

Lampiran 1. Komposisi Media untuk Produksi Enzim Selulase (Andreoti, 1980)

Bahan	Konsentrasi
Air suling	1000 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,14 % (w/v)
KH_2PO_4	0,20 % (w/v)
Urea	0,03 % (w/v)
CaCl_2	0,03 % (w/v)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03 % (w/v)
Stok mineral*	1 ml
Selulosa, turunan selulosa atau laktosa**	1,0 % (w/v)
Pepton	0,1 % (w/v)

* Komposisi Stok Mineral

- 495,0 ml air suling
- 5,0 ml HCl pkt
- 2,5 g FeSO_4
- 0,98 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ atau 0,89 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 0,83 g ZnCl_2 atau 1,76 g $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 1,0 g CoCl_2 atau 1,25 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

** Rhizoma Alang-alang (*Imperata cylindrica*)

Lampiran 2. Prosedur Pembuatan Pereaksi untuk Analisa Aktivitas Enzim Selulase

1. Larutan CMC 1 %

10 gram CMC (Carboxymethyl Celulosa) dilarutkan dalam 800 ml air panas (80-90°C) dengan jalan menambahkan bubuk CMC secara perlahan-lahan disertai dengan pengadukan yang terus-menerus. Ditambah 100 ml 0,05 M buffer sitrat pH 4,8 dan 10,0 ml 1% Merthiolate. Diencerkan menjadi 1 lt dan didinginkan dalam refrigerator. Sebelum digunakan dipanaskan pada suhu 50°C, dan kocok dengan rata.

2. Larutan Buffer Sitrat

Larutan 0,05 M Na-sitrat dicampur dengan larutan 0,05 M asam sitrat dengan perbandingan 27 : 23, maka akan diperoleh larutan buffer sitrat pH 4,8 pada konsentrasi 0,05 M

3. Larutan Salicin 1 %

Salicin sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 80 ml larutan buffer sitrat 0,05 M pH 4,8 pada penangas air 50°C, selanjutnya ditambahkan lagi larutan buffer sitrat 0,05 M pH 4,8 untuk menetapkan volumenya menjadi 100 ml. Larutan ini disimpan di lemari pendingin dan dipanaskan 50°C sebelum digunakan.

Lampiran 3. Prosedur Pembuatan Pereaksi untuk Analisa Gula Reduksi

1. Pereaksi DNS (3,5-dinitrosalicylic Acid)

DNS sebanyak 10,6 gram dan NaOH sebanyak 19,8 gram dilarutkan ke dalam 1416 ml aquades. Setelah larut sempurna ditambahkan 306 gram Potasium Sodium Tartrat, 7,6 ml phenol (dicairkan dulu pada suhu 50°C) dan 8,3 gram Natrium Metabisulfit. Campuran ini kemudian ditentukan keasamannya, sebanyak 3 ml dari campuran pereaksi DNS diambil dan dititrasikan dengan HCl 0,1 N menggunakan indikator phenolptalein, biasanya sekitar 5 - 6 ml larutan HCl. Selanjutnya ditambahkan NaOH bila dibutuhkan sejumlah 2 gram untuk setiap ml kekurangan penggunaan HCl 0,1 N pada titrasi ($2,0 \text{ g NaOH} \approx 1 \text{ ml HCl } 0,1 \text{ N}$)

2. Larutan Gula Standar

Larutan standar glukosa pada konsentrasi dengan selang 0,02 - 0,5 mg/ml dalam buffer sitrat 0,05 M (pH 4,8) digunakan untuk membuat kurva standar gula pereduksi. Sebanyak masing-masing 1 ml larutan gula standar (sekitar 10 tabung reaksi) direaksikan dengan 3 ml pereaksi DNS lalu dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit dan didinginkan hingga suhu kamar. Selanjutnya dibaca pada spektrofotometer ($\lambda = 550 \text{ nm}$) dengan skala absorbansi 0 - 1.

Lampiran 4. Prosedur Analisa Bahan Baku

1. Analisa Kadar Selulosa (SNI 14-0444-1989)

Sejumlah contoh sebanyak tiga gram ditimbang, kemudian dipindahkan ke dalam gelas piala 250 ml dan ditambahkan larutan NaOH 17,5% sebanyak 15 ml. Penambahan dilakukan di dalam bak perendam pada suhu 20°C sambil dilakukan pengadukan selama 1 menit. Selanjutnya ditambahkan larutan NaOH 17,5% sebanyak 10 ml dan diaduk selama 45 detik. Penambahan 10 ml NaOH 17,5% berikutnya disertai pengadukan 15 detik. Campuran didiamkan dalam bak perendam selama 3 menit. Selanjutnya ditambahkan larutan NaOH 17,5% sebanyak 10 ml dan diaduk selama 10 menit. Penambahan larutan NaOH 17,5% sebanyak 10 ml dilakukan tiga kali lagi setelah 2,5; 5; 7,5 menit. Selanjutnya campuran didiamkan selama 30 menit dalam keadaan tertutup. Air suling sebanyak 100 ml ditambahkan dan campuran dibiarkan selama 30 menit. Campuran tersebut dituang ke dalam cawan masir yang dilengkapi labu isap. Campuran dihisap menggunakan pompa vakum. Gelas piala dibersihkan dengan larutan NaOH 8,3% sebanyak 25 ml. Endapan dicuci lima kali menggunakan air suling sebanyak 50 ml. Filtrat yang dihasilkan selanjutnya digunakan untuk penentuan kadar hemiselulosa. Endapan dicuci lagi dengan air suling sebanyak 400 ml. Selanjutnya endapan ditambah asam asetat 2 N dan diaduk selama 5 menit. Endapan dicuci dengan air suling sampai bebas asam. Endapan selanjutnya dikeringkan dengan cara memasukkan cawan masir berisi endapan ke dalam oven 105°C sampai berat konstan. Persen selulosa dapat dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ selulosa} = \frac{\text{berat endapan selulosa}}{\text{berat bahan kering}} \times 100\%$$

2. Analisa Kadar Hemiselulosa (SNI 0443-81)

Filtrat hasil uji kadar selulosa dituang dalam labu ukur 500 ml dan ditambahkan air suling sampai tanda kocok. Filtrat diambil 50 ml dan dimasukkan ke erlemeyer 500 ml. Selanjutnya ke dalam erlemeyer ditambahkan 10 ml Kalium dikromat 0,4 N dan 90 ml H₂SO₄ pkt. Larutan diaduk selama 10 menit dan didinginkan pada suhu kamar. Larutan dipindah ke erlemeyer liter dan ditambahkan air suling sebanyak 500 ml. Selanjutnya ditambah 2 gram KI, diaduk dan dibiarkan selama 5 menit. Larutan dititrasi dengan 0,1 N Na₂S₂O₃. Indikator larutan kanji ditambahkan bila warna kuning dari I₂ hampir hilang. Titik akhir titrasi ditandai dengan perubahan warna dari biru menjadi hijau muda.

$$\text{Kadar Hemiselulosa} = \frac{(V2 - V1) \times N \times 6,85}{W}$$

dimana : V1 = kebutuhan Na₂S₂O₃ pada titrasi filtrat

V2 = kebutuhan Na₂S₂O₃ pada titrasi blanko

N = normalitas Na₂S₂O₃

W = berat bahan kering yang telah di oven (gram)

6,85 = mg selulosa \approx 1 miliequivalen K₂Cr₂O₇

3. Kadar Lignin (SII 0528-81)

Sejumlah contoh sebanyak satu gram ditimbang, kemudian diekstraksi dengan etanol:benzen 1:2 selama 8 jam. Hasil ekstraksi dicuci dengan etanol dan air panas, lalu dikeringkan dalam oven.

Contoh uji tersebut dipindahkan ke dalam gelas piala 100 ml dan ditambahkan asam sulfat 72 % sebanyak 15 ml. Penambahan dilakukan perlahan-lahan didalam bak perendam sambil dilakukan pengadukan dan maserasi selama 2-3 menit. Setelah terdispersi semua, kemudian ditutup dengan gelas arloji dan dibiarkan pada bak perendam selama 2 jam sambil sewaktu-waktu diaduk. Air sebanyak 300-400 ml di masukkan ke dalam erlemeyer 1000 ml dan contoh dipindahkan dari gelas piala tadi, diencerkan dengan air sampai volume 575 ml sehingga konsentrasi asam sulfat 3 %. Larutan dipanaskan hingga mendidih dan dibiarkan mengendap sempurna. Endapan dipindahkan ke dalam cawan masir atau kertas saring yang diketahui bobotnya. Endapan lignin dicuci dengan air panas sampai bebas asam. Cawan masir tersebut kemudian dikeringkan dalam oven 105°C sampai bobotnya tetap. Persen lignin dapat dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ lignin} = \frac{\text{bobot endapan lignin}}{\text{bobot contoh kering}} \times 100\%$$

Lampiran 5. Kurva Standar Gula Reduksi

Tabel A.1. Analisa Kurva Standar Gula Reduksi

Konsentrasi (x)	Abs (y)	xy	x ²
0,02	0,010	0,0002	0,0004
0,07	0,171	0,01197	0,0049
0,12	0,344	0,04128	0,0144
0,17	0,454	0,07718	0,0289
0,22	0,628	0,13816	0,0484
0,27	0,645	0,17145	0,0729
0,32	0,677	0,21664	0,1024
0,37	0,745	0,27565	0,1369
0,42	0,791	0,33222	0,1764
0,47	0,795	0,37365	0,2209
0,50	0,951	0,4755	0,2500
$\Sigma x = 2,95$	$\Sigma y = 6,211$	$\Sigma xy = 2,1165$	$\Sigma x^2 = 1,0565$

$$a = \frac{\Sigma y \cdot \Sigma x^2 - \Sigma x \cdot \Sigma xy}{n (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

$$= \frac{6,211 \times 1,0565 - 2,95 \times 2,1165}{11 (1,0565) - (2,95)^2}$$

$$= 0,10892$$

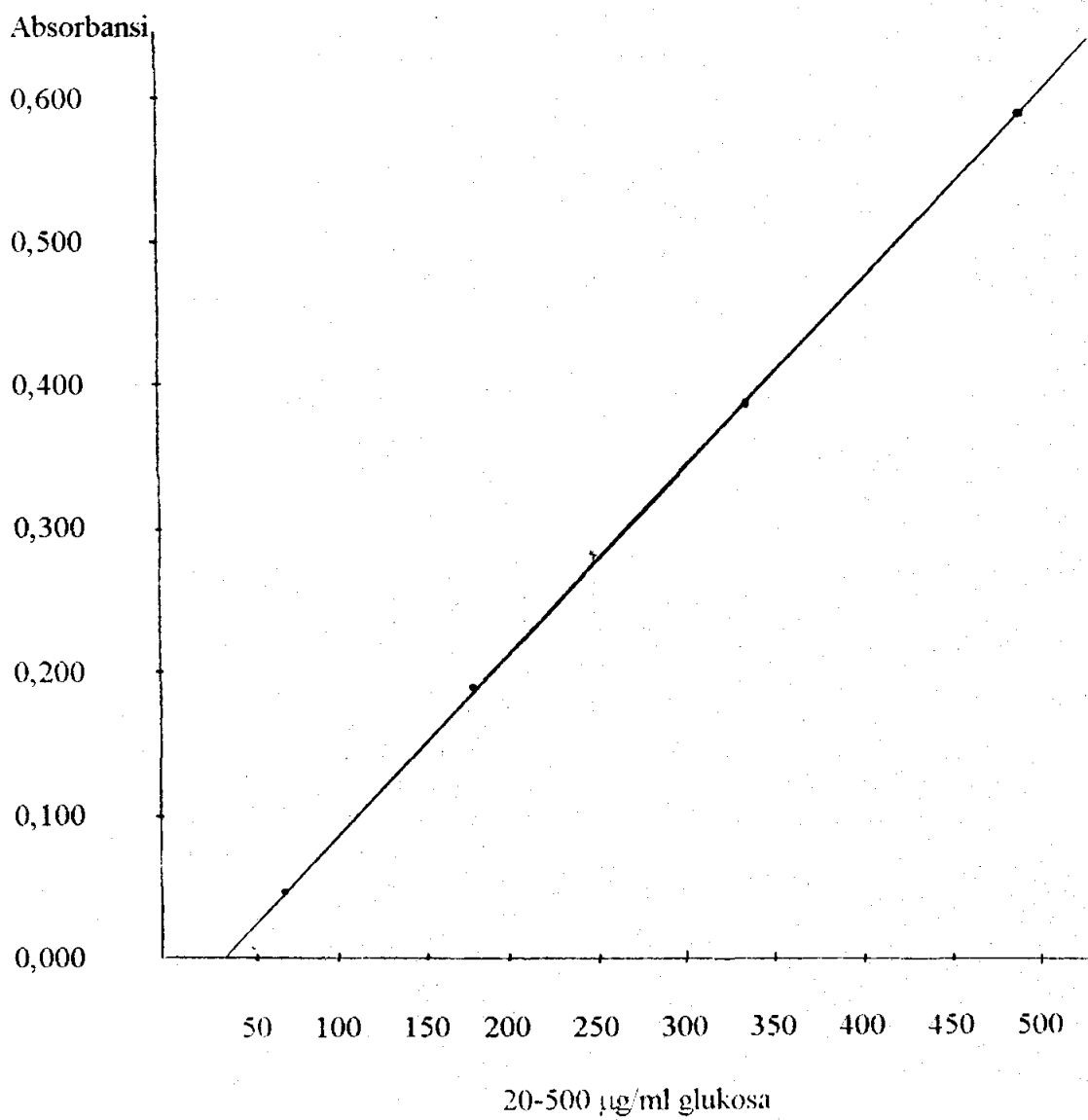
$$b = \frac{n (\Sigma xy) - (\Sigma x \Sigma y)}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

$$= \frac{11 (2,1165) - 18,32245}{11,6215 - 8,7025}$$

$$= 1,69926$$

$$r = 0,9592$$

$$Y = 0,10892 + 1,69926X$$



Gambar A.1. Grafik Kurva Standar Gula Reduksi

Lampiran 6. Data Hasil Analisa FP-ase

Tabel B-1. Data Hasil Analisa FP-ase

Waktu (hari)	Ulangan						Total IU/ml	Rerata IU/ml
	1		2		3			
	abs	IU/ml	abs	IU/ml	abs	IU/ml		
1	0,888	0,085	0,789	0,074	0,926	0,089	0,248	0,082
3	1,044	0,102	1,331	0,112	1,214	0,119	0,333	0,111
5	1,054	0,101	1,184	0,117	1,257	0,123	0,341	0,113
7	1,075	0,105	1,129	0,126	1,321	0,130	0,361	0,120
9	1,244	0,121	1,468	0,148	1,523	0,154	0,423	0,141
11	1,113	0,109	1,321	0,132	1,266	0,123	0,364	0,121
Total	6,418	0,623	7,222	0,709	7,507	0,738	2,070	0,115

Cara Perhitungan :

$$\text{Kurva Standar Glukosa} = Y = 0,10892 + 1,69926 x$$

$$Y = 0,888 \text{ abs}$$

$$x = 0,4594$$

$$\text{Satu unit enzim FP-ase (IU/ml)} = \frac{\text{mg glukosa} \times (1/60 \text{ menit} \times 0,18 \text{ mg})}{\text{ml}}$$

$$= \frac{0,4594 \text{ mg glukosa} \times 0,0925}{0,5}$$

$$= 0,085 \text{ IU/ml}$$

Tabel B-2. Data Analisa FP-ase dan Standar Deviasi

Waktu Inkubasi (hari)	Aktivitas FP-ase (IU/ml)
1	0,082 ± 0,006
3	0,111 ± 0,007
5	0,113 ± 0,009
7	0,120 ± 0,010
9	0,141 ± 0,010
11	0,121 ± 0,009

Lampiran 7. Data Hasil Analisa CMC-ase

Tabel C.1 Data Hasil Analisa CMC-ase

Waktu (hari)	1		Ulangan				Total	Rerata
	abs	IU/ml	abs	2 IU/ml	3 abs	IU/ml		
1	0,873	0,166	0,809	0,152	0,913	0,172	0,490	0,163
3	0,988	0,191	0,926	0,183	0,889	0,170	0,544	0,181
5	0,922	0,177	1,066	0,204	1,030	0,197	0,578	0,192
7	1,056	0,206	1,138	0,226	1,025	0,201	0,633	0,211
9	1,112	0,218	1,170	0,229	1,197	0,235	0,682	0,227
11	1,046	0,204	0,995	0,195	1,115	0,221	0,620	0,207
Total	5,997	1,162	6,104	1,189	6,169	1,196	3,547	0,196

Cara perhitungan :

Kurva Standar Glukosa : $Y = 0,10892 + 1,69926x$

$Y = 0,873 \text{ abs}$

$x = 0,4486$

Satu unit enzim
CMC-ase (IU/ml) = $\frac{\text{mg glukosa} \times (1/30 \text{ mnt} \times 0,18 \text{ mg glukosa})}{\text{ml filtrat enzim}}$

Hari ke-1 ulangan 1 = $\frac{0,4486 \text{ mg glukosa} \times 0,185}{0,5}$

= 0,166 IU/ml

Tabel C-2. Data Analisa CMC-ase dan Standar Deviasi

Waktu Inkubasi (IU/ml)	Aktivitas CMC-ase (IU/ml)
1	0,163 ± 0,008
3	0,181 ± 0,006
5	0,192 ± 0,011
7	0,211 ± 0,010
9	0,227 ± 0,007
11	0,207 ± 0,009

Lampiran 8. Data Hasil Analisa β -glukosidaseTabel D-1. Data Hasil Analisa β -glukosidase

Waktu (hari)	Ulangan						Total IU/ml	Rerata IU/ml
	1		2		3			
	abs	IU/ml	abs	IU/ml	abs	IU/ml		
1	0,764	0,143	0,804	0,149	0,789	0,144	0,436	0,145
3	0,837	0,159	0,804	0,149	0,859	0,163	0,471	0,157
5	0,844	0,160	0,926	0,178	0,946	0,181	0,519	0,173
7	0,932	0,179	0,903	0,175	0,988	0,192	0,546	0,182
9	0,982	0,190	1,032	0,201	1,124	0,215	0,606	0,202
11	0,880	0,168	0,825	0,156	0,979	0,189	0,513	0,171
Total	5,239	0,999	5,294	1,008	5,685	1,084	3,091	0,172

Cara perhitungan :

$$\begin{aligned} \text{Kurva Standar Glukosa} &= Y = 0,10892 + 1,69926X \\ X &= 0,764 \text{ abs} \\ Y &= 0,3865 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Satu unit enzim} &= \frac{\text{mg glukosa} \times (1/30 \text{ mnt} \times 0,18 \text{ mg})}{\beta\text{-glukosidase (IU/ml)} \quad \text{ml}} \\ &= \frac{0,3865 \text{ mg glukosa} \times 0,185}{0,5} \\ &= 0,143 \text{ IU/ml} \end{aligned}$$

Tabel D-2. Data Hasil Analisa β -glukosidase dan Standar Deviasi

Waktu Inkubasi (hari)	Aktivitas β -glukosidase (IU/ml)
0,145	0,145 \pm 0,005
0,157	0,157 \pm 0,001
0,173	0,173 \pm 0,010
0,182	0,182 \pm 0,006
0,202	0,202 \pm 0,010
0,171	0,171 \pm 0,010

Lampiran 9. Data Hasil Analisa pH

Tabel E.1. Data Hasil Analisa pH Filtrat Enzim

Waktu (hari)	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
1	5,86	5,95	5,78	17,59	5,86
3	5,96	5,75	5,18	16,89	5,63
5	5,41	5,36	5,58	16,35	5,45
7	4,55	4,71	4,75	14,01	4,67
9	4,25	4,40	4,91	13,56	4,52
11	4,12	4,25	4,51	12,87	4,29
Total	30,15	30,42	30,71	91,27	5,07

Tabel E.2. Analisa pH Filtrat Enzim dan Standar Deviasi

Waktu Inkubasi (hari)	pH Filtrat Enzim
1	5,86 ± 0,06
3	5,63 ± 0,32
5	5,45 ± 0,09
7	4,67 ± 0,08
9	4,52 ± 0,28
11	4,29 ± 0,16

Contoh perhitungan :

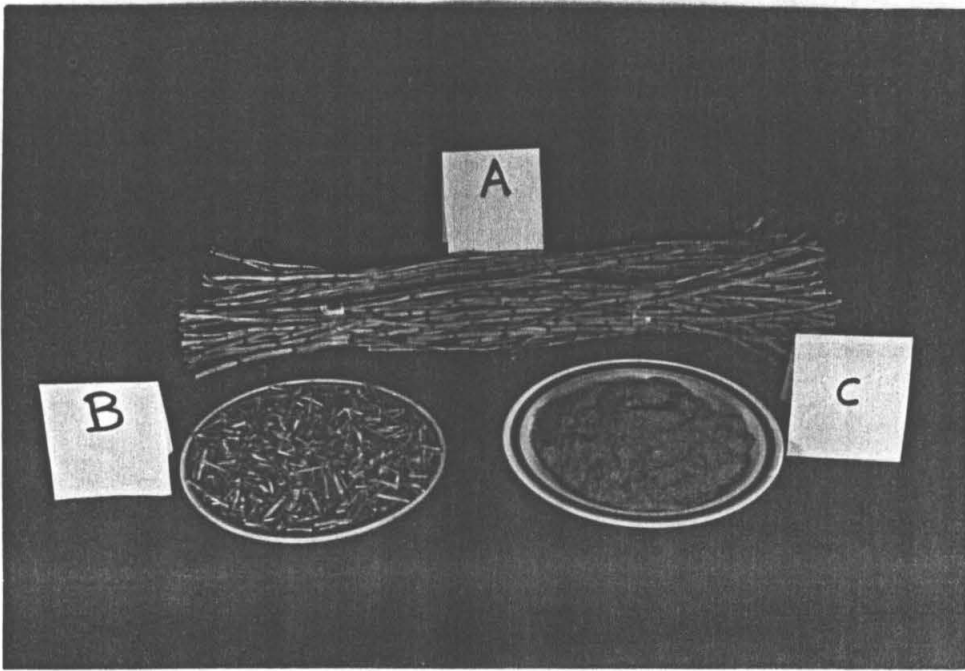
Hari ke-1 :

$$S = \frac{(5,86 - 5,86) + (5,96 - 5,86) + (5,78 - 5,86)}{3}$$

$$= \frac{0 + 0,0081 + 0,0064}{3}$$

$$= 0,06$$

Lampiran 10. Gambar Rhizoma Alang-Alang



Gambar F.1. (A) Rhizoma Alang-Alang, (B) Rhizoma Alang-Alang yang Sudah Dikeringkan, dan (C) Serbuk Rhizoma Alang-Alang