

**Lampiran 1. Analisa Kadar Lignin (SNI 0492-1989-A, SII
0528-1981)**

1. Sejumlah contoh sebanyak satu gram ditimbang, kemudian ditambah dengan etanol : benzen = 1 : 2, dibiarkan selama 8 jam.
2. Hasil ekstraksi dicuci dengan etanol dan air panas, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 55-60°C.
3. Contoh hasil uji tersebut dipindahkan ke dalam gelas piala 100 ml dan ditambahkan asam sulfat 72% sebanyak 15 ml. Penambahan dilakukan perlahan-lahan di dalam bak perendaman sambil dilakukan pengadukan dan meserasi selama 2-3 menit. Setelah terdispersi semua, langsung ditutup dengan gelas arloji dan dibiarkan pada bak perendam selama 2 jam sambil sewaktu-waktu diaduk.
4. Air sebanyak 300-400 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 ml dan contoh yang dipindahkan dari gelas piala tadi diencerkan dan dipanaskan sampai mendidih kemudian dibiarkan mengendap sempurna.
5. Endapan dipindahkan ke dalam cawan masir atau kertas saring yang diketahui bobotnya.
6. Endapan lignin dicuci dengan air panas sampai bebas asam.

7. Cawan masir tersebut kemudian dikeringkan dalam oven 105°C sampai bobotnya tetap.
8. Persen lignin dapat dihitung sebagai berikut:

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

Lampiran 2. Analisa Kadar Selulosa dan Pentosan (SNI 14-0444-1989, SII. 0443-81)

A. Analisa Kadar Selulosa

1. Sejumlah contoh sebanyak 3,0 gr 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 satu menit.
2. Selanjutnya ditambahkan larutan NaOH 17,5% sebanyak 10 ml dan diaduk selama 45 detik.
3. Penambahan 10 ml NaOH 17,5% berikutnya disertai pengadukan 15 detik.
4. Campuran didiamkan dalam bak perendam selama 3 menit.
5. Selanjutnya ditambahkan larutan NaOH 17,5% sebanyak 10 ml, aduk selama 10 menit.
6. Penambahan larutan NaOH 17,5% sebanyak 10 ml dilakukan tiga kali setelah 2,5; 5; dan 7,5 menit.
7. Selanjutnya campuran didiamkan selama 30 menit dalam keadaan tertutup.
8. Air suling sebanyak 100 ml ditambahkan dan campuran dibiarkan selama 30 menit. Campuran tersebut dituang ke dalam cawan masir yang dilengkapi labu isap. Campuran diisap menggunakan pompa vakum. Gelas piala dibersihkan dengan larutan NaOH 8,3% sebanyak 25 ml.
9. Endapan dicuci lima kali menggunakan air suling sebanyak 400 ml. Filtrat ini digunakan selanjutnya untuk penentuan kadar hemiselulosa.

10. Endapan dicuci lagi dengan 400 ml air suling.
11. Selanjutnya endapan ditambah asam asetat 2 N dan diaduk selama 5 menit.
12. Endapan dicuci dengan air suling sampai bebas asam.
13. Endapan dikeringkan dengan cara memasukkan cawan masir berisi endapan ke dalam oven 105°C sampai berat konstan.
14. Penghitungan persen selulosa:

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

B. Analisa Kadar Hemiselulosa (Pentosan)

1. Filtrat hasil uji kadar selulosa dituang ke dalam labu ukur 500 ml, dan tambahkan air suling sampai tanda kocok.
2. Filtrat diambil 50 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml. Ditambahkan 10 ml Kalium-dikhromat 0,4 N dan 90 ml H_2SO_4 pekat.
3. Larutan diaduk selama 10 menit dan didinginkan pada suhu kamar.
4. Larutan dipindah ke erlenmeyer liter dan ditambahkan 500 ml air suling.
5. Larutan dititrasi dengan 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, tambahkan indikator larutan kanji dekat titik akhir titrasi bila warna kuning dari I_2 hampir hilang. Titik akhir terjadi pada perubahan warna dari biru tua ke hijau muda.

6. Penghitungan persen hemiselulosa:

$$\% \text{ hemiselulosa} = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times 6,85}{W}$$

dimana:

V_1 = kebutuhan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pada titrasi filtrat

V_2 = kebutuhan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pada titrasi blanko

N = normalitas $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

W = berat bahan kering yang telah dioven (gram)

6,85 = mg selulosa setara dengan 1 miliequivalent dari

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Lampiran 3. Komposisi Medium Andreoti

Bahan kimia	% komposisi
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,14 (w/v)
Pepton	1,00 (w/v)
CaCl_2	0,03 (w/v)
KH_2PO_4	0,20 (w/v)
Urea	0,03 (w/v)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03 (w/v)
Substrat alang-alang ^{*)}	0,5-1 (w/v)
Stok mineral ^{**)}	1 ml
Air suling	1000 ml

^{*)}Berasal dari selulosa serbuk rhizoma alang-alang yang digunakan sebagai substrat.

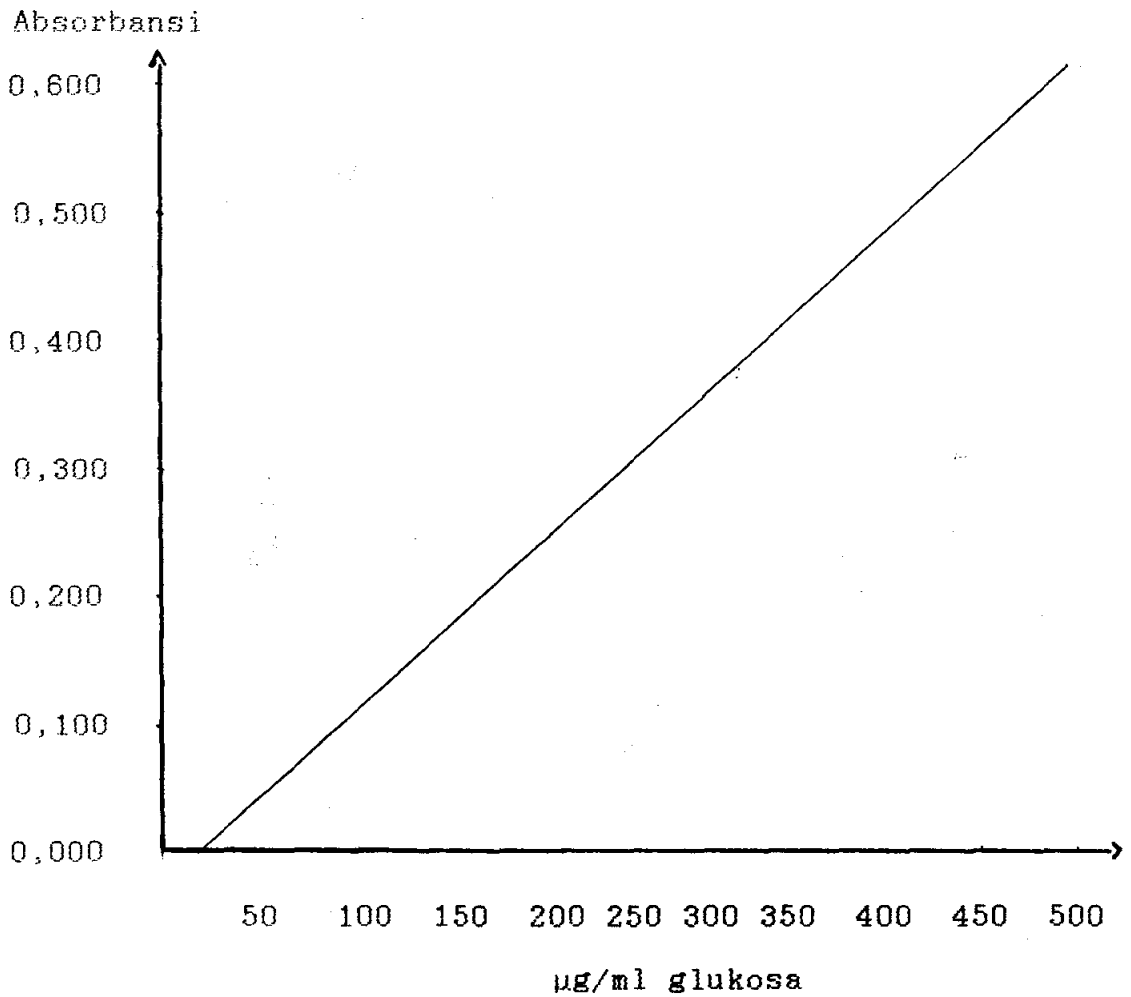
^{**)}Komposisi stok mineral:

495 ml air suling dilarutkan dalam 5 ml HCl pekat, 2,5 gr $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,98 gr $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ atau 0,89 gr $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,83 gr ZnCl_2 atau 1,76 gr $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, dan 1 gr CoCl_2 atau 1,25 gr $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Lampiran 4. Prosedur Pembuatan Senyawa Pereaksi untuk Analisis Aktifitas Enzim Selulase

- Larutan DNS : 10.6 gr DNS dan 19.8 gr NaOH dilarutkan dalam 1416 ml air, kemudian ditambahkan 306 gr garam Rochele (Na,K-tartarat) dan 7.6 ml phenol.
- 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 dengan pH 4.80 pada konsentrasi 0.05 M.
- Larutan CMC 1% : CMC sebanyak 10 gram dilarutkan dalam 800 ml air panas (80°-90°C) sambil dikocok secara kontinyu, selanjutnya ditambahkan 100 ml larutan buffer sitrat 0.055 M pH 4.80, dan ditetapkan volumenya menjadi 1 liter. Larutan ini disimpan dalam lemari pendingin dan dipanaskan 50°C sebelum digunakan.
- Larutan salisin 1% : salisin sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 80 ml larutan buffer sitrat 0,05M pH 4.80 untuk menetapkan volumenya menjadi 100 ml. Larutan ini disimpan dalam lemari pendingin dan dipanaskan pada suhu 50°C sebelum digunakan.

Lampiran 5. Data Hasil Penelitian Aktifitas Enzim Selulase



Kurva standar ini hanya dapat digunakan pada range konsentrasi 20-500 µg/ml glukosa.

$$y = a + bx$$

$$y = 0,109 + 1,699x$$

$$r = 0,959$$

Satu unit enzim selulase (IU/ml) dihitung sebagai:

$$\frac{\text{mg glukosa} \times \text{waktu inkubasi (menit)} \times 0.18 \text{ mg glukosa}}{\text{ml filtrat enzim}}$$

ml filtrat enzim

Tabel Pengukuran Absorbansi Glukosa pada Enzim Selulase

Hari	abs CMC-ase	abs β -glukosidase	abs FP-ase
	(sampel - blanko)	(sampel - blanko)	(sampel - blanko)
0	(0,2265 - 0,038)	tidak terdeteksi	tidak terdeteksi
1	(0,2875 - 0,038)	(0,1525 - 0,008)	tidak terdeteksi
2	(0,3380 - 0,038)	(0,4395 - 0,008)	(0,3620 - 0,038)
3	(0,3440 - 0,038)	(0,1620 - 0,008)	(0,2570 - 0,038)
4	(0,4110 - 0,038)	(0,1680 - 0,008)	(0,2750 - 0,038)
5	(0,3580 - 0,038)	(0,2228 - 0,008)	(0,2458 - 0,038)
6	(0,3050 - 0,038)	(0,2775 - 0,008)	(0,2165 - 0,038)
7	(0,3365 - 0,038)	(0,2900 - 0,008)	(0,2620 - 0,038)
8	(0,3665 - 0,038)	(0,1455 - 0,008)	(0,2835 - 0,038)
9	(0,3065 - 0,038)	(0,2290 - 0,008)	(0,4230 - 0,038)
10	(0,2480 - 0,038)	(0,2340 - 0,008)	(0,6290 - 0,038)

Contoh penghitungan untuk aktifitas enzim CMC-ase pada hari ke-0:

diketahui:

$$\begin{aligned}
 \text{mg glukosa} &= \hat{x} = (\text{abs sampel} - \text{abs blanko}) \\
 &= (0,2265 - 0,038) = 0,1885 \text{ INV. } \hat{x} \\
 &= 0,0468
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{unit CMC-ase} &= 1/(30 \text{ menit} \times 0,18 \text{ mg glukosa}) \\
 &= 0,185 \text{ unit}
 \end{aligned}$$

$$\text{ml filtrat enzim} = 0,5 \text{ ml}$$

dilakukan pengenceran dengan buffer sitrat (pH 4.80)

sebanyak empat kali maka:

$$\text{Aktifitas CMC-ase (IU/ml)} = \frac{0,0468 \times 0,185}{0,5} = 0,0173$$

$$0,0173 \times 4 = 0,0685 \text{ IU/ml enzim CMC-ase.}$$

