

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

Penentuan kondisi suhu dan lama inkubasi yang dapat memberikan hasil rerata kadar gula pereduksi dengan perbedaan signifikan antara sampel enzim xilanase dan kontrol, dilakukan menggunakan konsentrasi xilan 1 %. Pemilihan konsentrasi ini berdasarkan pada penelitian Isil dan Nilufer, 2005 yang menemukan bahwa konsentrasi optimum yang memberikan aktivitas enzim xilanase maksimum adalah 1 %.

Setelah data tersebut diuji secara statistik dengan menggunakan uji-t, ternyata dengan waktu inkubasi 1 jam pada suhu kamar dan 50°C memberikan kadar gula pereduksi yang tidak berbeda nyata ($P \geq 0.05$) antara sampel dengan kontrol. Waktu inkubasi 24 jam pada suhu kamar dan suhu 40°C selama 1 jam terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) antara sampel dan kontrol (data lengkap lihat lampiran 6).

Tabel 1. Kadar gula pereduksi hasil hidrolisis enzimatis 1 % xilan dengan ekstrak kasar *T. viride* TNJ63 pada berbagai kondisi suhu dengan waktu inkubasi 1 jam dan suhu kamar 24 jam.

Kondisi	Rerata kadar gula sampel ($\mu\text{g/mL}$) *	Rerata kadar gula kontrol ($\mu\text{g/mL}$) *	Uji-t pada $p = 0,05$	Kesimpulan
Suhu kamar selama 1 jam	18.3295 $\pm$ 8.1587	10.5305 $\pm$ 8.1819	t hitung < t tabel	Tidak ada perbedaan nyata ($p \geq 0,05$)
Suhu 40°C selama 1 jam	44.4968 $\pm$ 6.7765	17.4997 $\pm$ 8.0073	t hitung > t tabel	Ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)
Suhu 50°C selama 1 jam	41.6999 $\pm$ 17.4126	10.8915 $\pm$ 0.3281	t hitung < t tabel	Tidak ada perbedaan nyata ($p \geq 0,05$)
Suhu kamar selama 24 jam	55.8569 $\pm$ 2.4702	25.9319 $\pm$ 2.4849	t hitung > t tabel	Ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

* Perhitungan dari rata-rata empat kali pengulangan. Data lengkap lihat lampiran 6.

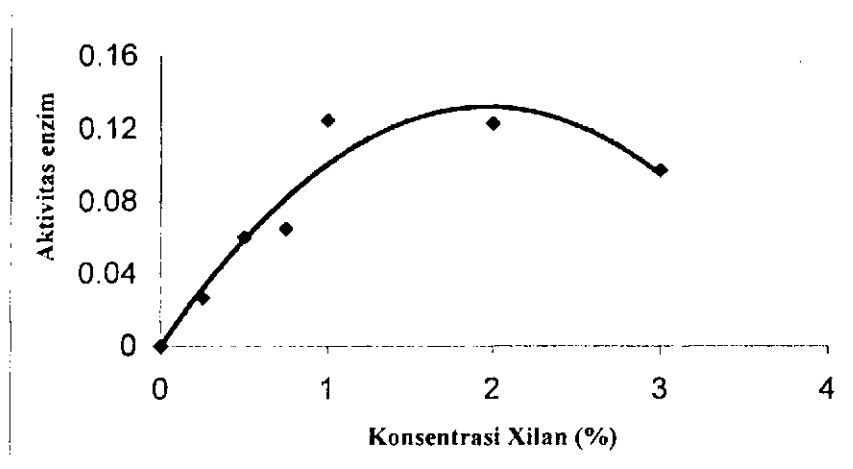
Untuk menentukan nilai V_{maks} dan K_M dari enzim xilanase dalam ekstrak kasar *T. viride* TNJ63 maka dilakukan pengukuran aktivitas enzim xilanase dengan waktu inkubasi 24 jam pada suhu kamar pada berbagai variasi konsentrasi xilan (Tabel 2).

Tabel 2. Rata-rata aktivitas enzim xilanase pada berbagai variasi konsentrasi substrat.

[S] (%)	Aktivitas enzim ($\mu\text{g} / \text{mL}$ enzim. menit) *
0.25	0.0264 ± 0.0013
0.5	0.0602 ± 0.0044
0.75	0.0648 ± 0.0012
1	0.1246 ± 0.0172
2	0.1228 ± 0.0053
3	0.0969 ± 0.0022

* untuk konsentrasi xilan 0,25 %; 0,5 %; 0,75 %; 2 %; dan 3 % dengan tiga kali pengulangan dan untuk 1 % empat kali pengulangan. Data lengkap lihat lampiran 7.

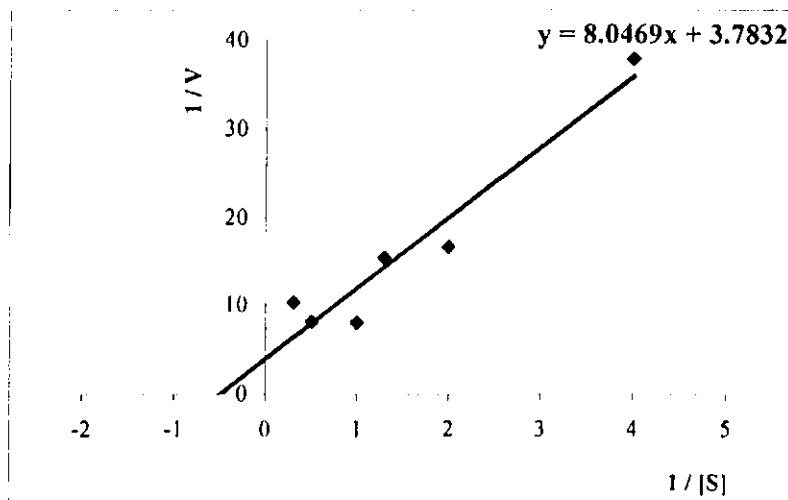
Data yang diperoleh dibuat kurva Michaelis-Menten (gambar 7), dan grafik Lineweaver-Burk (gambar 8).



Gambar 7. Grafik Michaelis-Menten untuk enzim xilanase *T. viride* TNJ63

Tabel 3. Nilai $1/V_o$ xilanase terhadap $1/[S]$ pada berbagai variasi nilai konsentrasi substrat xilan.

$1/[S]$	$1/V$
4	37.8788
2	16.6113
1.3	15.4321
1	8.0257
0.5	8.1433
0.3	10.3199



Gambar 8. Grafik Lineweaver-Burk untuk enzim xilanase *T. viride* TNJ63

Analisis grafik Lineweaver-Burk pada gambar 8 menghasilkan persamaan garis regresi $Y = 8.0469X + 3.7832$, sehingga dapat dihitung dan ditentukan nilai V_{maks} dan K_M dari enzim xilanase yaitu :

$$b = 1 / V_{maks}$$

$$3.7832 = 1 / V_{maks}$$

$$V_{maks} = 0.26 \mu\text{g gula pereduksi/mL enzim. menit}$$

Perpotongan sumbu X, dimana $Y = 0$

$$Y = 8.0469X + 3.7832$$

$$0 = 8.0469X + 3.7832$$

$$X = 8.0469/3.7832 = 0.477 \%$$

Kadar asam asetat yang dilepaskan dan diproduksi dengan tiga variasi suhu (suhu kamar, suhu 40°C, dan 50°C) dengan waktu inkubasi satu jam dan 24 jam pada konsentrasi kitin 1 % terlihat pada lampiran 9. Setelah data tersebut diuji secara statistik dengan menggunakan uji-t ternyata tidak ada yang memberikan perbedaan nyata ($P \geq 0.05$) antara sampel dan kontrol. Hal ini dirangkum pada tabel 4.

Tabel 4. Kadar asam asetat hasil hidrolisis enzimatis 1 % xilan dengan ekstrak kasar *T. viride* TNJ63 pada berbagai kondisi suhu dengan waktu inkubasi selama 1 jam dan suhu kamar 24 jam.

Kondisi	Rerata kadar Asam asetat sampel ($\mu\text{g/mL}$) *	Rerata kadar asam asetat kontrol ($\mu\text{g/mL}$) *	Uji-t pada $p = 0.05$	Kesimpulan
Suhu kamar selama 1 jam	124.1481 $\pm$ 5.0974	81.5951 $\pm$ 30.8788	t hitung < t tabel	Tidak ada perbedaan nyata ($p \geq 0,05$)
Suhu kamar selama 24 jam	342.2773 $\pm$ 155.4987	129.4919 $\pm$ 6.5401	t hitung < t tabel	Tidak ada perbedaan nyata ($p \geq 0,05$)
Suhu 40°C selama 1 jam	111.0558 $\pm$ 34.8321	84.4953 $\pm$ 27.6334	t hitung < t tabel	Tidak ada perbedaan nyata ($p \geq 0,05$)
Suhu 40°C selama 24 jam	492.5011 $\pm$ 431.2520	457.1984 $\pm$ 2.3382	t hitung < t tabel	Tidak ada perbedaan nyata ($p \geq 0,05$)
Suhu 50°C selama 1 jam	90.4511 $\pm$ 33.9497	56.3896 $\pm$ 16.8079	t hitung < t tabel	Tidak ada perbedaan nyata ($p \geq 0,05$)
Suhu 50°C selama 24 jam	763.3658 $\pm$ 242.7252	635.5572 $\pm$ 236.4716	t hitung < t tabel	Tidak ada perbedaan nyata ($p \geq 0,05$)

* Perhitungan dari rata-rata tiga kali pengulangan. Data lengkap lihat lampiran 9.

4.2. Pembahasan

Data kadar gula pereduksi hasil hidrolisis enzim xilanase dan kontrol dibandingkan dengan uji-t. Ternyata pada pH 5 dengan waktu inkubasi 1 jam pada suhu kamar dan 50°C tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P \geq 0.05$) antara sampel dengan kontrol. Untuk waktu inkubasi 24 jam pada suhu kamar dan 1 jam pada suhu 40°C terdapat perbedaan nyata ($p < 0.05$) antara sampel dan kontrol, sehingga disimpulkan untuk pengukuran aktivitas enzim xilanase inkubasi paling baik dilakukan pada suhu kamar selama 24 jam, atau suhu 40°C selama 1 jam. Pada inkubasi suhu 50°C selama 1 jam ternyata tidak ada perbedaan yang nyata ($p \geq 0.05$) produksi gula pereduksi antara sampel enzim xilanase dengan kontrol. Hal tersebut mungkin disebabkan pada suhu 50°C enzim xilanase mulai terdenaturasi, sehingga aktivitasnya rendah, atau tak ada sama sekali.

Produksi dan isolasi enzim menggunakan saringan filter steril dan ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditambahkan larutan NaN_3 0,02 % untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau mencegah rusaknya enzim (Sepridawati, 2002). Hal ini penting, terutama untuk penggunaan enzim yang diinkubasi dengan substrat pada suhu kamar selama 24 jam.

Pada penentuan absorbansi dari sampel maupun kontrol yang dilakukan dengan beberapa kali pengulangan, diperoleh data dengan simpangan yang cukup besar. Hal ini diduga karena ekstrak kasar enzim belum homogen, akibatnya jumlah enzim yang menghidrolisis substrat tersebut belum tentu sama pada setiap pengulangan. Faktor kesalahan dari simpangan yang besar ini dapat diminimalkan dengan melakukan pengulangan pengukuran aktivitas enzim.

Untuk *Trichoderma harzianum* 1073 D3 dilaporkan bahwa enzim xilanasenya memiliki aktivitas optimum pada pH 5 (Isil dan Nilufer, 2005). Nilai pH optimum ini diasumsikan sama untuk xilanase *T. viride* TNJ63. Oleh karena itu pada penelitian ini pengukuran aktivitas enzim xilanase dilakukan pada pH 5.

Nilai V_{maks} dan K_M dari ekstrak kasar enzim xilanase dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat yaitu: 0,25 %; 0,5 %; 0,75 %; 1 %; 2 %; dan 3 %. Hasil aktivitas enzim yang diperoleh kemudian dianalisa menggunakan metode analisis grafik Lineweaver-Burk, sehingga nilai dari K_M untuk enzim

xilanase dapat ditentukan yaitu 0,477 %. Hal ini menunjukkan bahwa diperlukan konsentrasi substrat sebesar 0,477 % untuk dapat mencapai kecepatan setengah maksimum, sehingga untuk mencapai kecepatan maksimum secara teoritis diperlukan konsentrasi substrat sebesar 0,954 %.

Nilai V_{maks} untuk enzim xilanase adalah 0,26 $\mu\text{g/mL}$ enzim.menit. Nilai ini berarti bahwa aktivitas awal enzim tertinggi adalah 0,26 $\mu\text{g/mL}$ enzim.menit. Setelah nilai itu kecepatan reaksi hampir tidak meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Keadaan ini disebabkan oleh kejenuhan enzim akan substrat, dimana seluruh pusat aktif telah berikatan dengan enzim membentuk kompleks enzim-substrat (ES) dan ES ini akan segera membentuk kembali enzim dan produk. Proses agitasi sangat dibutuhkan agar produk yang terbentuk segera lepas dari pusat aktif enzim tersebut dan substrat baru akan kembali berikatan dengan enzim. Penelitian ini ditemukan bahwa konsentrasi xilan optimum yang memberikan nilai V_{maks} adalah 0,954 %. Hal ini mendekati nilai yang ditemukan oleh Isil dan Nilufer (2005) untuk xilanase fungi *T. harzianum* 1073 D3 yaitu 1 %.

Aktivitas enzim deasetilase tidak menggunakan larutan bufer dan mematikan enzim tidak menggunakan asam HCl sebab yang diukur adalah asam asetat yang dilepaskan oleh kitin. Setelah kadar asam asetat ditentukan maka beda kadar asam asetat antara sampel dan kontrol dibandingkan dengan uji-t. Ternyata tidak ada kondisi suhu dan waktu inkubasi yang memberikan perbedaan nyata antara sampel dan kontrol. Sehingga aktivitas enzim deasetilase tidak dapat ditentukan, hal ini disebabkan metode yang digunakan tidak peka.