

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Aktivitas Enzim Selulase yang diproduksi dan direaksikan dengan substrat CMC

Pengujian aktivitas enzim ditentukan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui kadar gula pereduksi menggunakan DNS. Metode DNS dipilih selain karena sering digunakan juga hasil yang didapatkan lebih presisi. Gula pereduksi yang terbentuk menggambarkan aktivitas enzim selulase. Semakin tinggi aktivitas enzim maka semakin banyak pula gula reduksi yang dihasilkan, sehingga semakin tinggi pula nilai absorbansi yang terukur pada spektrofotometer (Solahuddin *et al.*, 2021).

Aktivitas enzim selulase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/ml. Satu unit merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah 1 μmol selulosa menjadi gula pereduksi per menit pada kondisi pengujian (Chasanah *et al.*, 2013).

Produksi enzim dilakukan 3 *batch* dengan 3 kali ulangan analisa. Setiap produksi enzim dilakukan analisa aktivitas enzim. Persamaan linear *batch* 1 yaitu $y = 0,0042x - 0,0497$ dimana x merupakan konsentrasi glukosa dan y merupakan nilai absorbansi dengan linear regresi (R^2) = 0,9746, persamaan linear *batch* 2 yaitu $y = 0,0058x - 0,0836$ dengan linear regresi (R^2) = 0,9787, dan persamaan linear *batch* 3 yaitu $y = 0,0061x - 0,0169$ dengan linear regresi (R^2) = 0,9653. Persamaan regresi linear tersebut kemudian digunakan untuk menghitung konsentrasi glukosa reduksi yang dihasilkan dari aktivitas enzim dengan substrat CMC. Konsentrasi glukosa akan digunakan untuk menghitung aktivitas selulase. Hasil perhitungan aktivitas enzim selulase dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Nilai Aktivitas enzim selulase yang diproduksi dan diuji dengan substrat CMC

<i>Batch</i>	Aktivitas Enzim (U/mL)	Aktivitas Enzim (U/mL) rerata dan Standar Deviasi	Kurva standar glukosa nilai R
1	0,41	0,64±0,21	0,97
2	0,7		0,97
3	0,82		0,96

Pengujian aktivitas enzim secara kuantitatif menunjukkan bahwa isolat enzim selulase yang diperoleh memiliki kemampuan dalam menghidrolisis selulosa pada substrat CMC membentuk gula reduksi yaitu glukosa. Rata-rata hasil uji aktivitas enzim yang didapat pada penelitian ini yaitu 0,64 U/mL. Menurut Solahuddin *et al.* (2021) enzim selulase dalam melakukan kerja kataliknya dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu diantaranya pH, suhu dan konsentrasi substrat.

Aktivitas enzim berjalan maksimal pada suhu yang sesuai. Ketika suhu bertambah sampai suhu yang tepat, maka kecepatan reaksi enzim naik karena energi kinetik bertambah. Bertambahnya energi kinetik akan mempercepat gerak vibrasi, translasi, dan rotasi baik enzim maupun substrat sehingga akan memperbesar peluang enzim dan substrat bereaksi. Namun, ketika suhu lebih tinggi maka protein berubah konformasi sehingga gugus reaktif terhambat. Denaturasi protein akan menyebabkan perubahan konformasi pada protein enzim. Substrat juga dapat berubah konformasinya pada suhu yang tidak sesuai, sehingga substrat tidak dapat masuk ke dalam sisi aktif enzim dan aktivitas enzim dapat menurun (Solahuddin *et al.*, 2021)

4.2. Uji Gula Pereduksi

Kandungan gula reduksi pada sampel akan bereaksi dengan larutan DNS yang awalnya berwarna kuning menjadi warna jingga kemerahan. Semakin gelap warna DNS menunjukkan bahwa semakin banyak pula jumlah gula reduksi (Kusmiati dan Agustini, 2010). Kadar gula reduksi berbanding lurus dengan nilai aktivitas enzim.

Hasil analisa keragaman menunjukkan bahwa konsentrasi enzim, waktu hidrolisis, dan interaksi kedua perlakuan berpengaruh nyata terhadap gula pereduksi (Lampiran 4. Tabel 1). Berdasarkan uji lanjut Duncan pengaruh

konsentrasi enzim dan waktu hidrolisis terhadap gula pereduksi (Tabel 4.2.), gula pereduksi dihasilkan dengan menggunakan selulase 100% lebih besar dibandingkan dengan menggunakan selulase 50%. Peningkatan gula reduksi terjadi secara signifikan.

Tabel 4.2. Uji Lanjut Beda Jarak Nyata Duncan Pengaruh Konsentrasi Enzim terhadap Gula Pereduksi

Konsentrasi Selulase	Gula Pereduksi		
	(mg/mL)	JNTD _{0,05}	BJND _{0,05}
Selulase 50%	36,82		a
Selulase murni 100%	57,26	0,534	b

Keterangan : Perlakuan yang diikuti huruf yang sama pada kolom BJND_{0,05} menunjukkan berbeda tidak nyata ($p>0,05$).

Menurut Sutikno *et al.* (2016), peningkatan konsentrasi enzim menyebabkan substrat yang berikatan dengan lokasi aktif enzim akan semakin banyak, sehingga jumlah gula reduksi yang dihasilkan akan semakin banyak. Kadar gula reduksi semakin meningkat berbanding lurus dengan semakin tingginya konsentrasi enzim.

Hasil uji lanjut Duncan pengaruh waktu hidrolisis terhadap gula pereduksi dapat dilihat pada Tabel 4.3. Penambahan waktu hidrolisis setiap satu jam dapat meningkatkan nilai gula pereduksi secara signifikan. Selama 4 jam hidrolisis, peningkatan nilai gula reduksi secara signifikan terjadi semakin besar pada waktu hidrolisis yang lebih lama.

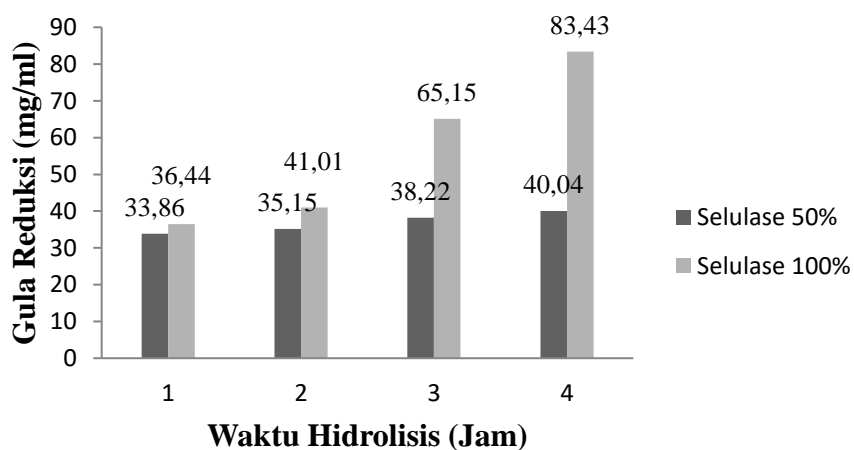
Tabel 4.3. Uji Lanjut Beda Jarak Nyata Duncan Pengaruh Waktu Hidrolisis terhadap Gula Pereduksi

Waktu Hidrolisis (jam)	Gula Pereduksi		
	(mg/ml)	JNTD _{0,05}	BJND _{0,05}
1	35,15		a
2	38,08	2,283	b
3	51,7	2,397	c
4	61,73	2,46	d

Keterangan : Perlakuan yang diikuti huruf yang sama pada kolom BJND_{0,05} menunjukkan berbeda tidak nyata ($p>0,05$).

Kadar glukosa terbesar diperoleh pada waktu hidrolisis selama 4 jam yaitu 61,73 mg/mL sedangkan nilai terendah didapat pada waktu hidrolisis selama 1 jam yaitu 35,15 mg/mL. Semakin lama waktu hidrolisis, maka kadar glukosa yang dihasilkan semakin tinggi karena peningkatan aktivitas produksi enzim selulase (Oktavia *et al.*, 2014)

Hasil uji lanjut Duncan pengaruh interaksi antara konsentrasi enzim selulase dan waktu hidrolisis terhadap gula pereduksi ditunjukkan pada Gambar 4.1. Glukomanan yang dihidrolisis dengan enzim selulase 50% selama 1 jam menghasilkan glukosa paling rendah. Selama 4 jam hidrolisis, peningkatan glukosa secara signifikan terjadi semakin besar pada konsentrasi enzim selulase 100 %.



Gambar 4.1. Histogram pengaruh interaksi konsentrasi enzim selulase dengan waktu hidrolisis terhadap gula pereduksi.

Menurut Gayang (2013) glukosa yang dihasilkan dengan konsentrasi 0,5% selulase lebih banyak daripada 0,25% selulase. Menurut Kodri (2013), pada dasarnya mekanisme pemotongan rantai ikatan oleh enzim selulase sangat kompleks karena melibatkan sinergitas kerja 3 komponen besar yaitu endo -1,4-glukanase, ekso -1,4-glukanase dan glukosidase. Enzim endo -1,4-glukanase menghidrolisis polimer secara acak dan menghasilkan molekul selulosa sederhana. Selulosa sederhana dihidrolisis oleh ekso -1,4-glukanase pada bagian ujung sehingga menghasilkan selobiosa disakarida. Selanjutnya selobiosa dihidrolisis oleh enzim glukosidase menjadi glukosa.

4.3. Viskositas *Apparent*

Menurut Yanuriati *et al.* (2017), glukomanan alami memiliki viskositas *apparent* yang paling tinggi sehingga jika diaplikasikan sebagai pembentuk gel atau pengental pada makanan akan membutuhkan konsentrasi yang rendah.

Analisa keragaman hanya dilakukan untuk sampel glukomanan yang diberi perlakuan enzim. Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa konsentrasi enzim, lama hidrolisis berpengaruh nyata terhadap viskositas *apparent*, tetapi interaksi kedua perlakuan berpengaruh tidak nyata terhadap viskositas *apparent*. Pada penelitian ini viskositas *apparent* dengan selulase 50% adalah 186.333 cps dan viskositas *apparent* dengan selulase 100% adalah 140.567 cps. Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan pengaruh konsentrasi enzim terhadap viskositas *apparent* (Tabel 4.4), penambahan konsentrasi selulase dapat menurunkan viskositas *apparent* secara signifikan.

Tabel 4.4. Uji Lanjut Beda Jarak Nyata Duncan Pengaruh Konsentrasi Enzim terhadap Viskositas *Apparent*

Konsentrasi Selulase	Viskositas		
	Apparent (cps)	JNTD _{0,05}	BJND _{0,05}
Selulase 50%	186.333		a
Selulase 100%	140.567	32.202	b

Keterangan : Perlakuan yang diikuti huruf yang sama pada kolom BJND_{0,05} menunjukkan berbeda tidak nyata ($p > 0,05$).

Hasil uji lanjut Duncan pengaruh waktu hidrolisis terhadap viskositas *apparent* dapat dilihat pada Tabel 4.5. Penambahan waktu hidrolisis setiap 1 jam dapat menurunkan nilai viskositas *apparent* secara signifikan. Selama 4 jam hidrolisis, penurunan viskositas *apparent* secara signifikan terjadi semakin besar pada waktu hidrolisis yang lebih lama.

Tabel 4.5. Uji lanjut Beda Jarak Nyata Duncan Pengaruh Waktu Hidrolisis terhadap Viskositas *Apparent*

Waktu Hidrolisis (Jam)	Viskositas <i>Apparent</i> (cps)	JNTD 0,05	BJND _{0,05}
1	225.800		a
2	210.667	45.541	a
3	140.533	47.818	b
4	76.800	49.032	c

Keterangan : Perlakuan yang diikuti huruf yang sama pada kolom BJND_{0,05} menunjukkan berbeda tidak nyata ($p > 0,05$).

Berdasarkan Tabel 4.4. waktu hidrolisis berpengaruh signifikan terhadap penurunan viskositas *apparent*. Menurut Lee *et al.* (2015), Perubahan viskositas *apparent* dapat dikorelasikan dengan perubahan interaksi inter- dan intrapolimer serta perubahan konformasi polimer dalam larutan aqueous.

Menurut Jin *et al.* (2014), viskositas *apparent* menurun seiring dengan peningkatan laju geser pada sebagian besar sampel. Glukomanan dapat larut dalam air (Jiang *et al.*, 2018). Glukomanan dalam air akan terhidrasi sehingga rantainya mengalami pengembangan lebih terbuka. Pengembangan rantai polimer semakin besar terjadi pada konsentrasi yang lebih rendah. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, ruang bebas rantai molekul polimer akan menjadi semakin sempit, sehingga interaksi antar dan interpolimer terjadi semakin meningkat (Luo *et al.*, 2013). Peningkatan interaksi polimer tersebut menyebabkan peningkatan ikatan hidrogen, tumpang tindih (*overlapping*) dan *entanglement* rantai glukomanan. Peningkatan ikatan hidrogen inter- dan intrapolimer, *overlapping* dan *entanglement* rantai glukomanan menyebabkan viskositas *apparent* meningkat (Luo *et al.*, 2013; He *et al.*, 2012).

5.4. Viskositas Intrinsik

Menurut Zikrillah *et al.* (2023), viskositas intrinsik adalah rasio antara viskositas spesifik dengan konsentrasi zat terlarut yang diekstrapolasi sampai konsentrasi mendekati nol. Hidrolisis glukomanan menyebabkan panjang rantai polimer berkurang sehingga viskositas intrinsik lebih rendah.

Hasil analisa keragaman menunjukkan bahwa konsentrasi enzim, waktu hidrolisis berpengaruh nyata terhadap viskositas intrinsik tetapi interaksi kedua perlakuan berpengaruh tidak nyata. Berdasarkan uji lanjut Duncan pengaruh konsentrasi enzim terhadap viskositas intrinsik (Tabel 4.6), penambahan konsentrasi selulase 100% dapat menurunkan viskositas intrinsik secara signifikan.

Tabel 4.6. Uji Lanjut Beda Jarak Nyata Duncan Pengaruh Konsentrasi Enzim terhadap Viskositas Intrinsik

Konsentrasi Selulase	Viskositas Intrinsik		
	(ml/g)	JNTD _{0,05}	BJND _{0,05}
Selulase 50%	12,34		a
Selulase 100%	7,84	0,42	b

Keterangan : Perlakuan yang diikuti huruf yang sama pada kolom BJND_{0,05} menunjukkan berbeda tidak nyata ($p > 0,05$).

Konsentrasi selulase 100% menyebabkan hidrolisis berlangsung lebih cepat sehingga lebih banyak ikatan glikosidik dalam glukomanan dipecah menjadi lebih kecil. Polimer yang pendek memiliki viskositas intrinsik yang lebih rendah karena polimer yang lebih pendek memiliki lebih sedikit struktur berliku dan cabang yang mempengaruhi viskositas. Enzim selulase pada proses hidrolisis glukomanan dapat memutus ikatan β -1,4 glikosidik sehingga mengubah polisakarida menjadi oligosakarida atau monosakarida (Jiang *et al.*, 2018). Menurut Al-Ghazewi *et al.* (2007), viskositas intrinsik yang optimal diperoleh dari perlakuan konsentrasi enzim selulase 15 mg/ml selama 3 jam.

Hasil uji lanjut Duncan pengaruh waktu hidrolisis terhadap viskositas intrinsik dapat dilihat pada Tabel 4.7. Penambahan waktu hidrolisis setiap 1 jam dapat menurunkan nilai viskositas intrinsik secara signifikan. Selama 4 jam waktu hidrolisis, penurunan viskositas intrinsik secara signifikan terjadi semakin besar.

Tabel 4.7. Uji lanjut Beda Jarak Nyata Duncan Pengaruh Waktu Hidrolisis terhadap Viskositas Intrinsik

Waktu Hidrolisis (Jam)	Viskositas Intrinsik (ml/g)	JNTD 0,05	BJND _{0,05}
1	13,90		a
2	10,78	2,06	b
3	8,95	2,16	c
4	6,70	2,21	d

Keterangan : Perlakuan yang diikuti huruf yang sama pada kolom BJND_{0,05} menunjukkan berbeda tidak nyata ($p > 0,05$).

Berdasarkan Tabel 4.7. nilai viskositas intrinsik terkecil yaitu 6,70 ml/g selama 4 jam waktu hidrolisis. Selulase bekerja dengan menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik yang menghubungkan unit-unit glukosa dan manosa dalam glukomanan. Semakin lama waktu hidrolisis, ikatan glikosidik akan lebih banyak terputus dan menghasilkan fragmen yang lebih kecil sehingga interaksi antar molekul berkurang dan mengurangi nilai viskositas intrinsik. Semakin lama waktu hidrolisis memberikan kesempatan enzim selulase untuk berinteraksi dengan substrat semakin tinggi sehingga glukomanan semakin mudah dan banyak terhidrolisis.

5.5. Berat Molekul

Berdasarkan Al-Ghazzewi dan Tester (2012), polisakarida glukomanan dapat dihidrolisis dengan enzim salah satunya adalah selulase menjadi molekul dengan berat lebih rendah. Selulase menghidrolisis β -1,4- glikosidik residu glukosa yang terikat. Berat molekul hidrolisat bergantung pada lama hidrolisis.

Hasil analisa keragaman menunjukkan bahwa konsentrasi enzim, waktu hidrolisis berpengaruh nyata terhadap berat molekul tetapi interaksi kedua perlakuan berpengaruh tidak nyata. Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan pengaruh konsentrasi enzim terhadap berat molekul (Tabel 4.8), penambahan konsentrasi selulase 100% dapat menurunkan berat molekul glukomanan secara signifikan.

Tabel 4.8. Uji Lanjut Beda Jarak Nyata Duncan Pengaruh Konsentrasi Enzim terhadap Berat Molekul

Konsentrasi Selulase	Berat Molekul		
	(Da)	JNTD _{0,05}	BJND _{0,05}
Selulase 50%	102,47		a
Selulase 100%	80,07	6,33	b

Keterangan : Perlakuan yang diikuti huruf yang sama pada kolom BJND_{0,05} menunjukkan berbeda tidak nyata ($p > 0,05$).

Peningkatan konsentrasi selulase pada hidrolisis glukomanan menyebabkan berat molekul semakin kecil karena konsentrasi enzim yang lebih tinggi mempercepat laju reaksi hidrolisis sehingga selulase memutuskan ikatan glikosidik dalam polimer glukomanan. Polimer yang lebih pendek memiliki berat molekul yang lebih rendah karena jumlah unit glukosa dan manosa dalam setiap rantai polimer berkurang. Menurut Al-Ghazewi *et al.* (2007), selulase menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik pada glukomanan menghasilkan oligosakarida atau monosakarida yang memiliki berat molekul yang lebih rendah.

Hasil uji lanjut Duncan pengaruh waktu hidrolisis terhadap berat molekul dapat dilihat pada Tabel 4.9. Penambahan waktu hidrolisis setiap 1 jam dapat menurunkan nilai berat molekul glukomanan secara signifikan. Selama 4 jam hidrolisis, penurunan berat molekul secara signifikan terjadi semakin besar pada waktu hidrolisis yang lebih lama.

Tabel 4.9. Uji lanjut Beda Jarak Nyata Duncan Pengaruh Waktu Hidrolisis terhadap Berat Molekul

Waktu Hidrolisis (Jam)	Berat Molekul		
	(Da)	JNTD _{0,05}	BJND _{0,05}
1	108,92		a
2	95,47	8,95	b
3	86,79	9,39	c
4	73,92	9,63	d

Keterangan : Perlakuan yang diikuti huruf yang sama pada kolom BJND_{0,05} menunjukkan berbeda tidak nyata ($p > 0,05$).

Peningkatan waktu hidrolisis glukomanan dengan selulase dapat menyebabkan berat molekul polimer glukomanan semakin kecil karena enzim selulase memiliki lebih banyak waktu untuk bekerja pada polimer glukomanan yang menyebabkan

pemutusan ikatan glikosidik lebih banyak. Berat molekul rata-rata glukomanan yang dihidrolisis secara enzimatik dengan beberapa variasi waktu mengalami penurunan signifikan (Chen *et al.*, 2016). Menurut Jiang *et al.* (2018), Enzim selulase (β -glukanase) menghidrolisis glukomanan pada ikatan β -1,4-glikosidik dengan berat molekul rendah untuk memaksimalkan kemampuan prebiotik yang tinggi sehingga menghasilkan manooligosakarida.

5.6. Transparansi Gel Glukomanan

Menurut Yanuriati dan Basir. (2020), transparansi (kebeningan) sol yang tinggi merupakan faktor penting agar aplikasinya pada produk tidak berpengaruh terhadap penampakan produk. Sol glukomanan alami dengan proses isolasi yang dilakukan nampak memiliki transparansi yang tinggi.

Hasil analisa keragaman menunjukkan bahwa konsentrasi enzim, waktu hidrolisis, dan interaksi kedua perlakuan berpengaruh nyata terhadap transparansi gel. Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan pengaruh konsentrasi enzim terhadap absorbansi gel (Tabel 4.10), penambahan konsentrasi selulase 100% dapat menurunkan absorbansi gel glukomanan secara signifikan. Semakin kecil nilai absorbansi maka nilai transparansi semakin besar.

Tabel 4.10. Uji Lanjut Beda Jarak Nyata Duncan Pengaruh Konsentrasi Enzim terhadap Transparansi Sol Glukomanan

Konsentrasi Selulase	Absorbansi	JNTD _{0,05}	BJND _{0,05}
Selulase 50%	0,97		a
Selulase 100%	0,47	0,0065	b

Keterangan : Perlakuan yang diikuti huruf yang sama pada kolom BJND_{0,05} menunjukkan berbeda tidak nyata ($p>0,05$).

Penurunan transparansi gel dapat disebabkan oleh konsentrasi selulase. Berdasarkan Tabel 4.10, transparansi gel konsentrasi selulase 100% memiliki nilai absorbansi 0,47 dan konsentrasi selulase 50% memiliki absorbansi 0,97. Peningkatan konsentrasi selulase pada hidrolisis glukomanan dapat menyebabkan transparansi gel glukomanan semakin kecil karena efek dari perubahan struktural dalam gel dan peningkatan jumlah fragmen yang lebih kecil dalam gel tersebut.

Hasil uji lanjut Duncan pengaruh waktu hidrolisis terhadap transparansi gel dapat dilihat pada Tabel 4.11. Penambahan waktu hidrolisis setiap 1 jam dapat menurunkan nilai absorbansi glukomanan secara signifikan. Selama 4 jam hidrolisis, penurunan absorbansi secara signifikan terjadi semakin besar pada waktu hidrolisis yang lebih lama.

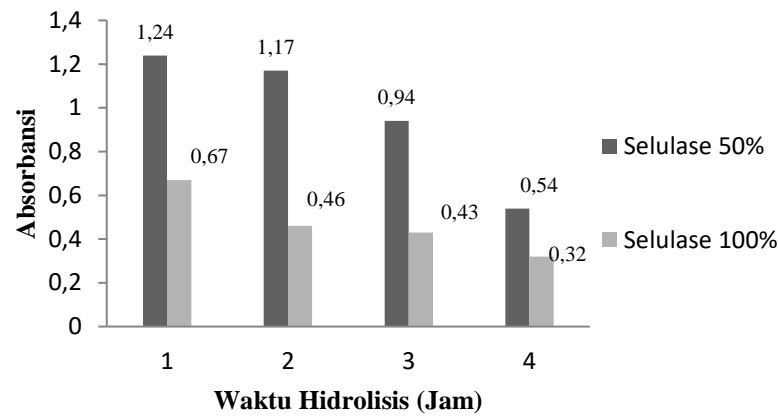
Tabel 4.11. Uji lanjut Beda Jarak Nyata Duncan Pengaruh Waktu Hidrolisis terhadap Berat Molekul

Waktu Hidrolisis (Jam)	Absorbansi	JNTD 0,05	BJND _{0,05}
1	0,95		a
2	0,81	0,0092	b
3	0,69	0,0096	c
4	0,43	0,0099	d

Keterangan : Perlakuan yang diikuti huruf yang sama pada kolom BJND_{0,05} menunjukkan berbeda tidak nyata ($p>0,05$).

Nilai rata-rata transparansi gel dapat dilihat pada Tabel 4.11. Waktu hidrolisis berpengaruh terhadap transparansi gel. Peningkatan waktu hidrolisis glukomanan dengan selulase yang menyebabkan penurunan absorbansi gel glukomanan yang disebabkan oleh perubahan struktural yang terjadi pada gel selama proses hidrolisis. Semakin kecil nilai absorbansi maka transparansi semakin meningkat. Glukomanan yang memiliki berat molekul yang lebih rendah akan lebih bebas bergerak tanpa tumpang tindih (Ojima *et al.*, 2009) dan mengalami pengembangan lebih besar pada konsentrasi yang lebih rendah (Long *et al.*, 2010).

Hasil uji lanjut Duncan pengaruh interaksi antara konsentrasi selulase dan waktu hidrolisis terhadap absorbansi gel ditunjukkan pada Gambar 4.3. Glukomanan yang dihidrolisis dengan selulase 50% selama 1 jam memiliki absorbansi paling tinggi. Selama 4 jam hidrolisis, penurunan absorbansi glukomanan secara signifikan terjadi semakin besar pada konsentrasi yang lebih besar.



Gambar 4.2. Histogram pengaruh interaksi konsentrasi enzim selulase dengan waktu hidrolisis terhadap transparansi

Peningkatan konsentrasi selulase dan lama waktu hidrolisis dalam hidrolisis glukomanan dengan selulase dapat menyebabkan penurunan absorbansi gel glukomanan. Menurut Ojima *et al.* (2009), pada konsentrasi yang lebih tinggi interaksi antara polimer tumpang tindih (*overlap*) satu sama lain akan meningkat sampai akhirnya mengalami pengerutan pada konsentrasi kritis dimana koil polimer mencapai ukuran terbatas yang dapat mempengaruhi penurunan transparansi glukomanan.