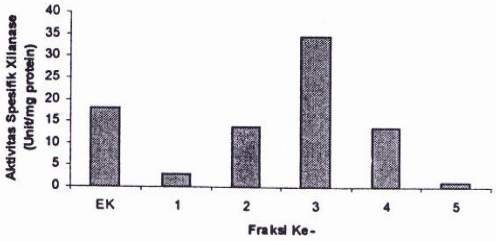
air yang bersifat polar akan cenderung tertarik ke molekul amonium sulfat sehingga protein akan mengendap, dan proses ini disebut *salting out* (Scope, 1987). Garam amonium sulfat sangat efektif untuk mengendapkan protein karena sebagian besar protein tahan terhadap garam tersebut, kelarutannya besar dalam air, mempunyai efek menstabilkan terhadap sebagian besar enzim dan merupakan garam divalen yang mempunyai kekuatan ion yang lebih besar daripada garam monovalen. Pada tahap fraksinasi amonium sulfat bertingkat diperoleh fraksi-fraksi enzim dengan tingkat kejenuhan F_1 (0-20%), F_2 (20-40%), F_3 (40-60%), F_4 (60-80%) dan F_5 (80-100%) dimana dalam salah satu fraksi tersebut akan diperoleh xilanase dengan aktivitas spesifik tertinggi.

Uji Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Xilanase- Aktivitas spesifik xilanase dapat dihitung dari unit aktivitas enzim per mg protein. Satu unit aktivitas dapat didefinisikan sebagai banyaknya aktivitas xilanase yang dapat membentuk 1 μmol xilosa per menit pada kondisi optimum (Paul, 1982). Pada penelitian ini, aktivitas xilanase diukur dari xilosa yang dihasilkan, dan diuji dengan metode gula pereduksi menggunakan reagen DNS menghasilkan senyawa kompleks berwarna kuning (Miller, 1959) pada setiap fraksinya. Warna tersebut kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dan nilai absorbansi yang terukur kemudian diplotkan terhadap kurva standar xilosa (sesuai Lampiran G) untuk mengetahui besarnya unit aktivitas yang terdapat pada ekstrak kasar dan tiap-tiap fraksi. Kadar protein pada tiap-tiap fraksi diukur dengan menggunakan metode Lowry (Paul, 2004). Melalui metode ini, protein enzim akan bereaksi dengan pereaksi Lowry, menghasilkan senyawa kompleks dari nitrogen pada ikatan peptida dengan ion-ion Cu^{2+} yang berwarna biru (sesuai Lampiran L), dan dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Pierce, 2005).

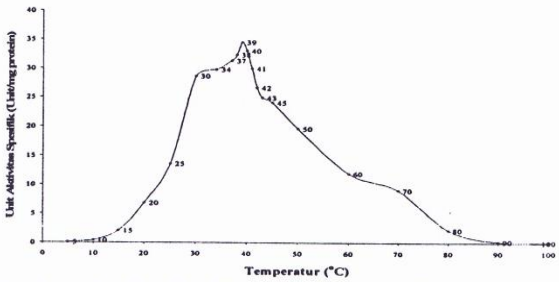


Gambar 1. Grafik Aktivitas Spesifik Xilanasie Hasil Fraksinasi Bertingkat

Pada gambar 5.1 dapat diketahui bahwa fraksi enzim yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi pada fraksi 40-60% (F_3) yaitu **34,40** Unit/mg protein dan terendah pada F_5 (sesuai tabel Lampiran J). Hasil tersebut menunjukkan bahwa xilanase pada fraksi 40-60% (F_3) memiliki kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan fraksi-fraksi yang lain. Berdasarkan hal ini dapat disimpulkan bahwa protein pada fraksi 40-60% (F_3) sebagian besar merupakan xilanase.

Aktivitas xilanase setiap fraksi berbeda-beda, hal ini disebabkan oleh dua faktor, yaitu unit aktivitas dan kadar protein. Suatu fraksi dengan nilai unit aktivitas besar belum tentu memiliki aktivitas spesifik besar, tergantung pada kadar proteinnya. Enzim merupakan protein, sehingga dengan mengetahui kadar protein keseluruhan maka dapat diketahui besarnya protein yang berfungsi sebagai enzim melalui kemampuannya dalam mengubah substrat menjadi produk yang diinginkan. Jadi, aktivitas spesifik ditentukan oleh perbandingan unit aktivitas terhadap kadar protein.

Pengaruh Variasi Temperatur Pada Aktivitas Spesifik Xilanase- Setelah diketahui bahwa aktivitas spesifik xilanase terbesar pada F_3, maka langkah selanjutnya adalah menentukan pengaruh variasi temperatur pada aktivitas spesifik xilanase. Berdasarkan gambar 5.2 dapat diketahui bahwa aktivitas spesifik xilanase akan meningkat hingga pada suatu temperatur tertentu dan menurun setelah temperatur tersebut. Menurut Wirahadikusumah (1988), daerah temperatur dimana aktivitas enzim cukup besar disebut temperatur optimum.



Gambar 2. Grafik Pengaruh Variasi Temperatur Terhadap Aktivitas Spesifik Xilanase

Pada saat temperatur di bawah temperatur optimum, aktivitas xilanase sangat kecil. Hal ini dikarenakan pada temperatur tersebut xilanase belum aktif sehingga xilosa yang terbentuk juga sedikit. Belum aktifnya xilanase dimungkinkan karena pada temperatur rendah tersebut energi aktivasi yang diperlukan untuk terjadinya suatu reaksi enzimatis belum terpenuhi.