Endo- β -1,4-D-xilanase dapat diperoleh dari berbagai mikroorganisme, salah satunya adalah *Bacillus sp.* yang diisolasi dari sistem abdomen rayap tanah. Hasil hidrolisis utama dari endo- β -1,4-D-xilanase adalah xilooligosakarida dengan derajat polimerisasi yang beragam. Pemurnian produk hidrolisis dengan kromatografi filtrasi gel bertujuan untuk mendapatkan xilooligosakarida dengan derajat polimerisasi 2 hingga 10 yang memiliki sifat sebagai prebiotik. Tujuan tersebut dicapai melalui beberapa tahapan, yaitu (1) produksi endo- β -1,4-D-xilanase dari isolat *Bacillus sp.* (2) pemurnian ekstrak kasar endo- β -1,4-D-xilanase dengan fraksinasi amonium sulfat dan dialisis, (3) hidrolisis xilan oat dengan endo- β -1,4-D-xilanase, (4) pemurnian produk hidrolisis endo- β -1,4-D-xilanase dengan penggunaan kromatografi filtrasi gel, (5) deteksi profil xilooligosakarida setelah proses pemurnian berdasarkan penggunaan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (6) penentuan kadar xilooligosakarida dengan kromatografi cairan kinerja tinggi (KCKT).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar endo- β -1,4-D-xilanase yang dimurnikan dengan 50% amonium sulfat dan dialisis memiliki aktivitas spesifik tertinggi yaitu 1,4 U/mg. Kromatografi lapis tipis digunakan untuk identifikasi produk hidrolisis endo- β -1,4-D-xilanase dengan xilan oat pada pH 5, suhu 40 °C selama 15 jam menghasilkan noda-noda yang berhimpit antara xilosa, xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa, dan xilopentaosa. Hasil tersebut menunjukkan pemisahan pada KLT belum optimum. Profil xilooligosakarida dari Sephadex G-25 terdeteksi pada fraksi 13-28, sedangkan profil xilooligosakarida dari Sephadex G-15 terdeteksi pada

fraksi 11-22. Pemurnian dengan Sephadex G-15 dapat memisahkan xilooligosakarida dari xilosa dibanding dengan Sephadex G-15. Analisis menggunakan kromatografi cairan kinerja tinggi memperkuat hasil KLT, bahwa jenis produk hidrolisis endo- β -1,4-D-xilanase adalah xilosa, xilobiosa, xilotriosa, xiloteraosa, dan xilopentaosa. Xilopentaosa sebagai produk utama hidrolisis xilan oat dengan endo- β -1,4-D-xilanase asal *Bacillus sp.* memiliki kadar 2079,53 ppm (42,8%), sedangkan xilooligosakarida jenis xilotriosa (33,90 ppm), xilobiosa (12,67 ppm) dan xilotetraosa (11,85 ppm) memiliki kadar yang jauh lebih kecil.

Berdasarkan hasil penelitian ini, xilobiosa, xilotriosa, xiloteraosa, xilopentaosa, dan sedikit xilosa merupakan jenis atau komponen penyusun produk hidrolisis endo- β -1,4-D-xilanase. Xilopentaosa merupakan produk utama dari hidrolisis endo- β -1,4-D-xilanase dengan xilan oat. Xilooligosakarida yang diperoleh dapat dimanfaatkan sebagai prebiotik untuk meningkatkan pertumbuhan bakteri menguntungkan di dalam tubuh manusia.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pemurnian Produk Hidrolisis Endo- β -1,4-D-Xilanase Asal *Bacillus sp.* dengan Kromatografi Filtrasi Gel”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

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

1. Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Dr. A. A. I. Ratnadewi, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama, dan drh. Wuryanti Handayani, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. Drs. Achmad Sjaifullah M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Penguji I dan Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si., selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktunya guna menguji, serta memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
6. bapak dan ibu dosen-dosen FMIPA UNEJ, dan dosen-dosen Jurusan Kimia khususnya yang telah banyak memberikan ilmu dan pengetahuan;
7. teman-teman angkatan 2010, terima kasih atas semangat, bantuan, saran, perhatian, dan kenangan yang telah diberikan;

8. Anggia Rose S., Anita Karolina, Achmad Solikhudin A., dan Ulin Nizamiyah, terima kasih atas doa, dorongan, semangat dan perhatian yang diberikan selama ini;
9. Andika Ade Kurniawan sebagai rekan kerja, terima kasih atas kerjasama dan bantuannya;
10. teman-teman kos maslas yang tak bisa disebut satu per satu terima kasih atas semangat, perhatian dan kenangan yang tak kan terlupakan;
11. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

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

Jember, Juni 2014

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan	4
1.5 Manfaat.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Xilan	5
2.2 Xilooligosakarida	7
2.2.1 Definisi dan Struktur Xilooligosakarida	7
2.2.2 Manfaat Xilooligosakarida	7
2.2.3 Produksi Xilooligosakarida.....	9
2.2.4 Pemisahan dan Pemurnian Xilooligosakarida	11

2.3	Endo- β -1,4-D-Xilanase	12
2.4	Kromatografi Filtrasi Gel	14
2.5	Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	16
2.6	Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi	19
BAB 3.	METODE PENELITIAN	22
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.2	Alat dan Bahan.....	22
3.2.1	Alat Penelitian.....	22
3.2.2	Bahan Penelitian	22
3.3	Rancangan Penelitian	24
3.3.1	Diagram Alir Penelitian	24
3.4	Penanganan Sampel dan Preparasi Berbagai Larutan.....	25
3.4.1	Isolat Enzim Xilanase	25
3.4.2	Larutan Substrat Xilan Oat	25
3.4.3	Larutan Stok Xilosa	26
3.4.4	Bufer Fosfat-Sitrat (pH 5,0).....	26
3.4.5	Reagen DNS	25
3.4.6	Reagen Bradford	26
3.5	Prosedur Penelitian.....	26
3.5.1	Inokulasi dan Produksi Endo- β -1,4-D-Xilanase	26
3.5.2	Purifikasi Endo- β -1,4-D-Xilanase.....	26
	a. Fraksinasi Amonium Sulfat	26
	b. Dialisis.....	27
3.5.3	Pengujian Aktivitas Endo- β -1,4-D-Xilanase.....	27
3.5.4	Pengukuran Kadar Protein	28
3.5.5	Hidrolisis Xilan Menggunakan Endo- β -1,4-D-Xilanase.....	28
3.5.6	Pemurnian Hasil Hidrolisis Xilan Oat Menggunakan Kromatografi Filtrasi gel.....	29

3.5.7 Deteksi Hasil Pemurnian Hidrolisat	30
a. Deteksi Melalui Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	30
b. Deteksi Melalui Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi	30
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Endo-β-1,4-D-Xilanase dari <i>Bacillus sp</i>.....	31
4.2 Endo-β-1,4-D-Xilanase Hasil Fraksinasi Amonium Sulfat.....	35
4.3 Dialisat Endo-β-1,4-D-Xilanase	38
4.4 Produk Hidrolisis Endo-β-1,4-D-Xilanase	39
4.5 Pemurnian Produk Hidrolisis Endo-β-1,4-D-Xilanase	
Menggunakan Kromatografi Filtrasi Gel	41
4.6 Profil Pemurnian Produk Hidrolisis Endo-β-1,4-D-Xilanase	
dengan Kromatografi Lapis Tipis	44
4.7 Kadar Xilooligosakarida dengan Deteksi Kromatografi	
Cairan Kinerja Tinggi	47
BAB 5. PENUTUP.....	52
5.1 Kesimpulan	52
5.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN.....	59

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Parameter Matriks Kromatografi Filtrasi Gel	16
2.2 Fase Diam untuk Kromatografi Lapis Tipis	18
2.3 Aplikasi KLT untuk deteksi Gula Hasil Hidrolisis Secara Enzimatis	19
4.1 Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Endo- β -1,4-D-Xilanase	35
4.2 Optimasi Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat.....	36
4.3 Aktivitas Spesifik Endo- β -1,4-D-Xilanase Setelah Pengendapan Amonium sulfat 50%	37
4.4 Data aktivitas Dialisat Endo- β -1,4-D-Xilanase	39
4.5 Produk Hidrolisis Xilan Oat dengan Deteksi KCKT	51

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur Xilan dari Beberapa Sumber	6
2.2 Struktur Dasar Xilooligosakarida.....	7
2.3 Lokasi Hidrolisis Beberapa Enzim pada Xilan	10
2.4 Prinsip Pemisahan Kromatografi Filtrasi Gel	15
2.5 Proses Elusi pada Kromatografi Filtrasi Gel.....	15
3.2 Diagram Alir Penelitian	24
4.1 Kromatogram KLT Produk Hidrolisis Endo- β -1,4-D-Xilanase.....	40
4.2 Kolom Kromatografi Filtrasi Gel.....	42
4.3 Kromatogram KLT Fraksi-Fraksi dari Sephadex G-25	45
4.4 Kromatogram KLT Fraksi-Fraksi dari Sephadex G-15	46
4.5 Kromatogram KCKT fraksi 14-28 dari Sephadex G-25	49
4.6 Kromatogram KCKT fraksi 11-22 dari Sephadex G-15.....	50

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Kurva Hasil Penelitian	59
A.1 Kurva Standar Xilosa Dibaca pada Panjang Gelombang 550 nm	59
A.2 Kurva Standar BSA Dibaca pada Panjang Gelombang 595 nm	60
B. Data Hasil Pengamatan	57
B.1 Pengukuran Aktivitas Enzim	61
B.2 Pengukuran Protein dan Aktivitas spesifik Enzim	63
C. Optimasi Pemisahan dengan Kromatografi Filtrasi Gel	65
D. Perhitungan Nilai Rf Standar Hasil KLT	66
E. Kromatogram KLT	67
E.1 Sephadex G-25 Fraksi 1-10	67
E.2 Sephadex G-25 Fraksi 11-28	67
E.3 Sephadex G-15 Fraksi 1-10	68
E.4 Sephadex G-15 Fraksi 11-28	68
F. Kromatogram KCKT	69
F.1 Standar Xilosa	69
F.2 Standar Xilobiosa	70
F.3 Standar Xilooligosakarida	71
F.4 Sephadex G-25 Fraksi 14-28	72
F.5 Sephadex G-15 Fraksi 11-22	73
G. Perhitungan Kadar Produk Hidrolisis	74
H. Hasil Peremajaan Isolat Bakteri <i>Bacillus sp</i>	75
I. Proses Pemurnian Produk Hidrolisis Endo- β -1,4-D-Xilanase dengan Kromatografi Filtrasi Gel	75

J. Hasil Inkubasi Endo- β -1,4-D-Xilanase dengan Xilan Oat Setelah	
Direaksikan dengan DNS	76
J.1 Endo- β -1,4-D-Xilanase Hasil Fraksinasi Amonium Sulfat 50%	76
J.2 Dialisat Endo- β -1,4-D-Xilanase.....	76