



**PENENTUAN PARAMETER KINETIK ENDO- β -1,4-D-XILANASE
ASAL ABDOMENAL RAYAP DENGAN SUBSTRAT
XILAN *OAT* DAN *BIRCHWOOD***

SKRIPSI

oleh
Linda Faiqotul Himmah
NIM 121810301024

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



**PENENTUAN PARAMETER KINETIK ENDO- β -1,4-D-XILANASE
ASAL ABDOMENAL RAYAP DENGAN SUBSTRAT
XILAN OAT DAN *BIRCHWOOD***

SKRIPSI

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

oleh
Linda Faiqotul Himmah
NIM 121810301024

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

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Lailatul Fitriyah, Ayahanda M. Syair, dan Adikku Nailly, terimakasih telah memberikan doa, cinta, kasih sayang, bimbingan, nasehat dan semangat yang tiada hentinya;
2. Guru-guru di TK Muslimat NU Tempeh Tengah, SD 01 Tempeh Tengah, SMP 01 Tempeh, SMA Tempeh serta dosen-dosen di Jurusan Kimia FMIPA UNEJ yang telah memberikan ilmu dan membimbing dengan penuh kesabaran;
3. Almamater tercinta Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

“Katakanlah, Sesungguhnya shalatku, ibadahku, hidupku, dan matiku hanyalah
untuk Allah Tuhan Semesta Alam.”

(terjemahan Surat *Al-An'am* ayat 162)^{*)}



^{*)} Departemen Agama Proyek Pengabdian Kitab Suci Al-Qur'an. 1975. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Jakarta: PT. Bumi Restu.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Linda Faiqotul Himmah

NIM : 121810301024

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: “Penentuan Parameter Kinetik Endo- β -1,4-D-Xilanase Asal Abdomenal Rayap dengan Substrat Xilan *Oat* dan *Birchwood*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, Mei 2018

Yang menyatakan,



Linda Faiqotul Himmah

NIM 121810301024

SKRIPSI

**Penentuan Parameter Kinetik Endo- β -1,4-D-Xilanase Asal Abdomenal
Rayap dengan Substrat Xilan *Oat* dan *Birchwood***

Oleh

Linda Faiqotul Himmah

NIM 121810301024

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : Tri Mulyono, S.Si., M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Penentuan Parameter Kinetik Endo- β -1,4-D-Xilanase Asal Abdomenal Rayap dengan Substrat Xilan *Oat* dan *Birchwood*” karya Linda Faiqotu! Himmah telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : SELASA 03 JUL 2018

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,



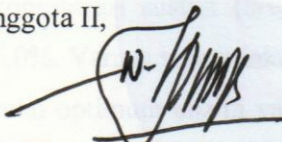
Dr. A. A. Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si.
NIP: 197012251997022001

Anggota I,



Tri Mulyono, S.Si, M.Si.
NIP: 196810201998021002

Anggota II,



drh. Wuryanti Handayani, M.Si
NIP. 196008221985032002

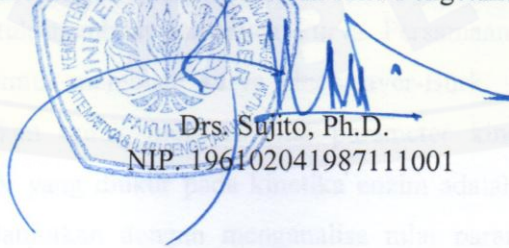
Anggota III,



Dwi Indarti, S.Si, M.Si.
NIP. 197409012000032004

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,




Drs. Sujito, Ph.D.
NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Penentuan Parameter Kinetik Endo- β -1,4-D-Xilanase Asal Abdomenal ayap dengan Substrat Xilan Oat dan Birchwood; Linda Faiqotul Himmah, 121810301024; 2018: 35 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Kinetika enzim merupakan ilmu yang mempelajari tentang mekanisme enzim sebagai katalis untuk menentukan kecepatan reaksi serta perubahan hasil dari parameter (Nelson dan Cox, 2010). Salah satu karakteristik enzim yang diamati ialah penentuan parameter kinetika yang meliputi K_M , k_{Cat} , dan V_{Max} . Enzim yang digunakan dalam penelitian ini yaitu endo- β -1,4-D-xilanase. Enzim ini menghidrolisis ikatan β -1,4-D-xilosida pada xilan untuk menghasilkan xilooligosakarida (XOS). Endo- β -1,4-D-xilanase berasal dari isolat mikroorganisme *Bacillus sp.* yang telah diisolasi dari abdomen rayap. Penelitian ini bertujuan untuk melihat parameter kinetika pada dua jenis xilan komersil yakni xilan *oat* dan *birchwood*.

Penentuan parameter kinetika dimulai dengan produksi dan pemurnian endo- β -1,4-D-xilanase. Enzim yang sudah mengalami pemurnian kemudian digunakan untuk menghidrolisis substrat, yaitu xilan *oat* dan *birchwood*. Variasi konsentrasi substrat (b/v) yang digunakan yaitu 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, dan 1,0%. Variasi waktu inkubasi dilakukan hingga 20 jam dengan interval 4 jam pada suhu optimum enzim yakni 40°C. Penelitian mengenai kinetika enzim dilakukan dengan memonitoring laju awal terbentuknya produk pada larutan dengan konsentrasi enzim tertentu. Laju awal (V_0) dapat dicari dengan persamaan polinomial pada kurva hasil hidrolisis terhadap waktu. Pertimbangan menggunakan persamaan polinomial yaitu meminimalkan kesalahan dalam pemilihan data untuk membuat persamaan kurva. Persamaan ini digunakan untuk mencari nilai V_0 untuk membuat kurva Lineweaver-Burk. Persamaan garis dari kurva ini digunakan untuk mencari nilai parameter kinetika endo- β -1,4-D-xilanase. Parameter yang diukur pada kinetika enzim adalah K_M dan V_{Max} serta k_{Cat} kemudian dilanjutkan dengan menganalisa nilai parameter kinetika yang didapatkan.

Aktivitas enzim yang digunakan untuk mengukur parameter kinetik ini sebesar 0,093 U/ml dengan aktivitas spesifik sebesar 2,04 U/mg. Hasil hidrolisis kedua substrat disajikan dalam bentuk konsentrasi total gula pereduksi. Profil kurva hasil hidrolisis kedua substrat menunjukkan pola yang sama yakni meningkat seiring lamanya waktu inkubasi. Namun mendekati waktu akhir inkubasi menunjukkan penurunan laju pembentukan produk yang ditandai dengan sedikitnya selisih total gula pereduksi yang dihasilkan. Nilai K_M endo- β -1,4-D-xilanase untuk substrat xilan *oat* dan *birchwood* berturut-turut adalah 4,10 mg/ml dan 0,681 mg/ml. Nilai V_{Max} , dan k_{Cat} untuk substrat xilan *oat* sebesar 0,28 mg/ml.jam dan $1,7 \times 10^{-3} s^{-1}$. Sedangkan V_{Max} , dan k_{Cat} untuk substrat *birchwood* yaitu 0,117 mg/U.jam dan $7 \times 10^{-4} s^{-1}$. Berdasarkan hasil nilai parameter kinetika endo- β -1,4-D-xilanase lebih efektif bekerja pada *birchwood* dari pada xilan *oat* berdasarkan nilai K_M dan konstanta spesifiknya.

PRAKATA

Segala puji syukur dipanjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya, sehingga penulisan skripsi yang berjudul “Penentuan Parameter Kinetik Endo- β -1,4-D-Xilanase Asal Abdomenal ayap dengan Substrat Xilan *Oat* dan *Birchwood*” dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan pendidikan program sarjana strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penulisan skripsi ini banyak mendapatkan bantuan moril maupun materil dari berbagai pihak, sehingga ucapan terima kasih disampaikan dengan tulus kepada:

1. Drs. Sujito, Ph.D, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Tri Mulyono, S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran, kasih sayang serta doa dan membimbing dengan penuh kesabaran dalam penulisan skripsi ini;
4. Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si. selaku Dosen Penguji I, drh. Wuryanti Handayani, M.Si. i selaku Dosen Penguji Pengganti I, dan Dwi Indarti, S.Si, M.Si., selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktunya guna menguji serta memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. drh. Wuryanti Handayani, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama menjadi mahasiswa;
6. Bapak dan ibu dosen serta teknisi Jurusan Kimia FMIPA UNEJ yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan;
7. Sahabat-sahabatku, Marena Thalita Rahma, Lailatul Badriyah, Endah Retno Kusumaningsih, serta Reza Dwi Purnama terima kasih atas semangat dan motivasinya;

8. Teman-teman seperjuangan *xylanase group*, Mamluah, Shelly, Angel dan Riza, terimakasih atas saran, kerjasama, dan bantuannya;
9. Teman-teman kosan 45 B, Winda Intan Novalia, Lailatul Hikmah, Vike Putri Ana, Mindarti Sartikasari, Irawati Firdiyansari, Daniar A., dan Atiqah, terimakasih untuk waktu kebersamaan, canda tawa serta semangatnya selama hidup bersama;
10. *Partner in Crime* sekaligus keluarga baru, Dewanti Oktaviani Khoirullah, M. Khan Aldrian, serta Farizki Hermawan, terimakasih untuk waktu kebersamaan serta motivasi yang diberikan,
11. Teman-teman LANTHANIDA angkatan 2012 terimakasih untuk, dukungan, kritik, saran serta pengalaman yang telah diberikan;
12. Semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu;

Segala bentuk kritik dan saran yang bersifat membangun diharapkan dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat terhadap perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang kimia.

Jember, Mei 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Xilan	4
2.2 Endo-β-1,4-D-Xilanase	5
2.3 Kinetika	7
2.4 Spektrofotometer UV-Vis	12
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	15
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.2 Alat dan Bahan	15
3.2.1 Alat.....	15
3.2.2 Bahan.....	15
3.3 Tahapan Penelitian	16
3.4 Prosedur Penelitian	17
3.4.1 Pembuatan Media dan Reagen.....	17
3.4.2 Produksi Endo- β -1,4-D-xilanase.....	19
3.4.3 Penentuan Aktivitas Endo- β -1,4-D-xilanase.....	20
3.4.4 Penentuan Kadar Protein Endo- β -1,4-D-xilanase.....	21

3.4.5 Penentuan K_M dan V_{Max} Endo- β -1,4-D-xilanase.....	23
3.4.6 Penentuan k_{Cat} Endo- β -1,4-D-xilanase	24
3.4.7 Analisis Parameter Kinetika	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Parameter Kinetik Endo-β-1,4-D-xilanase	26
4.1.1 Substrat Xilan <i>Oat</i>	27
4.1.2 Sustrat <i>Birchwood</i>	30
4.2 Kemampuan Endo-β-1,4-D-Xilanase dalam Menghidrolisis Substrat Berdasarkan Parameter Kinetiknya	32
BAB 5. PENUTUP	35
5.1 Kesimpulan	35
5.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	39

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Beberapa mikroorganismen penghasil xilanase	7
4.1 Aktivitas dan kadar protein Enzim Endo- β -1,4-D-xilanase hasil fraksinasi dan dialisat	25
4.2 Nilai $1/[S]$ dan $1/V_0$ untuk substrat xilan <i>oat</i>	29
4.3 Nilai $1/[S]$ dan $1/V_0$ untuk substrat <i>birchwood</i>	31
4.4 Parameter kinetika xilan <i>oat</i> dan <i>birchwood</i>	32

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur xilan dengan substituen berbeda beserta sisi yang dapat dipecah oleh enzim kompleks xilanolitik	4
2.2 Mekanisme umum dari xilanase	6
2.3 Efek dari [S] pada kecepatan reaksi mula-mula pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim	8
2.4 Perubahan konsentrasi reaktan pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim	9
2.5 Kurva Lineweaver-Burk untuk analisis reaksi yang dikatalisis enzim menggunakan mekanisme Michaelis Menten yang menghasilkan <i>slope</i> dan intersep	11
2.6 Skema alat spektrofotometer UV – Vis	14
3.1 Skema Penelitian.....	16
3.2 Kurva pengaruh konsentrasi substrat terhadap waktu.....	24
4.1 Perbedaan warna yang dihasilkan menggunakan metode Miller	26
4.2 Kurva konsentasi substrat xilan <i>oat</i> terhadap waktu (jam)	27
4.3 Grafik Lineweaver-Burk untuk substrat xilan <i>oat</i>	29
4.4 Kurva konsentasi substrat <i>birchwood</i> terhadap waktu (jam)	30
4.5 Grafik Lineweaver-Burk untuk substrat <i>birchwood</i>	31

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Pengenceran Substrat	40
3.2 Faksinasi Ammonium Sulfat	40
4.1 Pengukuran Aktivitas Endo- β -D-Xilanase dengan Metode Miller	42
4.2 Pengukuran Kadar Protein Endo- β -1,4-D-Xilanase dengan Metode Bradford dan Aktivitas Spesifik	45
4.3 Parameter Kinetika Enzim Endo- β -1,4-D-Xilanase	49

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Xilan adalah polisakarida penyusun terbanyak kedua pada dinding sel tanaman yang mempunyai ikatan β -1,4 pada rantai utama yang terdiri dari monomer xilosa. Xilan merupakan heteropolisakarida dengan xilopiranosil sebagai penyusun rantai utama dan substituenya dapat berupa α -arabinofuranosil, o-acetil, dan asam 4-O-metil-D-glukuronik (Puls, 1997 dalam Subramaniyan dan Prema, 2002). Ikatan β -1,4 antara D-xilopiranosil menjadi karakteristik utama dari xilan. Kelimpahan dan jenis ikatan substituenya bisa berbeda bergantung pada sumbernya (Shallom dan Shoham, 2003). Salah satu contoh xilan komersil yang dapat dijumpai ialah xilan *oat dan birchwood*. Xilan *oat* mempunyai komposisi paling banyak yaitu xilosa dan arabinosa sedangkan *birchwood*, sebanyak 94% terdiri dari xilosa dan tidak mengandung arabinosa (Li *et al.*, 2000). Struktur xilan yang besar dan kompleks menyebabkan proses pemecahannya memerlukan beberapa enzim hidrolitik dengan spesifitas pemecahan yang beragam. Enzim hidrolitik yang digunakan untuk memecah xilan menjadi gula penyusunnya biasa disebut sebagai enzim xilanolitik (Beg *et al.*, 2001).

Endoxilanase merupakan salah satu enzim xilanolitik yang bekerja memecah ikatan β -1,4 dalam rantai utama pada kompleks polisakarida xilan pada dinding sel tanaman (Collins *et al.*, 2004). Endoxilanase banyak diproduksi dari mikroorganisme termasuk bakteri dan jamur. Beberapa penelitian isolasi endoxilanase dari bakteri diantaranya *Geotrichum candidum* 3C (Rodionova *et al.*, 2000), *Bacillus subtilis* (Milessi *et al.*, 2015) dan lain sebagainya. Penelitian mengenai endoxilanase yang berasal dari berbagai macam sumber telah dilakukan. Berdasarkan hal tersebut, enzim ini memiliki karakteristik, struktur, aktivitas spesifik, hasil hidrolisis, efisiensi, dan tingkat hidrolisis xilan yang beragam (Knob dan Carmona, 2010). Salah satu karakteristik enzim yang diamati ialah penentuan nilai parameter kinetika (K_M , k_{Cat} , dan V_{Max}). Pemurnian dan karakterisasi endo- β -xilanase dari kelenjar ludah rayap *Macrotermes subhyalinus* mempunyai parameter kinetik berturut – turut yaitu K_M 1,1, mg/ml; V_{Max} 15,61

U/mg dan K_M 1,21 mg/ml; V_{Max} 11,74 U/mg dengan substrat *birchwood* dan *beechwood* (Blei *et al.*, 2011). Parameter kinetik xilanase dari *Bacillus subtilis* dengan substrat *birchwood* xilan berturut-turut K_M , k_{Cat} , dan V_{Max} adalah 1.15 mg/ml, 850 s^{-1} , dan 117.64 U/mg. Data tersebut menunjukkan bahwa endoxilanase juga mempunyai karakterisasi yang berbeda-beda.

Isolasi endoxilanase lainnya telah dilakukan menggunakan isolat mikroba dalam abdomen rayap. Isolasi dan purifikasi endo- β -1,4-D-xilanase dari *Bacillus sp.* asal abdomen rayap memiliki aktivitas sebesar 1,4 U/mg (Masniah, 2015). Karakterisasi pH dan suhu optimum endo- β -1,4-D-xilanase asal mikroorganisme dari abdomen rayap juga telah dilakukan oleh Kurniawan (2015). Hasilnya didapatkan pH dan suhu optimum sebesar 5 dan 40°C . Akan tetapi karakterisasi dari parameter kinetika enzim ini masih belum dipelajari. Berdasarkan hal tersebut akan dilakukan penelitian lanjutan mengenai kinetika enzimatik (K_M , V_{Max} , dan K_{cat}) untuk melengkapi karakterisasi endo- β -1,4-D-xilanase asal mikroorganisme dari abdomen rayap. Penelitian ini menggunakan substrat xilan *oat* dan *birchwood*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan dalam penelitian ini, yaitu :

1. Berapakah parameter kinetik (K_M , V_{Max} , dan k_{Cat}) endo- β -1,4-D-xilanase pada kondisi optimum dengan substrat xilan *oat* dan *birchwood*?
2. Bagaimana kemampuan endo- β -1,4-D-xilanase dalam menghidrolisis xilan *oat* dan *birchwood* berdasarkan nilai parameter kinetika yang telah ditentukan?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini meliputi :

1. Kondisi optimum yang digunakan pada pH 5 dan suhu 40°C
2. Pemurnian digunakan fraksinasi bertingkat 40-50% dan dipisahkan dengan *sentrifuge* pada suhu 4°C dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit

3. Dialisis dilakukan selama 24 jam dengan penggantian *buffer* pada jam ke-2, 4, pada jam ke-2, 4, 6, 12, dan 24 jam di suhu 4°C.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui parameter kinetik (K_M , V_{Max} , dan k_{Cat}) endo- β -1,4-D-xilanase pada kondisi optimum dengan substrat xilan *oat* dan *birchwood*
2. Mengetahui kemampuan endo- β -1,4-D-xilanase dalam menghidrolisis xilan *oat* dan *birchwood* berdasarkan nilai parameter kinetiknya

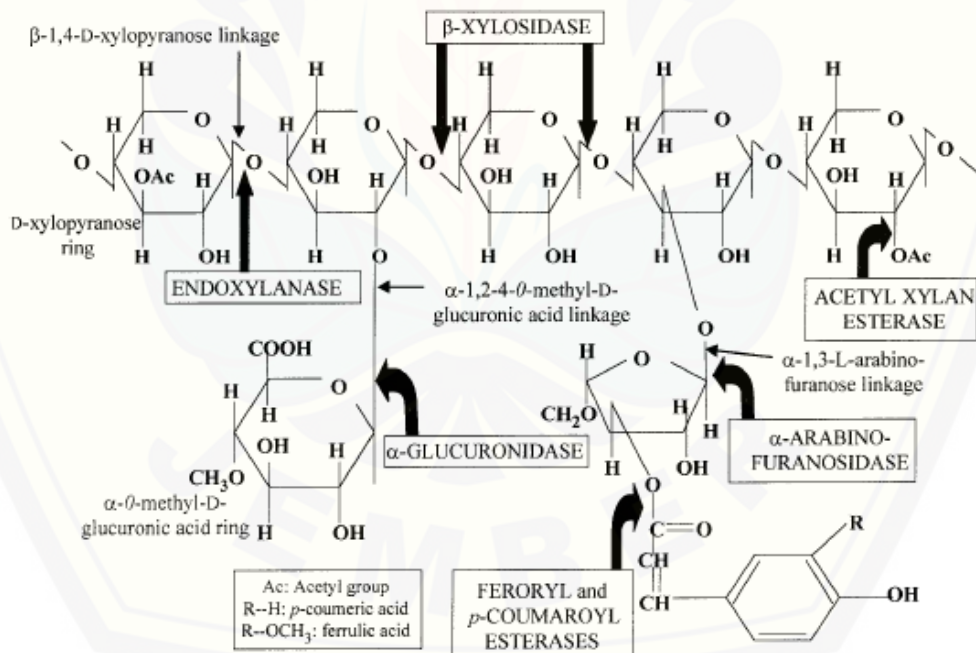
1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian tentang kinetika reaksi enzim ini berguna untuk melengkapi informasi enzim dari penelitian sebelumnya. Penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk menambah informasi tentang karakteristik enzimatik endo- β -1,4-D-xilanase asal mikroorganisme dalam abdomen rayap.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Xilan

Xilan adalah polisakarida penyusun terbanyak kedua pada dinding sel tanaman yang mempunyai ikatan β -1,4 pada xilopiranosil seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1. Pada gambar tersebut xilan merupakan heteropolisakarida dengan xilopiranosil sebagai penyusun rantai utama dan substituenya dapat berupa α -arabinofuranosil, o-acetil, dan asam 4-O-metil-D-glukuronik (Puls, 1997 dalam Subramaniyan dan Prema, 2002). Adanya keberagaman dari penyusun xilan maka untuk menghidrolisis secara sempurna dibutuhkan beberapa enzim kompleks xilanolitik dengan bermacam-macam spesifitas, seperti endoxylanase, β -xilosidase dan lain sebagainya (Beg *et al.*, 2001).



Gambar 2.1 Struktur xilan dengan substituen berbeda beserta sisi yang dapat dipecah oleh enzim kompleks xilanolitik (Beg *et al.*, 2001)

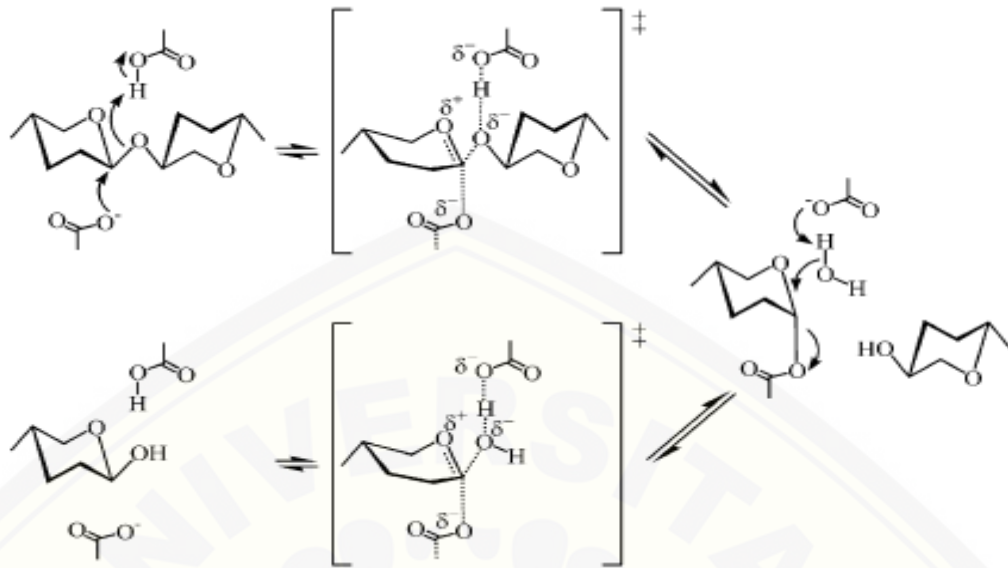
Karakteristik xilan ialah adanya ikatan β -1,4 antara D-xilopiranosil pada rantai utama. Kelimpahan dan jenis ikatan substituenya bisa berbeda bergantung pada sumbernya (Shallom and Shoham, 2003). Hal ini menunjukkan bahwa xilan

mempunyai polidiversiti (berat molekul) dan polimolekulariti yang besar. Jenis xilan yang utama pada *softwood* yaitu arabino-4-O-metil glukuronoxilan yang mendapat penambahan asam 4-O-metil glucuronik dan tersubstitusi dengan α -arabinofuranosida pada ikatan α -1, 3 dengan rantai utama xilan. Perbandingan dari grup substituen arabinose dengan grup xilosa yaitu 1:8 (Subramaniyan and Prema, 2002).

Jenis xilan yang dijual komersil ialah *birchwood*, *beechwood*, dan xilan *oat*. *Birchwood* mengandung 94,1% xilosa, kemudian sebesar 4,5% galaktosa dan sisanya berupa glukosa (Li *et al.*, 2000). Karakteristik (komposisi dan sifat) xilan dari asal-usul yang berbeda juga diselidiki oleh Hespell dan Cotta pada tahun 1995. *Birchwood* yang diteliti mengandung lebih dari 90% larut dalam air dan terdiri dari prosentase tinggi gula netral (87,7% terutama residu xilosa, sejumlah kecil glukosa, arabinosa, dan galaktosa) dan asam heksuronik 10,2%. Perbandingan gula pada *beechwood* sebanding dengan *birchwood*, hanya berbeda pada kandungan asam heksuronatnya (kurang dari 3% pada *beechwood*) dan dalam kelarutannya. *Beechwood* mempunyai kelarutan kurang lebih 15% dalam air. Xilan *oat* mempunyai prosentase tinggi xilosa (84%) dan beberapa arabinosa, glukosa, dan galaktosa. Selain itu kelarutan dalam air sangat bervariasi tergantung pada suhu dan tingkat sentrifugasi (Moraïs *et al.*, 2010).

2.2 Endo- β -1,4-D-Xilanase

Xilanase dapat digolongkan menjadi dua keluarga yaitu F (famili 10) dan G (famili 11), berdasarkan pada analisis *cluster hydrophobic* dan analisis homologinya. Keluarga F xilanase mempunyai massa molekul mendekati 35 kDa. Sedangkan keluarga G xilanase mempunyai massa molekul sebesar 20 kDa (Krengel and Dijkstra, 1996). Enzim ini tergolong pada kelas hidrolase. Klasifikasi ini dibagi berdasarkan reaksi yang dikatalisis. Enzim hidrolase merupakan enzim yang mengkatalisa reaksi pemindahan gugus fungsional ke air (reaksi hidrolisis) yang ditunjukkan pada Gambar 2.2 (Nelson dan Cox, 2010).



Gambar 2.2 Mekanisme umum dari xilanase (Collinset *al.*, 2005)

Mekanisme katalitik ini terjadi pada family 10 dan 11. Gugus asam karbosilat terletak pada sisi aktif. Pada fase intermediet, salah satu dari asam karboksilat bertindak sebagai katalis asam yang memprotonasi substrat. Asam yang lainnya bertindak sebagai nukleofil membentuk intermediet α -glikosil enzim (inversi $\beta \rightarrow \alpha$). Langkah kedua adalah gugus karboksilat yang dihasilkan pada langkah pertama akan berperan sebagai basa yang akan menarik proton dari molekul air yang berperan sebagai nukleofilik. Tahapan kedua ini akan menghasilkan ion oksokarbenium kembali untuk meningkatkan produk dengan konfigurasi β (Inversi $\alpha \rightarrow \beta$). Hasil ini merupakan keseluruhan dari mekanisme retensi (Gambar 2.2) (Collins *et al.*, 2005).

Xilanase umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme. Jenis yang paling banyak diteliti yaitu pada jamur dan bakteri (Subramaniyan dan Prema, 2002). Contoh beberapa mikroorganisme penghasil xilanase disajikan dalam Tabel 2.1. xilanase juga dapat diproduksi dari tanaman, contohnya endoxilanase dari gandum eropa (*Triticum aestivum*) dengan berat molekul 55 kDa (Subramaniyan dan Prema, 2002).

Tabel 2.1 Beberapa mikroorganisme penghasil xilanase

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

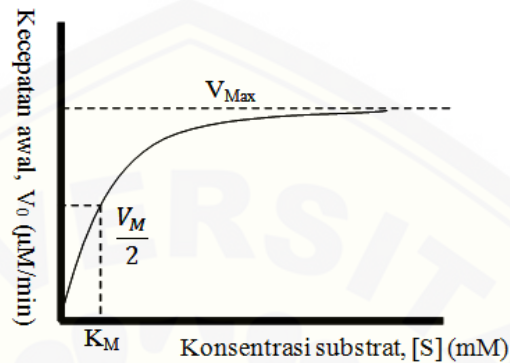
Sumber: Sunna dan Atraniklan (1997) dalam Richana *et al.* (2008)

2.3 Kinetika enzim

Enzim merupakan katalis biologi yang homogen. Enzim terdiri dari protein atau asam nukleotida yang mempunyai sisi aktif. Sisi aktif ini nantinya akan mengikat substrat (dalam hal ini reaktan) dan memprosesnya membentuk produk (Atkins dan Paula, 2010). Ilmu yang mempelajari tentang mekanisme enzim sebagai katalis untuk menentukan kecepatan reaksi serta perubahan hasil dari parameter disebut dengan kinetika enzim. Penelitian mengenai kinetika enzim dilakukan dengan memonitoring laju awal terbentuknya produk pada larutan dengan konsentrasi enzim yang rendah (Nelson dan Cox, 2010).

Salah satu yang diukur dalam kinetika enzim yaitu kecepatan awal, V_0 , dimana konsentrasi substrat, $[S]$ lebih besar dari konsentrasi enzim, $[E]$. Leonor Michaelis dan Maud Menten pada tahun 1913 melakukan penelitian mengenai hubungan antara konsentrasi substrat dan kecepatan enzim yang bereaksi dengan produk yang terbentuk pada reaksi tersebut (Kaarp, 2010). Kecepatan awal (pada 60 detik atau kurang), $[S]$ berkurang sangat kecil sehingga dianggap konstan. V_0

dapat diteliti dengan memvariasikan [S] dengan [E] yang tetap. Hubungan antara [S] dengan [E] dapat dilihat dalam Gambar 2.3. Nilai V_0 semakin meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi substrat sehingga membentuk linieritas. Kecepatan maksimum yang didapatkan disebut V_{Max} (Nelson dan Cox, 2010).



Gambar 2.3 Efek dari [S] pada kecepatan reaksi mula – mula pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim (Nelson dan Cox, 2010)

Konstanta Michaelis Menten (K_M) juga dapat ditentukan dari grafik selain V_{Max} . Titik K_M saat konsentrasi substrat pada setengah V_{Max} . Hubungan antara K_M dan V_{Max} dapat digambarkan dalam persamaan persamaan (2.1)

$$v = V_{Max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \dots\dots\dots (2.1)$$

Keterangan:

v : Kecepatan reaksi

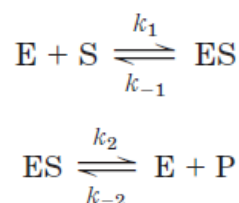
V_{Max} : Kecepatan maksimum

[S] : Konsentrasi substrat

K_M : Konstanta Michaelis

(Kaarp, 2010).

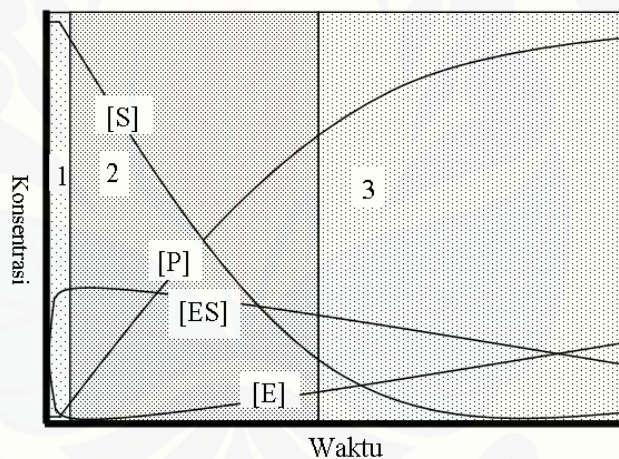
Michaelis – Menten menguraikan dua tahapan, yaitu terbentuknya kompleks substrat enzim dan kompleks enzim-substrat yang memecah membentuk produk. Reaksinya sebagai berikut,



(Nelson dan Cox, 2010).

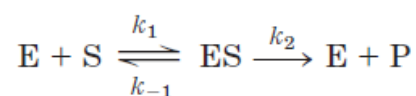
Ada tiga fase pada reaksi enzim yang dikatalisis oleh enzim yang disajikan dalam Gambar 2.4. Berikut penjelasannya:

- Keadaan *pre-steady state* terjadi ketika substrat dan enzim pertama kali dicampurkan dimana kompleks enzim-substrat, [ES] belum terbentuk. Pada fase ini reaksi balik kecepatannya rendah, dimana k_1 lebih besar dari k_{-1} (Nelson dan Cox, 2010).
- Pada fase medium, kecepatan balik mencapai maksimum. Hal ini berakibat dengan jumlah kompleks enzim substrat atau [ES] akan mendekati konstan. Fase ini disebut juga dengan keadaan *steady state* (Bisswanger, 2002).
- Fase terakhir ditentukan oleh berkurangnya [ES] karena berkurangnya substrat dan berkurangnya reaksi balik akhirnya nol. Fase ini ditandai dengan dihasilkannya produk (Bisswanger, 2002).



Gambar 2.4 Perubahan konsentrasi reaktan pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim. (1) *pre-steady state*, (2) *steady state*, (3) penurunan [S] (Bisswanger, 2002).

Penjelasan logis mengenai persamaan Michaelis Menten dikenalkan oleh oleh Briggs dan Haldane. Pendekatan ini dinamakan asumsi *steady state*. Pada awal reaksi, E direaksikan dengan [S] sehingga menghasilkan [ES]. Konsentrasi produk, [P] pada awal reaksi belum terbentuk sehingga reaksi balik yaitu $P \rightarrow S$ dapat diabaikan (k_{-2}). Reaksinya menjadi,



(Nelson dan Cox, 2010).

Variasi waktu untuk setiap reaktan dapat didiskripsikan dengan persamaan diferensial berikut ini,

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \dots\dots\dots(2.2)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES] \dots\dots\dots(2.3)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] \dots\dots\dots(2.4)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = v \dots\dots\dots(2.5)$$

(Bisswanger, 2002).

Pendekatan *steady state* mengasumsikan bahwa reaksi berada pada kesetimbangan. Akibatnya kompleks [ES], pengurangan [S], dan pembentukan produk membentuk linier, orde ke nol. [ES] diasumsikan menjadi nol, sehingga persamaan (2.3) menjadi

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$

$$k_1[S][E] = (k_{-1} + k_2)[ES] \dots\dots\dots(2.6)$$

Asumsinya bahwa $[E]_0 = [E] + [ES]$

$$k_1[S]([E]_0 - [ES]) = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$k_1[S][E]_0 = (k_{-1} + k_2)[ES] + k_1[S][ES]$$

$$[ES] = \frac{k_1}{(k_{-1} + k_2 + k_1[S])} [S][E]_0$$

$$[ES] = \frac{1}{\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]\right)} [S][E]_0 \dots\dots\dots(2.7)$$

sehingga persamaan (2.6) disubstitusikan ke dalam (2.4) sehingga menjadi

$$v = k_2[ES]$$

$$v = k_2 \frac{1}{\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]\right)} [S][E]_0$$

$$v = \frac{1}{\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]\right)} k_2 [S][E]_0$$

$$v = \frac{1}{(K_M + [S])} k_2 [S][E]_0 \dots\dots\dots(2.8)$$

Konsentrasi substrat pada persamaan diatas diasumsikan sama dengan konsentrasi substrat mula-mula $[S] = [S]_0$ (Bisswanger, 2002).

Persamaan (2.7) sesuai dengan percobaan yang ditunjukkan pada Gambar 2.5

- a. Ketika $[S]_0 \ll K_M$, sehingga laju reaksi $[S]_0$

$$v = \frac{1}{(K_M + [S])} k_2 [S]_0 [E]_0 \dots \dots \dots (2.9)$$

- b. Ketika $[S]_0 \gg K_M$, maka laju reaksi mencapai maksimum dan tidak bergantung pada $[S]_0$, sehingga

$$v = V_{Max} = k_2 [E]_0 \dots \dots \dots (2.10)$$

Definisi dari V_{Max} disubstitusikan ke dalam persamaan (2.7) menjadi

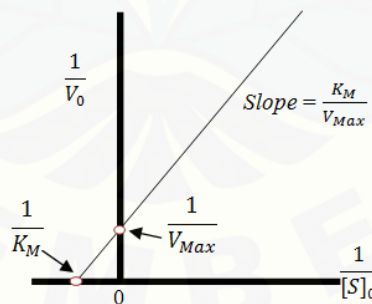
$$v = \frac{V_{Max}}{(K_M + [S])} [S]_0$$

$$v = \frac{V_{Max}}{\left(\frac{K_M}{[S]_0} + 1\right)} \dots \dots \dots (2.11)$$

Persamaan (2.10) dapat disusun ulang untuk analisis regresi linier, menjadi

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{Max}} + \left(\frac{K_M}{V_{Max}}\right) \frac{1}{[S]_0} \dots \dots \dots (2.12)$$

Persamaan 2.12 ini kemudian digunakan untuk mencari nilai K_M dan V_{Max} dalam kurva Lineweaver-Burk yang ditunjukkan pada Gambar 2.5. Pada kurva tersebut, dimana $\frac{1}{[S]}$ sebagai sumbu x dan $\frac{1}{v}$ sebagai sumbu y (Atkins dan Paula, 2010).



Gambar 2.5 Kurva Lineweaver-Burk untuk analisis reaksi yang dikatalisis enzim menggunakan mekanisme Michaelis Menten yang menghasilkan slope dan intersep (Atkins, 2010).

Kostanta katalitik, k_{Cat} merupakan jumlah siklus katalitik yang dilakukan oleh sisi aktif untuk menghasilkan produk dalam waktu tertentu. Konstanta ini memiliki kesamaan dengan k_2 dalam mekanisme Michaelis Menten. k_2 merupakan konstanta untuk menghasilkan produk dari kompleks $[ES]$ atau bisa disebut

dengan konstanta desosiasi. Berdasarkan hal tersebut maka persamaan (2.11) menjadi,

$$k_{cat} = k_2 = \frac{V_{max}}{[E]_0} \dots\dots\dots (2.13)$$

(Atkins, 2010).

2.4 Spektrofotometer UV – Vis

Metode pengukuran spektroskopi didasarkan pada pengukuran sejumlah radiasi yang dihasilkan atau diserap oleh molekul. Radiasi yang dimaksud disini yaitu radiasi elektromagnetik. Radiasi elektromagnetik adalah sebuah bentuk energi yang ditransmisi pada sebuah ruang dengan kecepatan tinggi. Pengertian lainnya yaitu sebuah gelombang yang mempunyai karakteristik yang sama dengan partikelseperti panjang gelombang, frekuensi, amplitudo, dll (Kennedy,1990).

Radiasi elektromagnetik membentuk paket-paket energi (foton). Energi dari foton dapat dihitung menggunakan ketetapan Plank dengan symbol h , yaitu

$$E = h \cdot \nu \dots\dots\dots (2.14)$$

(Kennedy,1990).

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \dots\dots\dots (2.15)$$

Jika persamaan (2.13) dan (2.14) digabungkan maka

$$E = \frac{h \times c}{\lambda} \dots\dots\dots (2.16)$$

Dimana,

E : energi (joule)

h : tetapan Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ joule.s)

c : kecepatan cahaya ($2,9998 \times 10^8$ m⁻¹)

λ : panjang gelombang (nm)

(Gandjar dan Rohman, 2012).

Keterangan di atas menegaskan bahwa foton mempunyai energi tertentu dan tidak sembarang. Kuantitas energi ini menentukan suatu molekul menyerap atau meneruskan cahaya (Day dan Underwood, 1986). Suatu molekul yang bergerak dari suatu tingkat energi ke tingkat energi yang lebih rendah maka

beberapa energi akan dilepaskan. Perpindahan sebaliknya menyebabkan penyerapan energi oleh molekul (Gandjar dan Rohman, 2012). Secara sistematis pernyataan tersebut diekspresikan oleh persamaan (2.13).

Proses eksitasi molekul terdiri dari dua tahap, yaitu:

Tahap1 : $M + hv \dots\dots\dots M^+$

Tahap 2 : $M^+ \dots\dots\dots M + \text{energi (panas)}$

Proses eksitasi pada absorpsi sinar UV dan Vis umumnya menghasilkan eksitasi elektron ikatan (*bonding*), sehingga menghasilkan absorpsi maksimum (Bintang, 2010). Hal ini berakibat panjang gelombang yang diperoleh dapat dihubungkan dengan ikatan yang ada dalam molekul (Gandjar dan Rohman, 2012).

Hukum Lambert menyatakan bahwa setiap lapisan dengan ketebalan yang sama akan menyerap sejumlah fraksi yang sama dari energi radiasi yang melewatinya. Perumusannya yaitu

$$\frac{I}{I_0} = T \dots\dots\dots (2.17)$$

Keterangan:

I : radiasi yang dipancarkan

I_0 : radiasi yang datang

T : transmisi

(Bintang, 2010).

Hukum Lambert-Beer juga menyatakan bahwa konsentrasi larutan berbanding langsung dengan nilai serapan cahaya (absorban). Hukum ini berlaku bagi sinar cahaya dengan panjang gelombang tunggal (monokromatik). Persamaan Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{100}{T} = a \times b \times c \dots\dots\dots (2.18)$$

Keterangan:

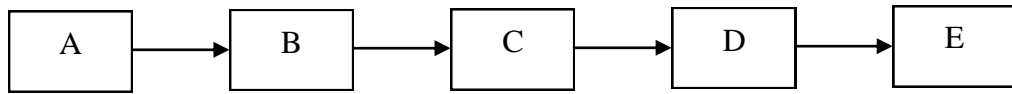
A : absorban

a : konstanta absorptivitas ($M^{-1}cm^{-1}$)

b : tebal kuvet (cm)

c : konsentrasi

(Bintang, 2010).



(a). Sumber cahaya; (b). Monokromator; (c). Wadah sampel; (d). Detektor; (e). Rekorder

Gambar 2. 6 Skema alat spektrofotometer UV – Vis (Gandjar dan Rohman, 2012)

Instrumentasi spektrofotometer UV-Vis terdiri dari 5 macam yang disajikan dalam Gambar 2.6. Berikut penjelasan mengenai fungsi setiap bagiannya,

- a. Sumber lampu. Lampu deuterium biasa digunakan di daerah UV-Vis pada panjang gelombang 190-350 nm, sementara lampu tungsten digunakan untuk daerah visible (panjang gelombang 350-900 nm) (Gandjar dan Rohman, 2012).
- b. Monokromator. Radiasi dari lampu difokuskan ke celah masuk lalu disesejarkan dengan media pendispersi (umumnya berupa prisma). Berbagai spectrum data dihasilkan dengan memutar prisma dan diteruskan ke sampel (Day dan Underwood, 1986).
- c. Wadah sampel disebut kuvet atau sel. Kuvet terbuat dari kuarsa, baik untuk spektroskopi ultraviolet atau sinar tampak. Panjang sel umumnya 1 cm dan ketebalannya kuran dari 1mm (Bintan, 2010).
- d. Detektor diharapkan mempunyai kepekaan yang tinggi, waktu respon yang cepat, dan kestabilan tinggi. Ada dua macam detektor yaitu detektor panas dan foton (Day dan Underwood, 1986).
- e. Rekorder dapat berupa galvanometer, pena pencatat, potensiometer, dan pencatat digital. Sinyal dari rekorder umumnya diperkuat lalu direkam (Bintan, 2010).

BAB 3. METODOLOGI PERCOBAAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di laboratorium *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan Februari sampai Desember 2017.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari peralatan gelas, non gelas dan instrumen. Peralatan yang termasuk dalam peralatan gelas meliputi gelas ukur, pipet mohr, pipet tetes, gelas kimia, pengaduk gelas, corong, labu ukur, gelas ukur, dan erlenmeyer.

Peralatan non gelas yaitu eppendrof, spatula logam, botol semprot, mikropipet dan tip, kawat ose, dan *ball* pipet. Peralatan instrumentasi seperti *Laminar Air Flow* (LAF), *sentrifuge*, stirer magnetik, *autoclave*, *water bath*, lemari pendingin, *shaker incubator*, *incubator*, *vortex*, spektrofotometer Hitachi U-2900, pH meter, dan kuvet.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini digolongkan menjadi bahan kimia dan bahan pendukung.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, xilan *oat* (Sigma), *birchwood* (Sigma), triptofan (Oxoid), *bacto* agar (Oxoid), *yeast* (BD Co.), NaCl (natrium klorida, E-Merck), BSA (*Bovine Serum Albumin*, E-Merck), Na₂HPO₄ (dinatrium fosfat, E-Merck), C₆H₈O₇.H₂O (asam sitrat, E-Merck), NaOH (natrium hidroksida, E-Merck), C₄H₄KNaO₆.4H₂O (KNaTartrat, E-Merck), asam 3,5-dinitrosalisilat (E-Merck), C₆H₅OH (fenol, E-Merck), Na₂SO₃ (natrium sulfit, E-Merck), C₂H₅OH 95% (etanol, E-Merck), H₃PO₄ 85% (asam fosfat, E-Merck), CBB (*Coomassie Brilliant Blue*, E-Merck), (NH₄)₂SO₄ (ammonium sulfat, E-Merck), kantong dialisis (Elkay).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Media dan Reagen

a. Pembuatan Media (Luria Bertani) LB

Komposisi dari media LB yaitu 0,25 gram triptofan; 0,125 gram *yeast*; 0,5 gram *bacto* agar; dan 0,5 gram NaCl dimasukkan dalam erlenmeyer 50 ml kemudian ditambahkan 25 ml akuades. Erlenmeyer ditutup dengan kasa dan kapas. Campuran kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 30 menit menggunakan *autoclave*. Media kemudian dituangkan dalam cawan petri dalam keadaan hangat. Penuangan dilakukan dalam *Laminar Aer Flow* (LAF) kemudian didiamkan hingga memadat lalu disimpan dalam lemari pendingin.

b. Pembuatan Media Inokulum Cair

Media inokulum cair mempunyai komposisi 0,25 gram triptofan; 0,125 gram *yeast*; 0,25 gram NaCl; dan 0,125 gram xilan oat yang dimasukkan dalam erlenmeyer 50 ml kemudian ditambahkan 25 ml akuades. Campuran kemudian dituangkan pada tabung reaksi masing-masing 5 ml yang ditutup dengan kasa dan kapas. Media kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 30 menit menggunakan *autoclave*. Campuran didinginkan hingga sama dengan suhu ruang lalu disimpan dalam lemari pendingin.

c. Pembuatan Media Produksi

Media produksi dibuat dengan mencampurkan 0,5 gram triptofan; 0,5 gram NaCl; dan 0,25 gram *yeast* kemudian dilarutkan dalam 50 ml akuades pada erlenmeyer 100 ml. Erlenmeyer ditutup rapat dengan kasa serta kapas. Media kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* selama 30 menit pada suhu 121°C.

d. Pembuatan Larutan Buffer Sitrat Fosfat (Deutsher, 1990)

Larutan buffer sitrat-fosfat pH 5 dibuat dengan mencampurkan 243 ml larutan asam sitrat 0,1 M dan 257 ml larutan dinitrogen fosfat 0,24 M dalam labu ukur 1000 ml. Kemudian ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas. Larutan asam sitrat 0,1 M dibuat dengan melarutkan 9,605 gram asam sitrat (monohidrat) dengan akuades sampai 500 ml. Larutan fosfat 0,24 M dibuat dengan melarutkan sebanyak 17,79 gram Na₂HPO₄ pada akuades sampai 500 ml. Pengukuran pH larutan buffer dilakukan dengan menggunakan pH meter.

e. Pembuatan Reagen Miller (Miller, 1959)

Reagen miller dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 1 gram NaOH ke dalam 60 ml akuades, kemudian ditambahkan 18,2 gram KNa Tartarat. Campuran yang sudah larut sempurna lalu ditambahkan 1 gram asam 3,5-dinitrosalisilat. Langkah selanjutnya ditambahkan 0,05 gram Na_2SO_3 hingga larut. Selanjutnya ditambahkan 0,2 gram fenol. Kemudian ke dalam campuran ditambahkan akuades hingga 100 ml. Campuran ini dibuat di labu ukur 100 ml yang dibungkus aluminium foil untuk menghalangi paparan cahaya matahari.

f. Pembuatan Reagen Bradford (Bollag dan Edelstein, 1996)

Pembuatan reagen Bradford dibuat dari 2 jenis larutan yaitu larutan stok dan larutan kerja. Larutan stok dibuat dengan melarutkan sebanyak 350 mg CBB dalam campuran 100 ml etanol 95% dan 200 ml H_3PO_4 85% kemudian disimpan pada suhu ruang. Larutan kerja dibuat dengan mencampurkan 30 ml larutan stok dengan 15 ml etanol 95% dan 30 ml H_3PO_4 85% pada labu ukur 500 ml kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Larutan ini disimpan pada botol kaca gelap di suhu ruang. Larutan ini dapat digunakan selama beberapa minggu dengan dilakukan penyaringan setiap kali akan digunakan.

g. Pembuatan Larutan BSA

Larutan standar BSA dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 5 mg padatan BSA dengan buffer Sitrat-Fosfat sampai volume menjadi 5 ml. Konsentrasi induk BSA yang diperoleh adalah 1 mg/ml. Kemudian diencerkan menjadi berbagai konsentrasi yaitu 0,025 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,075 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,15 mg/ml; 0,175 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,225 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,275 mg/ml; dan 0,3 mg/ml.

h. Pembuatan Larutan Xilosa

Larutan standar xilosa dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 5 mg padatan xilosa dengan buffer sitrat-fosfat sampai volume menjadi 5 ml. Konsentrasi stok xilosa yang diperoleh adalah 1 mg/ml. Larutan kemudian diencerkan menjadi 0,07 mg/ml; 0,12 mg/ml; 0,17 mg/ml; 0,22 mg/ml; 0,27 mg/ml; dan 0,32 mg/ml.

i. Pembuatan Larutan Substrat (*Xilan oat* dan *Birchwood*)

Larutan xilan *oat* dibuat dengan cara melarutkan bubuk xilan *oat* sebanyak 0,12 gram dengan buffer sitrat-fosfat sampai volume larutan menjadi 10 ml. Konsentrasi larutan yang diperoleh adalah 1,2%. Larutan ini kemudian diencerkan menjadi 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8%; dan 1,0%. Prosedur yang sama juga dilakukan untuk pembuatan larutan *birchwood* (lihat Lampiran 3.1).

3.4.2 Produksi endo- β -1,4-D-xilanase

Produksi endo- β -1,4-D-xilanase dilakukan dengan empat tahap, yaitu peremajaan dan inokulasi bakteri pensекреksi endo- β -1,4-D-xilanase, produksi dan isolasi endo- β -1,4-D-xilanase, pemurnian endo- β -1,4-D-xilanase, dan penentuan aktivitas dan kadar protein endo- β -1,4-D-xilanase.

a. Peremajaan dan Inokulasi Bakteri Pensекреksi Endo- β -1,4-D-xilanase

Peremajaan bakteri yang menghasilkan endo- β -1,4-D-xilanase dilakukan pada media luria bertani (LB) padat. Media LB kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Inokulasi bakteri dilakukan dengan mencampurkan 1 *loop* kawat ose koloni bakteri penghasil enzim endo- β -1,4-D-xilanase pada media LB padat ke media inokulum cair. Media kemudian digojok menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C selama 16 jam.

b. Produksi dan Isolasi Endo- β -1,4-D-xilanase

Produksi endo- β -1,4-D-xilanase dilakukan di media produksi. Hasil inokulasi pada media cair diambil sebanyak 500 μ L, kemudian dimasukkan ke 50 ml media produksi dalam erlenmeyer 100 ml. Media digojok pada suhu 37°C selama 16 jam menggunakan *shaker* kecepatan 150 rpm. Hasil yang didapat kemudian disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm pada suhu 25°C selama 20 menit. Proses ini menghasilkan supernatan dan pelet. Supernatan disimpan dan diuji aktivitas enzim dan kadar proteinnya. Hasil dari proses ini disebut dengan ekstrak kasar endo- β -1,4-D-xilanase.

c. Pemurnian Endo- β -1,4-D-xilanase

Tahap pemurnian ekstrak kasar enzim dilakukan dengan fraksinasi amonium sulfat dan dialisis. Fraksinasi amonium sulfat yang dipakai ialah fraksinasi bertingkat yaitu 40-50%. Fraksinasi 0-40% dilakukan dengan mencampurkan

ekstrak kasar endo- β -1,4-D-xilanase dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebanyak 10,848 gram dicampurkan ke dalam 48 ml ekstrak kasar. Campuran diaduk menggunakan *stirer* hingga $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ larut. Campuran kemudian digojok dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dengan suhu 4°C sehingga didapatkan pelet dan supernatan. Pelet yang berada di bawah dipisahkan dengan supernatan berada di atas campuran. Tahap selanjutnya yaitu fraksinasi 40-50%. Tahap ini membutuhkan 2,9 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ untuk 50 ml ekstrak kasar (Lampiran 3.2). Prosedur yang sama dilakukan seperti fraksinasi 0-40%. Langkah selanjutnya setelah campuran dipisahkan dengan sentrifugasi, pelet dipisahkan. Pelet kemudian dilarutkan dalam 24 ml *buffer* sitrat-fosfat pH 5 dan ditentukan aktivitas enzim serta kadar proteinnya.

Pemurnian enzim menggunakan dialisis dilakukan pada suhu 4°C. Enzim sebanyak 24 ml dimasukkan dalam kantung dialisis yang dicelupkan dalam beaker gelas berisi 250 ml *buffer* sitrat-fosfat. Larutan *buffer* diganti pada jam ke-2, 4, 6 dan 12 selama 24 jam. Endo- β -1,4-D-xilanase ditentukan aktivitas enzim dan kadar proteinnya (Dewanti, 2016).

3.4.3 Penentuan Aktivitas Endo- β -1,4-D-xilanase

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

a. Pembuatan kurva standar xilosa

Kurva standar xilosa dapat diperoleh dengan menyiapkan larutan standar xilosa yang diperoleh dari pengenceran larutan induk yang diperoleh dari prosedur 3.4.1 poin h. Larutan standar xilosa masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 250 μl , kemudian dicampurkan dengan reagen miller sebanyak 750 μl . Campuran kemudian dipanaskan selama 15 menit pada air mendidih dan didinginkan pada air es selama 20 menit lalu diukur absoransinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Pembuatan kurva standar xilosa dibuat dengan membuat grafik x dan y dimana x merupakan konsentrasi larutan standar xilosa

dan y merupakan absorbansi dengan persamaan kurva $y = 3,41x + 0,277$. Blanko yang digunakan ialah akuades yang diperlakukan sama dengan sampel.

b. Pengujian enzim Endo- β -1,4-xilanase

Aktivitas enzim dilakukan dengan mencampurkan 125 μ l Endo- β -1,4-D-xilanase dan xilan oat 0,8% (b/v) dalam *buffer* sitrat-fosfat 125 μ l. Campuran diinkubasi pada suhu 40°C selama 60 menit, kemudian ditambahkan reagen Miller sebanyak 750 μ l. Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit, didinginkan dalam air es 20 menit, dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Tahap ini menggunakan kontrol sebagai pembanding. Kontrol yang digunakan adalah enzim inaktif yang dipanaskan dalam air mendidih selama 1 jam dan diberi perlakuan sama dengan sampel. Larutan standar yang digunakan adalah larutan standar xilosa dengan konsentrasi yang berbeda. Aktivitas enzim dapat ditentukan melalui persamaan 3.1.

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

Keterangan,

[s] : konsentrasi sampel (mg/ml)

[k] : konsentrasi kontrol (mg/ml)

F_p : Faktor pengenceran

V_t : volume total (μ L)

V_e : volume enzim (μ L)

t : waktu hidrolisis substrat oleh enzim (menit)

BM : berat molekul xilosa (g/mol)

(Miller, 1959 dalam Ratnadewi dan Handayani , 2013).

3.4.4 Penentuan Kadar Protein Endo- β -1,4-D-xilanase

a. Pembuatan kurva standar BSA

Larutan standar BSA yang digunakan terdapat beberapa dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 0,025-0,3 mg/ml dengan interval konsentrasi 0,025 mg/ml yang diperoleh dari prosedur 3.4.1 poin g. Larutan standar BSA diambil sebanyak 100 μ L dan dicampurkan dengan 1 ml reagen. Campuran dikocok dengan *vortex*

lalu didiamkan selama 2-5 menit kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi yang diperoleh kemudian digunakan untuk membuat kurva standar. Konsentrasi BSA sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y. Persamaan regresi yang diperoleh dari kurva yaitu $y = 3,236x + 0,034$. Blanko yang digunakan ialah *buffer* sitrat-fosfat yang diperlakukan sama dengan sampel. Persamaan regresi inilah dapat digunakan untuk menentukan kadar protein pada endo- β -1,4-D-xilanase.

b. Penentuan kadar protein endo- β -1,4-D-xilanase

Penentuan kadar protein berdasarkan metode Bradford (Bollag dan Edelsteind., 1996). Penentuan kadar protein didahului dengan menentukan konsentrasi BSA enzim dan kontrol. Sebanyak 100 μ L enzim dicampurkan dengan 1 ml reagen Bradford. Campuran kemudian diberi perlakuan sama seperti prosedur 3.4.4 poin a. Konsentrasi BSA enzim dan kontrol dapat dihitung dengan menggunakan persamaan 3.2.

$$[\text{BSA}] (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}) = \frac{\text{abs} \pm C}{m} \dots\dots\dots (3.2)$$

Keterangan,

[BSA] : konsentrasi BSA

Abs : absorbansi pada panjang gelombang 595 nm

C : nilai *intercept* dari persamaan kurva standar BSA

m : nilai *gradient* dari persamaan kurva standar BSA

Langkah selanjutnya yaitu ditentukan kadar protein enzim sesuai dengan persamaan 3.3

$$\text{Kadar protein} (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}) = [\text{BSA}] \text{ sampel} - [\text{BSA}] \text{ kontrol} \dots\dots\dots (3.3)$$

c. Penentuan *yield* endo- β -1,4-D-xilanase

Yield merupakan perbandingan kadar protein yang diperoleh dengan kadar protein sebelumnya yang ditampilkan dalam bentuk prosentase. Kadar protein yang dibuat pembanding yakni kadar protein ekstrak kasar, yakni hasil pemurnian dari enzim pada tahap pertama. Nilai *yield* dapat diperoleh menggunakan persamaan 3.4 dan 3.5.

$$\text{K.P.T} (\text{mg}) = \text{Kadar Protein} (\text{mg/ml}) \times \text{Volume} (\text{ml}) \dots\dots\dots (3.4)$$

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{K.P.T yang diukur (mg)}}{\text{K.P.T ekstrak kasar (mg)}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.5)$$

Keterangan,

K.P.T : kadar protein total (mg)

d. Penentuan aktivitas spesifik endo- β -1,4-D-xilanase

Aktivitas spesifik merupakan perbandingan aktivitas enzim per kadar protein enzim yang diperoleh. Nilai ini dapat dihitung dengan persamaan 3.6

$$\text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas Enzim (U/ml)}}{\text{Kadar Protein (mg/ml)}} \dots\dots\dots(3.6)$$

e. Penentuan faktor kemurnian endo- β -1,4-D-xilanase

Nilai faktor kemurnian menunjukkan perbandingan nilai aktivitas spesifik yang diperoleh dengan aktifitas spesifik sebelumnya. pembanding yang digunakan yakni nilai aktifitas spesifik dari ekstrak kasar. Nilai faktor kemurnian dapat diperoleh menggunakan persamaan 3.7

$$\text{Faktor Kemurnian} = \frac{\text{Aktiitas Spesifik yang diukur (U/mg)}}{\text{Aktiitas Spesifik ekstrak kasar (Umg)}} \dots\dots\dots(3.7)$$

3.4.5 Penentuan K_M dan V_{Max} Endo- β -1,4-D-xilanase

Studi kinetika dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat xilan dan waktu inkubasi. Konsentrasi substrat xilan yang digunakan 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8%; 1,0%; dan 1,2%. Variasi waktu inkubasi yang digunakan untuk setiap konsentrasi substrat yaitu 0 jam, 4 jam, 8 jam, 12 jam, 16 jam, 18 jam, dan 20 jam. Hasil hidrolisis dihitung dari persamaan kurva standar xilosa dengan perlakuan seperti prosedur 3.4.3 poin a. Hasil hidrolisis disajikan dalam bentuk total gula pereduksi yang dapat diperoleh dengan persamaan 3.8

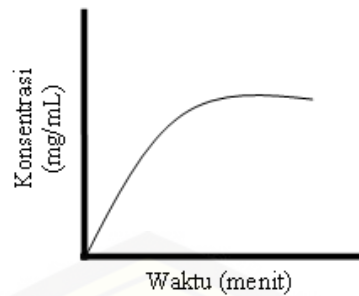
$$\text{T.G.P (mg/ml)} = [\text{X}] \text{ Sampel (mg/ml)} - [\text{X}] \text{ Kontrol (mg/ml)} \dots\dots(3.8)$$

Keterangan,

TGP : Total Gula Pereduksi (mg/ml)

[X] : konsentrasi xilosa

Data yang didapatkan kemudian diplot dengan waktu inkubasi untuk mengetahui nilai kecepatan awal reaksinya (V_0) seperti pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Kurva pengaruh konsentrasi substrat terhadap waktu

Persamaan kurva yang digunakan yakni persamaan polinomial dengan pangkat tertinggi yaitu 2. Persamaan kurva yang didapatkan kemudian diturunkan terhadap waktu dengan asumsi V_0 mendekati nol.

$$y = a + bx + cx^2$$

$$y = a + bt + ct^2$$

$$\frac{dy}{dt} = 2ct + b = V$$

$$V(t=0) = b \dots\dots\dots(3.3)$$

Nilai V_0 dari masing-masing konsentrasi substrat digunakan untuk membuat kurva Lineweaver-Burk. Menurut Nelson dan Cox (2010), kurva Lineweaver-Burk dibuat dengan memplotan $1/\text{konsentrasi substrat}$ dan $1/V_0$ yang diperoleh sebelumnya. Nilai konstanta Michaelis Menten (KM) dan kecepatan reaksi maksimum (VMax) diperoleh dari persamaan 2.12.

3.4.6 Penentuan k_{Cat} Endo- β -1,4-D-xilanase

Penentuan k_{Cat} dilakukan dengan memasukkan nilai yang sudah diketahui pada prosedur 3.4.4 ke dalam persamaan 2.13.

3.4.7 Analisis Parameter Kinetika

Analisis ini dilakukan dengan membandingkan nilai parameter kinetika untuk kedua xilan *oat* dan *birchwood* yang telah ditentukan pada prosedur 3.5 dan 3.4.6. Analisis ini bertujuan menentukan substrat yang paling cocok untuk endo- β -1,4-D-xilanase dalam menghasilkan xilooligosakarida (XOS).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa

1. Nilai K_M endo- β -1,4-D-xilanase untuk substrat xilan *oat* dan *birchwood* berturut-turut adalah 4,10 mg/ml dan 0,681 mg/ml. Nilai V_{Max} , dan k_{Cat} untuk substrat xilan *oat* sebesar 0,28 mg/ml.jam dan $1,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Sedangkan V_{Max} , dan k_{Cat} untuk substrat *birchwood* yaitu 0,117 mg/U.jam dan $7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.
2. Endo- β -1,4-D-xilanase lebih efektif bekerja pada *birchwood* dari pada xilan *oat* berdasarkan nilai K_M dan konstanta spesifiknya.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya sebaiknya perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut pada enzim sebelum digunakan untuk menghidrolisis substrat xilan. Selanjutnya digunakan pula substrat lainnya seperti *beechwood* untuk melihat kecenderungan spesifitas substrat pada endo- β -1,4-D-xilanase.

DAFTAR PUSTAKA

- Aachary, A.A., dan Prapulla, S.G. 2011. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Comprehensive Reviewa in Food Science and Food Safety* 10: 1-15.
- Ahmed, Sibtain, Syeda Sana, and Imdad Amer. 2012. Comparative Study for the Kinetics of Extracellular Xylanases from *Trichoderma Harzianum* and *Chaetomium Thermophilum*. *Electronic Journal of Biotechnology* 15: 3-9.
- Atkins, N. dan Paula, J. 2010. *Physical Chemistry Ninth Edition*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Beg, Kapoor, Mahajan, dan Hoondal. 2001. Microbial Xylanases and Their Industrial Applications : A Review. *App Microbiol Biotechnol* 56: 326-338.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., dan Stryer, L. 2007. *Biochemistry*. 5th Ed. New York : W. H. Freeman and Company.
- Bintang, M. 2010. *Teknik Penelitian Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Bisswanger, H. 2002. *Enzyme Kinetics Principle and Methods*. Jerman: Wiley-vch.
- Blei, H. S., Dabonné1, S., Soro, Y. R., and Kouamé, L. P. 2011. Purification and Characterization Of An Endo-Beta-Dxyylanase from Major Soldier Salivary Glands of The Termite *Macrotermes Subhyalinus* With Dual Activity Against Carboxymethylcellulose. *Journal of Entomology and Nematology* 3(1):1-13.
- Bollag, D.M., Rozicky, M.D., & Edelstein, S.J. 1996. *Protein Methods*. Edisi Kedua. New York : John Willey & Sons Inc.
- Collins, T. Gerday, C. dan Feller, G. 2003. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 3-23.
- Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., Jones, K.M. 1969. *Data for Biochemical Research* . 2nd Ed. London: Oxford University Press.
- Day, R. A. dan Underwood A. L. 1986. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Edisi Kelima. Jakarta: Erlangga.
- Deutscher, M.P. 1990. *Methods in Enzymology : Guide to Protein Purification Vol. 182*. California : Academic Press Inc.

- Eisenthal, Robert, Michael J. Danson, and David W. Hough. 2007. Catalytic Efficiency and $K_{\text{Cat}} / K_{\text{M}}$: A Useful Comparator. *TRENDS in Biotechnology* 25(6): 3–5.
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A. 2012. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Irfan, M.,M., Nadeem, Q., Syed. 2013. Purification and kinetics study of thermostable cellulase free xylanase from *Bacillus subtilis*. *Protein Peot Lett*: 25-31.
- Kamble, Rajashri D. dan Jadhav, Anandrao R. 2011. Isolation, Purification, and Characterization of Xylanase Produced by a New Species of *Bacillus* in Solid State Fermentation. *International Journal of Microbiology*: 1-7.
- Karp, Gerald. 2010 *Cell and Molecular Biology: Concept and Experiments 6th Edition*. Amerika: John Wiley & Sons.
- Kennedy, J. H. 1990. *Analytical Chemistry: Principles*. 2nd Ed. Amerika: W. B. Saunders Company.
- Knob, Adriana and Eleonora Cano Carmona. 2010. Purification and Characterization of Two Extracellular Xylanases from *Penicillium Sclerotiorum*: A Novel Acidophilic Xylanase. *Biochemistry and Biotechnology September* 162(2): 429-43.
- Krengel, Ute. dan Dijkstra, B. W. 1996. Three-dimensional Structure of Endo-1,4-xylanase I from *Aspergillus niger*: Molecular Basis for its Low pH optimum. *J.Mol.Biol* 263: 70-78
- Krisana, A., Rutchadaporn, S., Jarupan, G., Lily, E., Sutipa, T., and Kanyawim, K. 2004. Endo-1,4- β -xylanase B from *Aspergillus* cf. *niger* CC14405 Isolated in Thailand: Purification, Characterization and Gene Isolation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38(1): 17-23.
- Kumar, G. P., Puspha, A., dan Prabha, H. 2012. A Review on Xylooligosaccharides. *International Research Journal of Pharmacy* 3(8): 71-74.
- Kurniawan, A. A. 2015. Optimasi Kondisi Hidrolisis Xilan Oat dengan Endo β -1,4-D-Xilanase Asal Mikroorganisme dalam Sistem Abdomenal Rayap untuk Produksi Xilooligosakarida. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Li, K., Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim, J. S., Eriksson, K. L. 2000. *Relationship between Activities of Xylanases and Xylan Structure*. Kanada: *Journal Enzyme and Microbial Technology* 27: 89-94.

- Masnia, L. 2014. Pemurnian Produk Hidrolisis Endo- β -1,4-D-Xylanase asal *Bacillus sp.* dengan Kromatografi Filtrasi Gel. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Millesi, T. S.S., Kopp, W., Rojas, M. J., Manrich, A., Bapista-Neto, A., Tardoli, P. W., Giordani, R. C., Lafuente, R. F., Guisan, J. M., dan Giordano, R. I. C. 2015. Immobilization and Stabilization of An Endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for Xylooligosaccharides (XOs) Production. *Catalysis today*: 1-10.
- Moraïs, S., Barak, Y., Caspi, J., Hadar, Y., Lamed, R., Shoham, Y., Wilson, D. B., Bayer, E. A. 2010. Contribution of a Xylan-Binding Module to the Degradation of a Complex Cellulosic Substrate by Designer Cellulosomes. *Environmental Microbiology*: 3787-3796.
- Nelson, D. L. dan Cox, M. M. 2010. *Lehninger Principal Biochemistry Fourth Edition*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Paes, Gabriel, Berrin, Jean-Guy, dan Beaugrand. 2012. GH11 Xylanases: Structure/Function/Properties Relationships and Applications. *Biotechnology Advances* 30: 564–592.
- Qing, Li, Kumar, dan Wyman. 2013. *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals, First Edition: Chapter 19 Xylooligosaccharides Production, Quantification, and Characterization in Context of Lignocellulosic Biomass Pretreatment*. USA: John Wiley & Sons, Ltd.
- Radionova, N. A., Dubovaya, N. V., Eneiskaya, E. V., Martinovinch, L. L., Gracheva, I. M., dan Bezborodov, A. M. 2000. Purification and Characterization of endo-(1 \rightarrow 4)- β -D-Xylanase from *Geotrichum candidum* 3C. *Biochemistry and Microbiology* 36: 460-465.
- Ratnadewi, A.A.I. & Handayani, W. 2007. *Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Xilanolitik Asal Mikrob dalam Sistem Intestinal Rayap untuk Memproduksi Xilooligosakarida sebagai Pereduksi Resiko Kanker*. Tidak Diterbitkan. Laporan Penelitian Tahun II Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi. Jember : Universitas Jember.
- Richana, Nur. 2002. Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia. *Buletin Agrobio* 5(1): 29-36.
- Saleem, M., Aslam, f., Akhtar, M. S., Tari, M., dan Rajoka, M. I. 2011. Characterization of a thermostable and alkaline xylanase from *Bacillus sp.* and its bleaching impact on wheat straw pulp. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 513–522

- Samanta, Jayapal, Jayaram, Yor, dan Kolte. 2015. Xylooligosaccharides as prebiotic from agricultural by-product: Production and application. *Bioactive Carbohydrat and Dietary fibre* 5: 62-71.
- Saropah, Dyah A., Akyunul Jannah, and Anik Maunatin. 2012. Kinetika Reaksi Enzimatis Ekstrak Kasar Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi Dari Bekatul. *Alchemy* 2(1): 35-45.
- Shallom, D. dan Shoham, Y. 2003. Microbial Hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*: 216–228.
- Subramaniyan, S. dan Prema, P. 2002. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. *Critical Reviews in Biotechnology* 22(1): 33-46.
- Vazquea, M. J., Alonso, J. L., Dominguez, H., dan Parajo, J. C. 2000. Review: Xylooligosaccharides: Manufactue and Applications. *Trends in Food Science and Technology* 11: 387-393.
- Zheng, H., Sun, M., Meng, L., Pei, H., Zhang, X., Zheng, Y., Zeng, W., Zhang, J., Hu, J., Lu, F., Sun, J. 2014. Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from *Paenibacillus* sp. NF1 and its Application in Xylooligosaccharides Production. *J. Microbiol Biotechnol* 24(4): 489-496.

LAMPIRAN

3.1 Pengenceran Substrat

a. Konsentrasi 1,2%

$$1,2\% = \frac{1,2g}{100ml} = \frac{0,12g}{10ml}$$

b. Konsentrasi 1,0%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1,2\% \times V_1 = 1,0\% \times 6ml$$

$$V_1 = \frac{6}{1,2} = 5ml$$

c. Konsentrasi 0,8%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1,2\% \times V_1 = 0,8\% \times 6ml$$

$$V_1 = \frac{4,8}{1,2} = 4ml$$

d. Konsentrasi 0,6%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1,2\% \times V_1 = 0,6\% \times 6ml$$

$$V_1 = \frac{3,6}{1,2} = 3ml$$

e. Konsentrasi 0,4%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1,2\% \times V_1 = 0,4\% \times 6ml$$

$$V_1 = \frac{2,4}{1,2} = 2ml$$

f. Konsentrasi 0,2%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1,2\% \times V_1 = 0,2\% \times 6ml$$

$$V_1 = \frac{1,2}{1,2} = 1ml$$

3.2 Fraksinasi Ammonium Sulfat

$$\text{Massa ammonium sulfat (g)} = \frac{\text{massa di tabel (g)}}{100 \text{ ml}} \times \text{volume enzim (ml)}$$

fraksinasi 0-40%

$$\text{massa} = \frac{22,6 \text{ g}}{100 \text{ ml}} \times 48 \text{ ml} = 10,848 \text{ g}$$

fraksinasi 40-50%

$$\text{massa} = \frac{5,8 \text{ g}}{100 \text{ ml}} \times 50 \text{ ml} = 2,9 \text{ g}$$

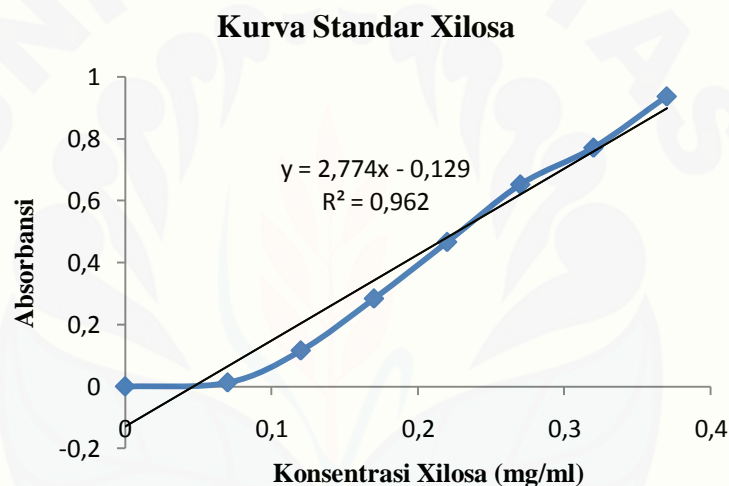
konsentrasi mula dari ammonium sulfat (% kejenuhan pada 0°C)	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Jumlah ammonium sulfat yang ditambahkan per 100 ml																	
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.4	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20		2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25			0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.6	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8
30				0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5
35					0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0
40						0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6
45							0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2
50								0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.3	30.8
55									0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3
60										0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9
65											0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5
70												0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1
75													0	3.2	6.6	10.1	13.7
80														0	3.3	6.7	10.3
85															0	3.4	6.8
90																0	3.4
95																	0
100																	

Sumber : Dawson *et al*, 1969

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

4.1.a Kurva Standar Xilosa pada Panjang Gelombang 595 nm

Konsentrasi Xilosa (mg/ml)	Absorbansi			Rata-rata	Standar Deviasi
	Abs. 1	Abs.2	Abs.3		
0	0	0	0	0	
0,07	0,012	0,019	0,007	0,013	0,005
0,12	0,113	0,119	0,116	0,116	0,004
0,17	0,284	0,287	0,281	0,284	0,002
0,22	0,484	0,472	0,444	0,467	0,008
0,27	0,613	0,647	0,697	0,652	0,024
0,32	0,77	0,775	0,769	0,771	0,004
0,37	0,944	0,935	0,932	0,937	0,006



4.1.b Perhitungan Kadar Xilosa

$$\text{Kadar xilosa (mg/ml)} = \frac{\text{Abs} \pm C \times fp}{m} = \frac{\text{Abs} \pm 0,129 \times fp}{2,774}$$

Keterangan,

Abs : nilai absorbansi pada λ_{595} nm

C : nilai *intercept* dari persamaan kurva standar xilosa

fp : faktor pengenceran

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

a. Ekstrak Kasar

Sampel

$$2,774 x - 0,129 = y$$

$$2,774x - 0,129 = 0,323$$

$$2,774x = 0,452$$

$$x = 0,163$$

$$2,774 x - 0,129 = y$$

$$2,774x - 0,129 = 0,307$$

$$2,774x = 0,436$$

$$x = 0,157$$

Kontrol

$$\begin{aligned} 2,774 x - 0,129 &= y \\ 2,774x - 0,129 &= 0,177 \\ 2,774x &= 0,306 \\ x &= 0,110 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2,774 x - 0,129 &= y \\ 2,774x - 0,129 &= 0,167 \\ 2,774x &= 0,296 \\ x &= 0,107 \end{aligned}$$

b. F. 40-50%**Sampel**

$$\begin{aligned} 2,774 x - 0,129 &= y \\ 2,774x - 0,129 &= 0,342 \\ 2,774x &= 0,471 \\ x &= 0,170 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2,774 x - 0,129 &= y \\ 2,774x - 0,129 &= 0,362 \\ 2,774x &= 0,492 \\ x &= 0,177 \end{aligned}$$

Kontrol

$$\begin{aligned} 2,774 x - 0,129 &= y \\ 2,774x - 0,129 &= 0,173 \\ 2,774x &= 0,302 \\ x &= 0,109 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2,774 x - 0,129 &= y \\ 2,774x - 0,129 &= 0,177 \\ 2,774x &= 0,306 \\ x &= 0,110 \end{aligned}$$

c. Dialisat**Sampel**

$$\begin{aligned} 2,774 x - 0,129 &= y \\ 2,774x - 0,129 &= 0,463 \\ 2,774x &= 0,592 \\ x &= 0,213 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2,774 x - 0,129 &= y \\ 2,774x - 0,129 &= 0,481 \\ 2,774x &= 0,610 \\ x &= 0,220 \end{aligned}$$

Kontrol

$$\begin{aligned} 2,774 x - 0,129 &= y \\ 2,774x - 0,129 &= 0,180 \\ 2,774x &= 0,309 \\ x &= 0,111 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2,774 x - 0,129 &= y \\ 2,774x - 0,129 &= 0,181 \\ 2,774x &= 0,310 \\ x &= 0,112 \end{aligned}$$

4.1.c Rumus Perhitungan Total Gula Pereduksi

$$\text{T.G.P (mg/ml)} = [\text{X}] \text{ Sampel (mg/ml)} - [\text{X}] \text{ Kontrol (mg/ml)}$$

dimana,

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

[X] : Konsentrasi xilosa yang diperoleh dari perhitungan dari persamaan kurva standar xilosa pada Lampiran 4.1.a (mg/ml)

Ekstrak Kasar	TGP = 0,163-0,110 = 0,053 mg/ml	TGP = 0,157-0,107 = 0,050 mg/ml
F.40-50%	TGP = 0,170-0,109 = 0,054 mg/ml	TGP = 0,177-0,110 = 0,059 mg/ml
Dialisat	TGP = 0,213-0,111 = 0,102 mg/ml	TGP = 0,220-0,112 = 0,108 mg/ml

4.1.d Pengukuran Aktivitas Endo- β -D-Xilanase

$$\text{Aktivitas enzim/A.E (U/ml)} = \frac{([S]-[K]) \times Fp \times \left(\frac{V_t}{V_e}\right)}{t \times BM \text{ xilosa}}$$

dimana,

[S] : konsentrasi sampel (mg/ml)

[K] : konsentrasi kontrol (mg/ml)

Fp : faktor pengenceran

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

V_e : volume enzim yang digunakan ketika pengukuran (μ l)

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

BM : berat molekul xilosa (g/mol), 150,3 g/mol

$$\begin{aligned} \text{A.E} &= \frac{([S]-[K]) \times Fp \times \left(\frac{1000 \mu\text{l}}{125 \mu\text{l}}\right)}{60 \text{ menit} \times 150,3 \text{ g.mol}^{-1}} = \frac{TGP \text{ mg/ml} \times Fp \times 8 \text{ mol}}{9018 \text{ menit.g}} \times \frac{1 \text{ g}}{10^{-3} \text{ mg}} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} \\ &= \frac{TGP \times Fp \times 8 \times 10^3 \mu\text{mol}}{9018 \text{ menit.ml}} = \frac{TGP \times Fp \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}} \end{aligned}$$

Ekstrak Kasar	$\text{A.E} = \frac{TGP \times Fp \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}}$ $= \frac{0,053 \times 1 \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}} = 0,047 \text{ U/ml}$	$\text{A.E} = \frac{Fp \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}}$ $= \frac{0,050 \times 1 \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}} = 0,045 \text{ U/ml}$
	$\text{Rerata} = \frac{0,047 + 0,045}{2} = 0,046$	
F.40-50%	$\text{A.E} = \frac{TGP \times Fp \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}}$ $= \frac{0,061 \times 1 \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}} = 0,054 \text{ U/ml}$	$\text{A.E} = \frac{Fp \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}}$ $= \frac{0,067 \times 1 \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}} = 0,059 \text{ U/ml}$
	$\text{Rerata} = \frac{0,054 + 0,059}{2} = 0,057$	
Dialisat	$\text{A.E} = \frac{TGP \times Fp \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}}$ $= \frac{0,102 \times 1 \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}} = 0,091 \text{ U/ml}$	$\text{A.E} = \frac{Fp \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}}$ $= \frac{0,108 \times 1 \times 8 \times 10^3 U}{9018 \text{ ml}} = 0,096 \text{ U/ml}$
	$\text{Rerata} = \frac{0,091 + 0,096}{2} = 0,093$	

Sampel	Sampel			Kontrol		T.G.P (mg/ml)	A.E (U/ml)	\bar{X} (U/ml)	S.D
	Abs	fp	K.X	Abs	K.X				
E.K	0,323	1	0,163	0,177	0,110	0,053	0,047	0,046	0,001
	0,307	1	0,157	0,167	0,107	0,050	0,045		
F.40-50%	0,342	1	0,170	0,173	0,109	0,061	0,054	0,057	0,004
	0,363	1	0,177	0,177	0,110	0,067	0,059		
Dialisat	0,463	1	0,213	0,180	0,111	0,102	0,091	0,093	0,004
	0,481	1	0,220	0,181	0,112	0,108	0,096		

dimana,

E.K : Ekstrak Kasar

F.40-50% : Fraksinasi 50%

Abs : Absorbansi (nm)

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

SD : Standar Deviasi

K.X : Konsentrasi Xilosa,

T.G.P : Total Gula Pereduksi,

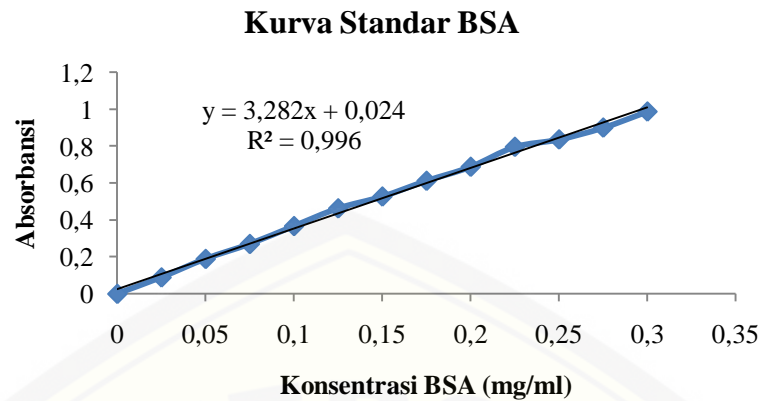
A.E : Aktivitas Enzim

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

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

4.2.a Kurva Standar BSA pada Panjang Gelombang 550 nm

Konsentrasi BSA (mg/mL)	Absorbansi			Rata- rata	Standar Deviasi
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		
0	0	0	0	0	
0,025	0,089	0,088	0,089	0,089	0,001
0,05	0,189	0,184	0,194	0,189	0,005
0,075	0,218	0,334	0,258	0,270	0,059
0,1	0,378	0,338	0,385	0,367	0,025
0,125	0,415	0,536	0,438	0,463	0,064
0,15	0,507	0,504	0,57	0,527	0,037
0,175	0,629	0,606	0,601	0,612	0,015
0,2	0,656	0,700	0,708	0,688	0,028
0,225	0,727	0,814	0,847	0,796	0,062
0,25	0,800	0,892	0,816	0,836	0,049
0,275	0,933	0,905	0,862	0,900	0,036
0,3	0,988	0,978	0,995	0,987	0,009



4.2.b Perhitungan Konsentrasi BSA

$$\text{Konsentrasi BSA (mg/ml)} = \frac{\text{Abs} \pm C \times fp}{m} = \frac{\text{Abs} \pm 0,034 \times fp}{3,236}$$

Keterangan,

Abs : nilai absorbansi pada λ_{595} nm

C : nilai *intercept* dari persamaan kurva standar BSA

fp : faktor pengenceran

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

a. Kontrol

$3,282x + 0,024 = y$	$3,282x + 0,024 = y$	Rerata
$3,282x + 0,024 = 0,385$	$3,282x + 0,024 = 0,390$	$= \frac{0,110 + 0,112}{2}$
$3,282x = 0,361$	$3,282x = 0,366$	$= 0,111$
$x = 0,110$	$x = 0,112$	

b. Ekstrak Kasar

$3,282x + 0,024 = y$	$3,282x + 0,024 = y$	Rerata
$3,282x + 0,024 = 0,720$	$3,282x + 0,024 = 0,736$	$= \frac{0,212 + 0,217}{2}$
$3,282x = 0,696$	$3,282x = 0,712$	$= 0,214$
$x = 0,212$	$x = 0,217$	

c. F. 40-50%

$3,282x + 0,024 = y$	$3,282x + 0,024 = y$	Rerata
$3,282x + 0,024 = 0,624$	$3,282x + 0,024 = 0,630$	$= \frac{0,183 + 0,185}{2}$
$3,282x = 0,600$	$3,282x = 0,606$	$= 0,184$
$x = 0,183$	$x = 0,185$	

d. Dialisat

$3,282x + 0,024 = y$	$3,282x + 0,024 = y$	Rerata
$3,282x + 0,024 = 0,536$	$3,282x + 0,024 = 0,540$	$= \frac{0,156 + 0,157}{2}$
$3,282x = 0,512$	$3,282x = 0,516$	$= 0,157$
$x = 0,156$	$x = 0,157$	

4.2.c Pengukuran Kadar Protein Endo- β -1,4-D-Xilanase

$$\text{Kadar Protein (mg/ml)} = [\text{BSA}] \text{ Sampel} - [\text{BSA}] \text{ Kontrol}$$

$$\text{Ekstrak Kasar} \quad \text{Kadar Protein (mg/ml)} = 0,214 - 0,111 = 0,103 \text{ mg/ml}$$

$$\text{F.40-50 \%} \quad \text{Kadar Protein (mg/ml)} = 0,184 - 0,111 = 0,073 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Dialisat} \quad \text{Kadar Protein (mg/ml)} = 0,157 - 0,111 = 0,046 \text{ mg/ml}$$

4.2.d Rumus Perhitungan Yield

$$\text{Kadar Protein Total/K.P.T (mg)} = \text{Kadar Protein (mg/ml)} \times \text{Volume (ml)}$$

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{K.P.T yang diukur (mg)}}{\text{K.P.T ekstrak kasar/pembanding (mg)}} \times 100\%$$

a. Ekstrak Kasar

$$\text{K.P.T} = 0,103 \text{ mg/ml} \times 48 \text{ ml} = 4,97 \text{ mg}$$

$$\text{Yield (\%)} = \frac{4,97 \text{ mg}}{4,97 \text{ mg}} \times 100\% = 100\%$$

b. 40-50%

$$\text{K.P.T} = 0,073 \text{ mg/ml} \times 24 \text{ ml} = 1,75 \text{ mg}$$

$$\text{Yield (\%)} = \frac{1,75 \text{ mg}}{5,15 \text{ mg}} \times 100\% = 35\%$$

c. Dialisat

$$\text{K.P.T} = 0,046 \text{ mg/ml} \times 23 \text{ ml} = 1,05 \text{ mg}$$

$$\text{Yield (\%)} = \frac{1,05 \text{ mg}}{5,15 \text{ mg}} \times 100\% = 21\%$$

4.2.e Rumus Perhitungan Aktivitas Spesifik Endo- β -1,4-D-Xilanase

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

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar (U/mg)} &= \frac{0,046 \text{ U/ml}}{0,103 \text{ mg/ml}} \\ &= 0,442 \text{ U/mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas Spesifik F.40-50 \% (U/mg)} &= \frac{0,057 \text{ U/ml}}{0,073 \text{ mg/ml}} \\ &= 0,780 \text{ U/mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas Spesifik Dialisat (U/mg)} &= \frac{0,093 \text{ U/ml}}{0,046 \text{ mg/ml}} \\ &= 2,04 \text{ U/mg} \end{aligned}$$

4.3.f Rumus Faktor Kemurnian (FK)

$$\text{Faktor Kemurnian} = \frac{\text{Aktiitas Spesifik yang diukur (U/mg)}}{\text{Aktiitas Spesifik ekstrak kasar (Umg)}}$$

$$\begin{aligned} \text{a. Ekstrak Kasar} &= \frac{0,442 \text{ mg}}{0,442 \text{ mg}} = 1 \\ \text{b. F.40-50\%} &= \frac{0,780 \text{ mg}}{0,442 \text{ mg}} = 1,77 \\ \text{c. Dialisat} &= \frac{2,04 \text{ mg}}{0,442 \text{ mg}} = 4,62 \end{aligned}$$

Nama	Abs	\bar{X}	SD	K.BSA (mg/ml)	K.P (mg/mL)	Yield (%)	A.S (U/mg)	FK
Kontrol	0,385 0,390	0,388	0,004	0,111				
E.K	0,720 0,736	0,728	0,011	0,214	0,103	100	0,442	1
F.40-50 %	0,624 0,630	0,627	0,004	0,184	0,073	35	0,780	1,77
Dialisat	0,536 0,540	0,538	0,003	0,157	0,046	21	2,04	4,62

Keterangan :

E.K : Ekstrak Kasar

F.40-50% : Fraksi 40-50%

Abs : Absorbansi

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

SD : Standar Deviasi

K.BSA : Kadar BSA yang diperoleh dari perhitungan dari lampiran 3.1.b

K.P : Kadar Protein diperoleh dengan mengurangi kadar BSA sampel dengan kontrol

A.E : Aktivitas Enzim yang diperoleh dari perhitungan lampiran 4.1

A.S : Aktivitas spesifik yang diperoleh dari perhitungan lampiran 4.2

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

F.K : Faktor Kemurnian

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

4.3.1 Penentuan nilai K_M dan V_{max} dari Enzim terhadap Substrat Xilan *Oat*

K.S (%)	Waktu (jam)	Sampel			Kontrol		T.G.P (mg/ml)	\bar{X}	SD
		Abs	Fp	K.X	Abs	K.X			
0,2	0	0,168	1	0,107	0,145	0,099	0,008	0,007	0,002
		0,162	1	0,105	0,146	0,099	0,006		
	4	0,373	1	0,181	0,154	0,102	0,079	0,071	0,011
		0,327	1	0,164	0,152	0,101	0,063		
	8	0,465	1	0,214	0,155	0,102	0,112	0,114	0,003
		0,475	1	0,218	0,154	0,102	0,116		
	12	0,529	1	0,237	0,16	0,104	0,133	0,132	0,002
		0,527	1	0,236	0,165	0,106	0,130		
	16	0,597	1	0,262	0,153	0,102	0,160	0,160	0,001
		0,596	1	0,261	0,15	0,101	0,161		
20	0,578	1	0,255	0,164	0,106	0,149	0,155	0,008	
	0,612	1	0,267	0,167	0,107	0,160			
0,4	0	0,243	1	0,134	0,147	0,099	0,035	0,035	0,001
		0,247	1	0,136	0,149	0,100	0,035		
	4	0,587	1	0,258	0,178	0,111	0,147	0,147	0,000
		0,584	1	0,257	0,175	0,110	0,147		
	8	0,619	1	0,270	0,178	0,111	0,159	0,159	0,000
		0,617	1	0,269	0,175	0,110	0,159		
	12	0,431	2	0,404	0,185	0,113	0,291	0,297	0,009
		0,449	2	0,417	0,185	0,113	0,304		
	16	0,475	2	0,435	0,170	0,108	0,328	0,342	0,020
		0,517	2	0,466	0,177	0,110	0,355		
20	0,469	2	0,431	0,130	0,093	0,338	0,352	0,020	
	0,511	2	0,461	0,134	0,095	0,367			
0,6	0	0,262	1	0,141	0,149	0,100	0,041	0,042	0,002
		0,266	1	0,142	0,146	0,099	0,043		
	4	0,271	2	0,288	0,204	0,120	0,168	0,197	0,040
		0,827	1	0,345	0,202	0,119	0,225		
	8	0,454	2	0,420	0,201	0,119	0,301	0,300	0,001
		0,452	2	0,419	0,201	0,119	0,300		
	12	0,448	2	0,416	0,201	0,119	0,297	0,318	0,030
		0,509	2	0,460	0,206	0,121	0,339		
	16	0,632	2	0,549	0,19	0,115	0,434	0,420	0,020
		0,595	2	0,522	0,192	0,116	0,406		
20	0,655	2	0,565	0,206	0,121	0,445	0,436	0,012	
	0,618	2	0,539	0,181	0,112	0,427			
0,8	0	0,289	1	0,151	0,208	0,121	0,029	0,034	0,007
		0,312	1	0,159	0,205	0,120	0,039		

K.S (%)	Waktu (jam)	Sampel			Kontrol		T.G.P (mg/ml)	\bar{X}	SD
		Abs	fp	K.X	Abs	K.X			
0,8	4	0,944	1	0,387	0,229	0,129	0,258	0,260	0,004
		0,959	1	0,392	0,230	0,129	0,263		
	8	1,321	1	0,523	0,214	0,124	0,399		
		1,314	1	0,520	0,222	0,127	0,394		
	12	0,736	2	0,624	0,217	0,125	0,499		
		0,736	2	0,624	0,216	0,124	0,499		
	16	0,805	2	0,673	0,224	0,127	0,546		
		0,885	2	0,731	0,224	0,127	0,604		
	20	0,734	2,5	0,778	0,219	0,125	0,652		
		0,757	2,5	0,798	0,228	0,129	0,670		
1	0	0,301	1	0,155	0,154	0,102	0,053	0,052	0,002
		0,293	1	0,152	0,154	0,102	0,050		
	4	0,688	1	0,295	0,235	0,131	0,163		
		0,712	1	0,303	0,246	0,135	0,168		
	8	0,74	2	0,627	0,237	0,132	0,390		
		0,75	2	0,634	0,235	0,131	0,399		
	12	0,699	2	0,597	0,238	0,132	0,465		
		0,712	2	0,606	0,240	0,133	0,474		
	16	0,743	2	0,629	0,283	0,149	0,480		
		0,754	2	0,637	0,279	0,147	0,490		
20	0,671	2	0,577	0,253	0,138	0,439			
	0,84	2	0,699	0,253	0,138	0,561			
1,2	0	0,324	1	0,163	0,166	0,106	0,057	0,057	0,000
		0,325	1	0,164	0,169	0,107	0,056		
	4	0,469	2	0,431	0,302	0,155	0,276		
		0,458	2	0,423	0,293	0,152	0,271		
	8	0,766	2	0,646	0,293	0,152	0,493		
		0,749	2	0,633	0,293	0,152	0,481		
	12	0,796	2	0,667	0,215	0,124	0,543		
		0,796	2	0,667	0,22	0,126	0,541		
	16	0,893	2	0,737	0,288	0,150	0,587		
		0,889	2	0,734	0,288	0,150	0,584		
20	0,939	2	0,770	0,266	0,142	0,628			
	0,844	2	0,702	0,257	0,139	0,562			

K.S: Konsentrasi Sampel; Abs: Absorbansi; Fp: Faktor pengenceran; K.X: Kadar

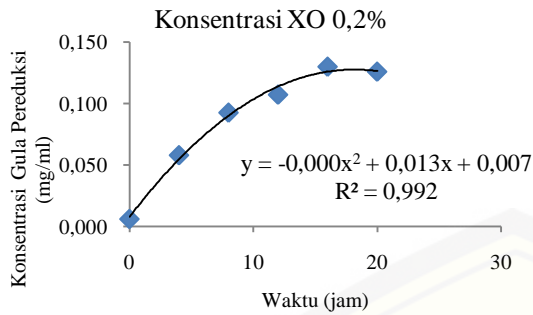
Xilosa; T.G.P: Total Gula Pereduksi; \bar{X} : rerata; SD: Standar Deviasi

a. Mencari V_0 dengan menurunkan persamaan garis

$$y = a + bx + cx^2$$

$$y(t = 0) = a + bt + ct^2$$

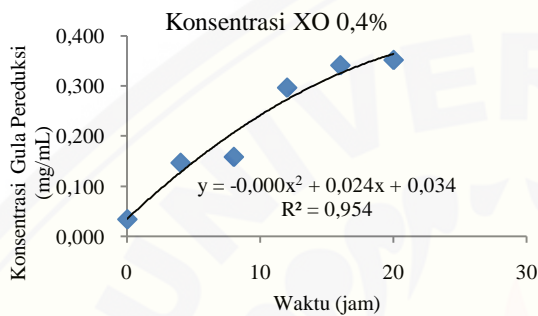
$$v(t = 0), \text{ maka } \frac{dy}{dt} = b + 2ct$$



$$y = 0,000x^2 + 0,013x + 0,007$$

$$V_0(t=0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = 2 * 0,00x + 0,013$$

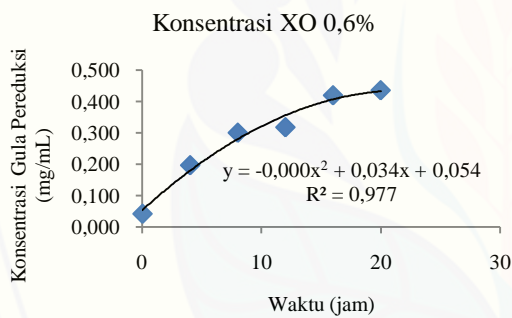
$$V_0 = 0,013$$



$$y = 0,000x^2 + 0,024x + 0,034$$

$$V_0(t=0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = 2 * 0,00x + 0,024$$

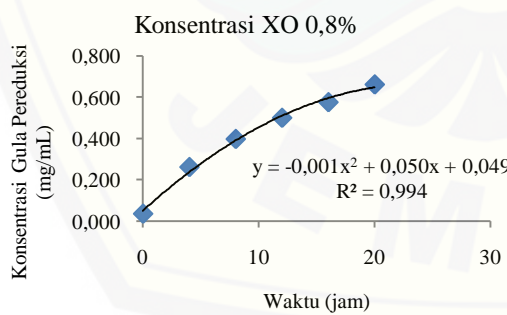
$$V_0 = 0,024$$



$$y = 0,000x^2 + 0,034x + 0,054$$

$$V_0(t=0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = 0,004x + 0,034$$

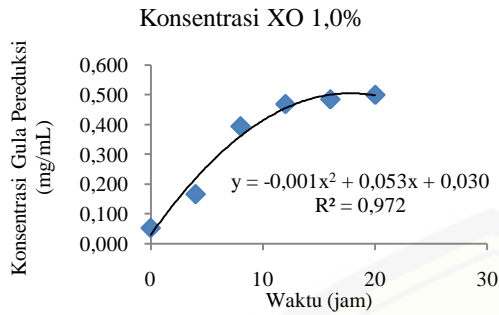
$$V_0 = 0,034$$



$$y = -0,001x^2 + 0,050x + 0,049$$

$$V_0(t=0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = -0,002x + 0,050$$

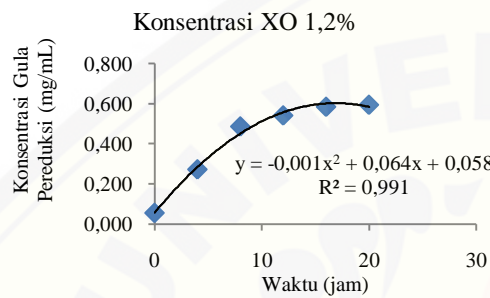
$$V_0 = 0,050$$



$$y = -0,001x^2 + 0,053x + 0,030$$

$$V_0(t=0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = -0,002x + 0,053$$

$$V_0 = 0,053$$



$$y = -0,001x^2 + 0,064x + 0,058$$

$$V_0(t=0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = -0,002x + 0,064$$

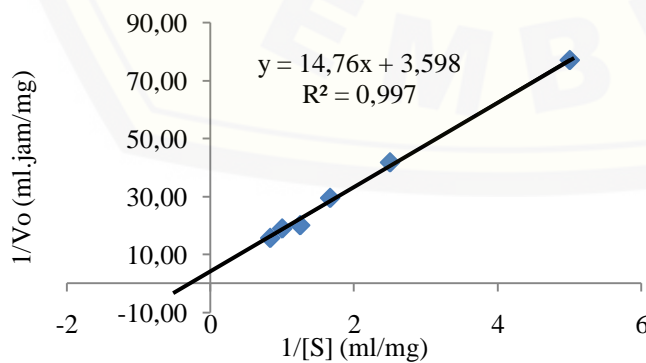
$$V_0 = 0,064$$

b. Perhitungan Nilai K_M , V_{max} , dan k_{cat} dengan Garis Linear Kurva Liviweaver

Bulk

[S] (mg/ml)	V_0 (mg/ml.jam)	1/[S] (ml/mg)	1/ V_0 (ml.jam/mg)
0,2	0,013	5	76,92
0,4	0,024	2,5	41,67
0,6	0,034	1,67	29,41
0,8	0,05	1,25	20,00
1	0,053	1	18,87
1,2	0,064	0,83	15,63

Kurva Liviweaver - Burk



$$y = mx + c$$

$$y = 14,76x + 3,598$$

Keterangan,

$$y = \frac{1}{V_0}, x = \frac{1}{[S]}$$

$$m = \frac{K_m}{V_{max}} = 14,76$$

$$c = \frac{1}{V_{max}} = 3,598$$

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

$$c = \frac{1}{V_{max}} = 3,598$$

$$V_{max} = \frac{1}{c} = \frac{1}{3,598} = 0,28 \text{ mg/ml.jam}$$

$$m = \frac{K_m}{V_{max}} = 14,76$$

$$\frac{K_m}{0,28} = 14,76$$

$$K_m = 14,76 \times 0,28$$

$$K_m = 4,10 \text{ mg/ml}$$

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_0]} = \frac{0,28 \text{ mg}}{\text{ml.jam}} : \frac{0,046 \text{ mg}}{\text{ml}}$$

$$k_{cat} = \frac{0,28 \text{ mg}}{\text{ml}} \times \frac{\text{ml}}{0,046 \text{ mg}} \times \frac{1}{3600 \text{ s}}$$

$$k_{cat} = 1,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{1,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}}{4,10 \text{ mg/ml}} = 4 \times 10^{-4} \text{ ml/mg.s}$$

c. Konversi satuan

$$V_{max} = \frac{1}{c} = \frac{1}{3,598} = 0,28 \text{ mg/ml.jam}$$

$$= \frac{0,28 \text{ mg}}{\text{ml.jam}} \times \frac{1 \text{ jam}}{60 \text{ menit}} \times \frac{1 \text{ mol}}{150,3 \text{ g}} \times \frac{10^{-3} \text{ g}}{\text{mg}}$$

$$= 3,1 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{mol/ml.menit}$$

$$= \frac{3,1 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{mol}}{\text{ml.menit}} : \frac{0,046 \text{ mg}}{\text{ml}} = \frac{3,1 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{mol}}{\text{ml.menit}} \times \frac{\text{ml}}{0,046 \text{ mg}} = 67,4 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{mol/ml.mg}$$

protein

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

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

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

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

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

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

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

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

4.3.2. Penentuan nilai K_M dan V_{max} dari Enzim terhadap Substrat*Birchwood*

K.S (%)	Waktu (jam)	Sampel			Kontrol		T.G.P (mg/ml)	\bar{X}	SD	
		Abs	Fp	K.X	Abs	K.X				
0,2	0	0,185	1	0,113	0,165	0,106	0,007	0,008	0,001	
		0,191	1	0,115	0,169	0,107	0,008			
	4	0,493	1	0,224	0,188	0,114	0,110	0,110	0,001	
		0,495	1	0,225	0,188	0,114	0,111			
	8	0,656	1	0,283	0,17	0,108	0,175	0,177	0,002	
		0,675	1	0,290	0,18	0,111	0,178			
	12	0,653	1,25	0,352	0,17	0,108	0,245	0,249	0,007	
		0,674	1,25	0,362	0,17	0,108	0,254			
	16	0,728	1,25	0,386	0,203	0,120	0,266	0,263	0,004	
		0,713	1,25	0,379	0,201	0,119	0,260			
	20	0,644	1,43	0,398	0,186	0,114	0,285	0,286	0,002	
		0,65	1,43	0,401	0,185	0,113	0,288			
	0,4	0	0,188	1	0,114	0,172	0,109	0,006	0,005	0,001
			0,195	1	0,117	0,183	0,112	0,004		
4		0,755	1	0,319	0,209	0,122	0,197	0,209	0,017	
		0,817	1	0,341	0,203	0,120	0,221			
8		0,404	2	0,384	0,183	0,112	0,272	0,256	0,023	
		0,362	2	0,354	0,188	0,114	0,240			
12		0,533	2	0,477	0,190	0,115	0,362	0,359	0,005	
		0,524	2	0,471	0,190	0,115	0,356			
16		0,622	2	0,541	0,217	0,125	0,417	0,422	0,007	
		0,634	2	0,550	0,213	0,123	0,427			
20		0,628	2	0,546	0,198	0,118	0,428	0,416	0,017	
		0,596	2	0,523	0,199	0,118	0,404			
0,6		0	0,197	1	0,118	0,194	0,116	0,001	0,001	0,000
			0,196	1	0,117	0,194	0,116	0,001		
	4	0,955	1	0,391	0,221	0,126	0,265	0,267	0,004	
		0,755	1,25	0,398	0,228	0,129	0,270			
	8	0,493	2	0,448	0,192	0,116	0,333	0,361	0,041	
		0,581	2	0,512	0,209	0,122	0,390			
	12	0,718	2	0,611	0,197	0,118	0,493	0,488	0,008	
		0,705	2	0,601	0,201	0,119	0,482			
	16	0,843	2	0,701	0,233	0,130	0,570	0,568	0,003	
		0,835	2	0,695	0,228	0,129	0,566			
	20	0,958	2	0,784	0,196	0,117	0,667	0,627	0,056	
		0,849	2	0,705	0,196	0,117	0,588			

K.S (%)	Waktu (jam)	Sampel			Kontrol		T.G.P (mg/ml)	\bar{X}	SD	
		Abs	Fp	K.X	Abs	K.X				
0,8	0	0,222	1	0,127	0,189	0,115	0,012	0,010	0,002	
		0,215	1	0,124	0,190	0,115	0,009			
	4	0,720	1	0,306	0,240	0,133	0,173	0,181	0,011	
		0,760	1	0,320	0,235	0,131	0,189			
	8	0,640	2	0,554	0,213	0,123	0,431	0,443	0,017	
		0,674	2	0,579	0,213	0,123	0,456			
	12	0,835	2	0,695	0,225	0,128	0,567	0,569	0,002	
		0,838	2	0,697	0,222	0,127	0,571			
	16	0,680	2,5	0,729	0,246	0,135	0,594	0,609	0,021	
		0,715	2,5	0,761	0,250	0,137	0,624			
	20	0,825	2,5	0,860	0,226	0,128	0,732	0,736	0,006	
		0,835	2,5	0,869	0,226	0,128	0,741			
	1	0	0,234	1	0,131	0,222	0,127	0,004	0,006	0,003
			0,240	1	0,133	0,216	0,124	0,009		
4		0,716	1,67	0,508	0,250	0,137	0,371	0,390	0,027	
		0,782	1,67	0,547	0,255	0,138	0,409			
8		0,680	2	0,583	0,228	0,129	0,455	0,482	0,039	
		0,757	2	0,639	0,230	0,129	0,509			
12		0,652	2,5	0,704	0,226	0,128	0,576	0,586	0,015	
		0,675	2,5	0,725	0,226	0,128	0,597			
16		0,768	2,5	0,808	0,276	0,146	0,662	0,660	0,003	
		0,762	2,5	0,803	0,274	0,145	0,658			
20		0,843	2,5	0,876	0,261	0,141	0,735	0,728	0,010	
		0,824	2,5	0,859	0,253	0,138	0,721			
1,2		0	0,331	1	0,166	0,249	0,136	0,030	0,026	0,005
			0,295	1	0,153	0,234	0,131	0,022		
	4	0,511	1,67	0,385	0,260	0,140	0,244	0,254	0,014	
		0,55	1,67	0,408	0,271	0,144	0,264			
	8	0,768	2	0,647	0,226	0,128	0,519	0,538	0,027	
		0,814	2	0,680	0,211	0,123	0,557			
	12	0,703	2,5	0,750	0,285	0,149	0,601	0,607	0,008	
		0,715	2,5	0,761	0,282	0,148	0,612			
	16	0,795	2,5	0,833	0,283	0,149	0,684	0,684	0,000	
		0,795	2,5	0,833	0,283	0,149	0,684			
	20	0,833	2,5	0,867	0,293	0,152	0,714	0,714	0,000	
		0,842	2,5	0,875	0,317	0,161	0,714			

K.S: Konsentrasi Sampel; Abs: Absorbansi; Fp: Faktor pengenceran; K.X: Kadar

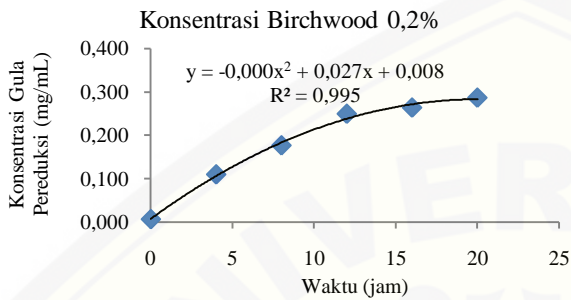
Xilosa; T.G.P: Total Gula Pereduksi; \bar{X} : rerata; SD: Standar Deviasi

a. Mencari V_0 dengan menurunkan persamaan garis

$$y = a + bx + cx^2$$

$$y(t = 0) = a + bt + ct^2$$

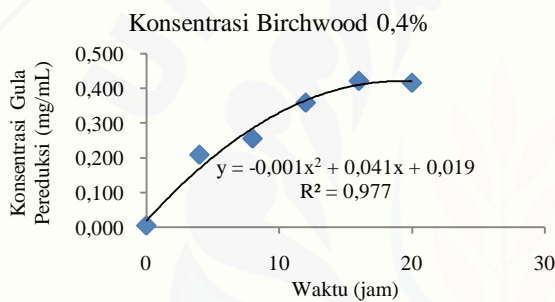
$$v(t = 0), \text{ maka } \frac{dy}{dt} = b + 2ct$$



$$y = 0,000x^2 + 0,027x + 0,008$$

$$V_0(t = 0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = 2 * 0,00x + 0,027$$

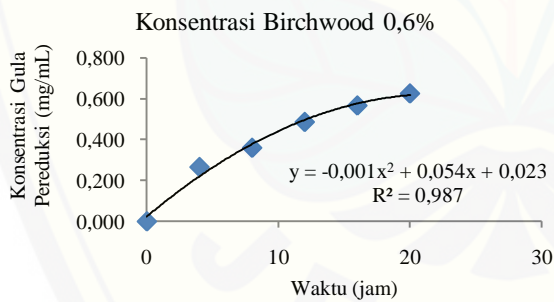
$$V_0 = 0,027$$



$$y = -0,001x^2 + 0,041x + 0,019$$

$$V_0(t = 0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = -0,002x + 0,041$$

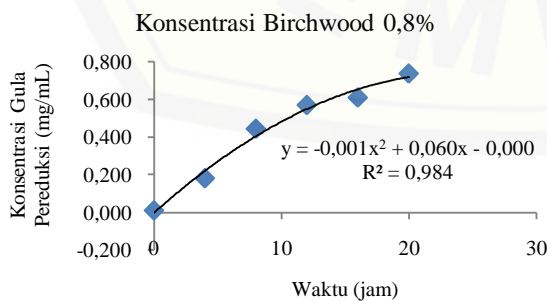
$$V_0 = 0,041$$



$$y = -0,001x^2 + 0,054x + 0,023$$

$$V_0(t = 0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = -0,002x + 0,054$$

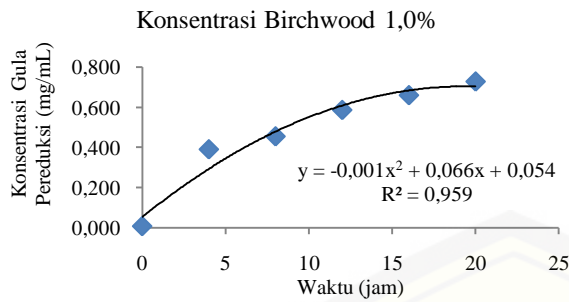
$$V_0 = 0,054$$



$$y = -0,001x^2 + 0,060x - 0,000$$

$$V_0(t = 0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = -0,002x + 0,060$$

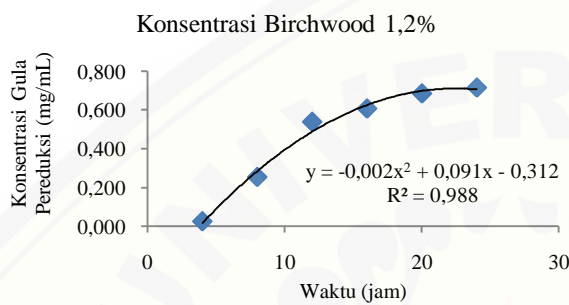
$$V_0 = 0,060$$



$$y = -0,001x^2 + 0,066x + 0,013$$

$$V_0(t=0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = -0,002x + 0,066$$

$$V_0 = 0,066$$



$$y = -0,002x^2 + 0,091x - 0,312$$

$$V_0(t=0) \Rightarrow \frac{dy}{dt} = -0,002x + 0,091$$

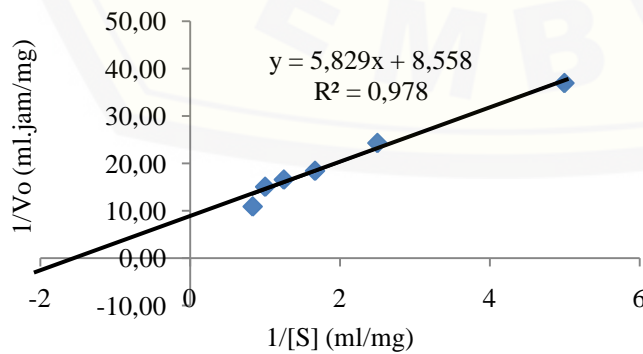
$$V_0 = 0,091$$

b. Perhitungan Nilai K_M dan V_{max} dengan Garis Linear Kurva Liviweaver

Bulk

[S] (mg/ml)	V_0 (mg/ml.jam)	1/[S] (ml/mg)	1/ V_0 (ml.jam/mg)
0,2	0,027	5	37,04
0,4	0,041	2,5	24,39
0,6	0,054	1,67	18,52
0,8	0,060	1,25	16,67
1	0,066	1	15,15
1,2	0,091	0,83	10,99

Kurva Liviweaver - Burk



$$y = mx + c$$

$$y = 5,829x + 8,558$$

Keterangan,

$$y = \frac{1}{V_0}, x = \frac{1}{[S]}$$

$$m = \frac{K_m}{V_{max}} = 5,829$$

$$c = \frac{1}{V_{max}} = 8,558$$

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

$$c = \frac{1}{V_{max}} = 8,558$$

$$V_{max} = \frac{1}{c} = \frac{1}{8,558} = 0,117 \text{ mg/ml.jam}$$

$$m = \frac{K_m}{V_{max}} = 5,829$$

$$\frac{K_m}{0,117} = 5,829$$

$$K_m = 5,829 \times 0,117$$

$$K_m = 0,681 \text{ mg/ml}$$

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_0]} = \frac{0,117 \text{ mg}}{\text{ml.jam}} : \frac{0,046 \text{ mg}}{\text{ml}}$$

$$k_{cat} = \frac{0,117 \text{ mg}}{\text{ml}} \times \frac{\text{ml}}{0,046 \text{ mg}} \times \frac{1}{3600 \text{ s}}$$

$$k_{cat} = 7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}}{0,681 \text{ mg/ml}} = 1 \times 10^{-3} \text{ ml/mg.s}$$

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

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

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

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

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

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

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

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

c. Konversi satuan

$$V_{max} = \frac{1}{c} = \frac{1}{8,558} = 0,117 \text{ mg/ml.jam}$$

$$= \frac{0,117 \text{ mg}}{\text{ml.jam}} \times \frac{1 \text{ jam}}{60 \text{ menit}} \times \frac{1 \text{ mol}}{150,3 \text{ g}} \times \frac{10^{-3} \text{ g}}{\text{mg}}$$

$$= 1,3 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{mol/ml.menit}$$

$$= \frac{1,3 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{mol}}{\text{ml.menit}} : \frac{0,046 \text{ mg}}{\text{ml}} = \frac{1,3 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{mol}}{\text{ml.menit}} \times \frac{\text{ml}}{0,046 \text{ mg}} = 28,3 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{mol/ml.mg}$$

protein