



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SELULASE DARI
Trichoderma viride Strain T051 DENGAN SUBSTRAT JERAMI**

SKRIPSI

**NENCI
0706263302**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI KIMIA
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SELULASE DARI
Trichoderma viride Strain T051 DENGAN SUBSTRAT JERAMI**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

NENCI

0706263302

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI KIMIA
DEPOK
JANUARI 2012**

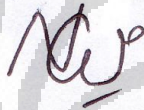
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah
saya nyatakan dengan benar.

Nama : Nenci

NPM : 0706263302

Tanda Tangan

: 

Tanggal : 10 Januari 2012

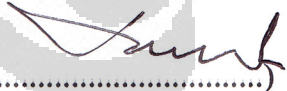
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

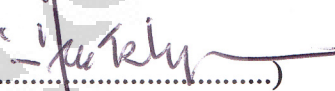
Nama : Nenci
NPM : 0706263302
Program Studi : Kimia
Judul Skripsi : Isolasi dan Karakterisasi Selulase dari
Trichoderma viride Strain T051 dengan
Substrat Jerami

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dra. Siswati Setiasih, Apt, M.Si (.....)

Pembimbing II : Sri Sugiwati, M.Si (.....)

Penguji : Ir.Herry Cahyana, M.Si (.....)

Penguji : Dra. Susilowati Hadisusilo, M.Sc (.....)

Penguji : Drs.Sunardi, M.Si (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 10 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yesus Kristus yang Maha Kasih, karena hanya atas segala berkat dan pemeliharaan-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Isolasi dan Karakterisasi Selulase dari *Trichoderma viride* Strain T051 dengan Substrat Jerami** ini tepat pada waktunya.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sulit bagi penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu penulis secara khusus mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dra. Siswati Setiasih, Apt, M.Si, selaku pembimbing I yang telah bersedia menerima serta membimbing penulis dalam melaksanakan penelitian.
2. Sri Sugiwati, M.Si, selaku pembimbing II atas kesediannya memfasilitasi serta mengarahkan penulis dalam penelitian. Terimakasih untuk motivasi dan bantuan langsung yang diberikan dalam setiap proses penelitian ini.
3. Pusat Penelitian Kimia LIPI yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian
4. Dr. Ridla Bakri, selaku Ketua Departemen Kimia FMIPA UI.
7. Ir. Widyastuti Samadi M.Si, selaku pembimbing akademis yang telah membimbing penulis selama menempuh pendidikan.
8. Dra. Tresye Utari, M.Si, selaku koordinator penelitian yang telah membantu penulis dalam melancarkan penelitian.
9. Ibu Hani, Ibu Ai, Lisna, Bapak Hendris, dan Ibu Irni atas bantuan dan masukannya selama bekerja di Laboratorium Teknologi Lingkungan P2K - LIPI PUSPIPTEK, Serpong.
10. Kedua orang tua tercinta atas motivasi, perhatian, kasih sayang, doa yang tak pernah putus, dan dukungan baik moril dan materil yang menjadi semangat bagi penulis sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
11. Kakak dan adikku, paman dan bibi, serta sepupu-sepupu tercinta atas dukungan dan cinta kasih yang diberikan, baik melalui doa maupun perbuatan.
12. Ika Agustina dan Arif Budiman atas bantuan informasi penelitian, buku,

jurnal, dll sehingga target penelitian penulis tercapai.

13. Destrimita Risma sebagai sahabat dalam suka dan duka selama penelitian dan penyelesaian tugas akhir. Terimakasih untuk selalu setia sebagai rekan penelitian sekaligus sahabat.
14. Fitriana Sari sebagai teman cerita dan berdiskusi selama penelitian di LIPI Serpong.
15. Kak Ana “Trijan”, kak Ana “Theresia”, Santy, Hesty, Kezia, Ike, Nina, Yaniar, Ratna, kak Lidia Natalia, Rendra, Yan Fajar. Terimakasih untuk menjadi pendoa dan pendengar setiap keluh kesah penulis.
16. Sahabat-sahabat di kampus, Rosa, Ikor, Savitri, Silvy, Rohman, Manah, Rafi, Tegar, Rifan, Johannes, Sabil, Reka, Yomi, kak Sonia, dan yang lainnya. Terimakasih untuk kebersamaan, dan karena telah memberi warna kehidupan dan mengajarkan arti persahabatan.
17. Joseph, Vincent, Johan, Steven, Alfredo, dan Raja. Terimakasih atas kebersamaan selama lima semester yang penuh dengan cerita. Jesus loves you all and so do I.
18. Teman-teman PO FMIPA UI yang telah menjadi keluarga selama masa perkuliahan.
19. Seluruh teman-teman kimia angkatan 2007 dan angkatan 2006, atas dukungan, kekompakan, dan persahabatan.
20. Gerry dan Dela selaku murid yang sangat pengertian.
21. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga terselesaikannya skripsi ini.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis
2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nenci
NPM : 0706263302
Program Studi : S1 Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**Isolasi dan Karakterisasi Selulase dari *Trichoderma viride* Strain T051
dengan Substrat Jerami**

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 10 Januari 2012

Yang menyatakan



(Nenci)

ABSTRAK

Nama : Nenci

Program Studi : Kimia

Judul : Isolasi dan Karakterisasi Selulase dari *Trichoderma viride*
Strain T051 dengan Substrat Jerami

Jerami padi merupakan salah satu limbah lignoselulosa pertanian yang jumlahnya cukup melimpah dan mengandung komponen lignin, selulosa, dan hemiselulosa yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku/substrat yang digunakan untuk pembuatan selulase, sehingga memiliki nilai ekonomi dan ramah lingkungan. Sebelum lignoselulosa digunakan sebagai substrat perlu dilakukan minimalisasi kadar ligninnya dengan menggunakan *pretreatment* kimia basa dengan menggunakan NaOH 4%. Kapang yang digunakan adalah *Trichoderma viride* strain T051, jamur ini merupakan penghasil enzim selulase yang berfungsi menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Karakteristik enzim selulase berdasarkan mekanisme hidrolisis ada tiga jenis, yaitu endoglukanase, exoglukanase dan glukosidase. Aktivitas enzim dengan menggunakan substrat jerami yang didelignifikasi basa lebih tinggi dibandingkan dengan jerami tanpa delignifikasi. Variasi nutrisi pada medium produksi yang memberikan unit aktivitas optimum adalah dengan penambahan medium basal pada substrat uji aktivitas CMC 1% sebesar 59,97 mU/mL. Definisi satu unit aktivitas adalah 1 μ mol glukosa yang dihasilkan per menit pada suhu 45⁰C. Enzim dengan aktivitas tertinggi selanjutnya difraksinasi menggunakan amonium sulfat dengan kenaikan tingkat kejenuhan dan didialisis. Hasil penelitian menunjukkan fraksi amonium sulfat dengan kejenuhan 50-70% memiliki aktivitas tertinggi sebesar 62,55 mU/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 16,96 mU/mL. Hasil dialisis memiliki aktivitas spesifik sebesar 24,94 mU/mg. pH optimum aktivitas enzim selulase adalah 5. Logam Cu²⁺ dapat menginhibisi aktivitas enzim selulase, sementara Zn²⁺ dan Mg²⁺ memberi dampak peningkatan aktivitas enzim.

Kata kunci : Jerami, lignoselulosa, selulase, *Trichoderma viride*,
pretreatment kimia basa

XIII + 50 halaman : 12 gambar, 11 tabel, 4 lampiran

Daftar pustaka : 30 (1962-2010)

ABSTRACT

Name : Nenci
Study Program : Chemistry
Title : Isolation and Characterization of Cellulose from
Trichoderma viride Strains T051 Using Rice Straw as
Substrates

Rice straw is one of lignocellulosic agricultural waste which is quite abundant and contain components of lignin, cellulose, and hemicellulose which can be used as raw materials / substrates used to manufacture cellulase, so it has economic value and environmental friendliness. Before the lignocellulose is used as the substrate is necessary to minimize the levels of lignin using alkaline chemical pretreatment using NaOH 4%. Fungus that used were *Trichoderma viride* strain T051, this fungus is a producer of cellulase enzymes that function hydrolyze cellulose into glucose. Characteristics of cellulase enzymes by mechanisms hidolisis there are three types, namely endoglukanase, exoglukanase and glucosidase. Enzyme activity by using straw substrate base delignification higher than the straw without delignification. Variation of nutrients in the medium production unit that provides an optimum activity is the addition of basal medium on the substrate 1% CMC activity assay of 59.97 mU/mL. Definition of one unit of activity is 1 mol of glucose produced per minute at 45⁰C. With the next highest enzyme activity fractionated using ammonium sulfate with increasing levels of saturation and dialyzed. The results showed fractions with ammonium sulfate saturation of 50-70% has the highest activity of 62.55 mU/mL with a specific activity of 16.96 mU/mL. The results of dialysis had a specific activity of 24.94 mU/mg. The optimum pH of the enzyme activity of cellulase is 5. Metals Cu²⁺ can inhibit cellulase enzyme activity, whereas Zn²⁺ and Mg²⁺ gives the impact of increased enzyme activity.

Keywords : Rice straw, lignocellulose, cellulase, *Trichoderma viride*, chemical base pretreatment

XIII + 50 pages : 12 pictures, 11 tables, 4 attachments

Bibliography : 30 (1962-2010)

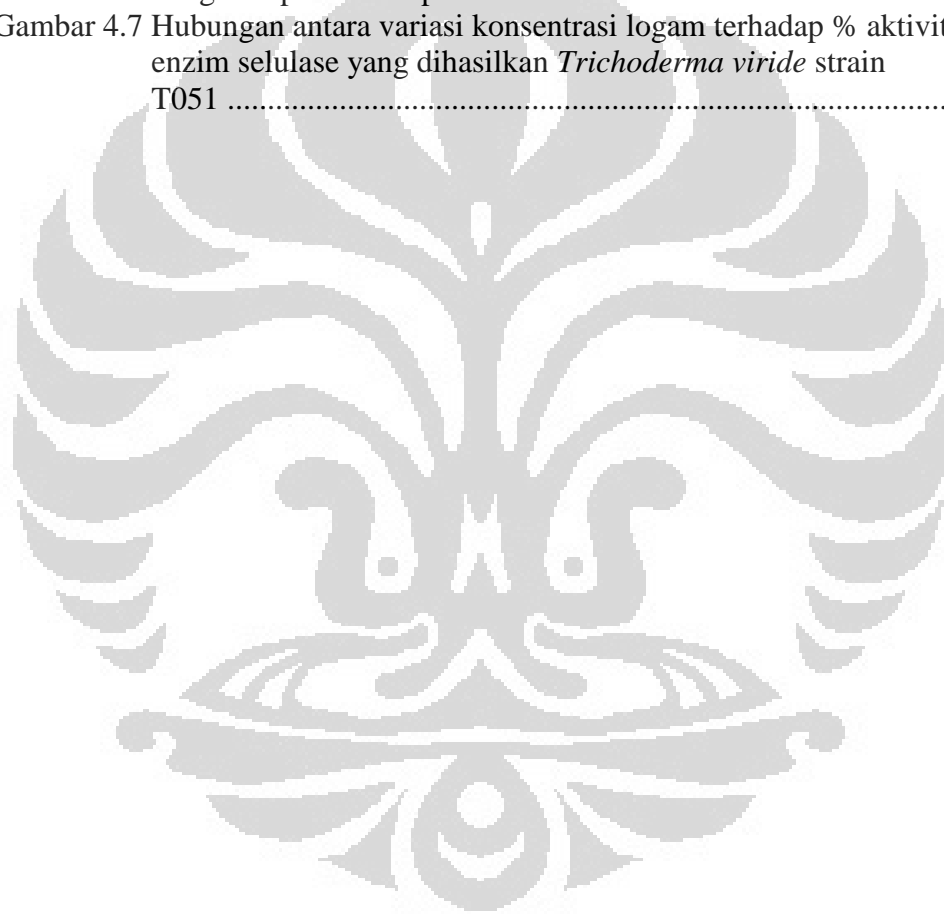
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Hipotesis	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Jerami Padi	4
2.2 Selulosa	5
2.3 Lignin	5
2.4 Delignifikasi	6
2.5 Enzim	7
2.5.1 Enzim Selulase	9
2.6 <i>Trichoderma viride</i>	10
2.7 Fermentasi Padat	10
2.8 Isolasi Enzim	11
2.8.1 Teknik Pemurnian Enzim	12
2.8.1.1 Pengendapan	12
2.8.1.2 Dialisis	13
BAB 3 METODE PENELITIAN	14
3.1 Tempat Penelitian	14
3.2 Alat-alat yang Digunakan	14
3.3 Bahan	
3.3.1 Mikroorganisme	14
3.3.2 Bahan Kimia	15
3.4 Prosedur Kerja	15
3.4.1 Sterilisasi Alat	15
3.4.2 Preparasi Substrat Jerami	16
3.4.3 Pembuatan Buffer dan Pereaksi	16
3.4.3.1 Pereaksi Uji Protein	16
3.4.3.2 Pereaksi Uji Gula Pereduksi	16
3.4.4 Pembuatan Medium	17
3.4.4.1 Medium Potato Dextrose Agar (PDA)	17

3.4.4.2 Medium Produksi dengan Variasi Nutrisi	17
3.4.4.3 Medium Aktivasi	18
3.4.5 Persiapan Inokulum <i>Trichoderma viride</i>	18
3.4.6 Pembuatan Starter	18
3.4.7 Produksi Enzim Selulase Kasar	19
3.4.8 Ekstrak Enzim Selulase Kasar	19
3.4.9 Pengujian Kadar Protein	19
3.4.10 Pengujian Aktivitas Enzim Selulase	19
3.4.11 Pengujian Gula Pereduksi	20
3.4.12 Pemurnian Enzim Selulase	21
3.4.13 Dialisis	21
3.4.14 Karakterisasi Enzim	22
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1 Peremajaan <i>Trichoderma viride</i> Strain T051	23
4.2 Pengaruh Delignifikasi terhadap Aktivitas Enzim	23
4.3 Pengaruh Variasi Komposisi Nutrisi dalam Medium Fermentasi	25
4.4 Pengaruh Waktu Inkubasi dan Perbedaan Sustrat Uji terhadap aktivitas selulase	27
4.5 Pemurnian Selulase	30
4.6 Penentuan pH optimum dan pengaruh logam terhadap aktivitas enzim selulase	32
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	35
5.1 Kesimpulan	35
5.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jerami padi	4
Gambar 2.2 Struktur selulosa	5
Gambar 2.3 Struktur lignin	6
Gambar 2.4 Efek <i>pretreatment</i> delignifikasi	7
Gambar 2.5 Pengelompokan enzim selulase berdasarkan spesifitas substrat	9
Gambar 4.1 <i>Trichoderma viride</i> strain T051	23
Gambar 4.2 Substrat jerami	24
Gambar 4.3 Pola aktivitas enzim selulase pada berbagai medium produksi	26
Gambar 4.4 Unit aktivitas optimum pada enzim selulase	29
Gambar 4.5 Grafik aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase	31
Gambar 4.6 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim selulase	33
Gambar 4.7 Hubungan antara variasi konsentrasi logam terhadap % aktivitas enzim selulase yang dihasilkan <i>Trichoderma viride</i> strain T051	34



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi komponen dalam jerami	4
Tabel 3.1 Komposisi medium basal	17
Tabel 3.2 Komposisi medium <i>Trace Element</i>	18
Tabel 3.3 Komposisi substrat dan filtrat enzim untuk uji aktivitas	20
Tabel 4.1 Pengaruh <i>pretreatment</i> (delignifikasi) jerami padi terhadap aktivitas selulase yang dihasilkan dari <i>Trichoderma viride</i> strain T051.....	25
Tabel 4.2 Data uji aktivitas selulase pada berbagai medium fermentasi	26
Tabel 4.3 Data aktivitas selulase dari berbagai medium produksi menggunakan substrat uji CMC dan FPU.....	29
Tabel 4.4 Data hasil fraksinasi enzim selulase	30
Tabel 4.5 Data aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase	31
Tabel 4.6 Aktivitas enzim selulase pada berbagai nilai pH	32
Tabel 4.7 Pengaruh ion logam pada berbagai konsentrasi	33



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Bagan Kerja.....	40
Lampiran 2	Data Standar Glukosa.....	48
Lampiran 3	Standar Protein (BSA).....	49
Lampiran 4	Alat-alat yang Digunakan.....	50



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kebutuhan manusia terhadap bahan bakar minyak sebagai sumber energi semakin meningkat setiap tahunnya. Berdasarkan OPEC World Energy Model (OWEM) diketahui bahwa permintaan minyak dunia pada periode jangka menengah tahun 2010 diperkirakan mengalami pertumbuhan 1,8 persen per tahun.

Saat ini sumber utama bahan bakar transportasi berasal dari minyak bumi. Produksi premium di Indonesia sekitar 62 juta barrel dan produksi solar sekitar 87 juta barrel. Produk tersebut belum termasuk penggunaan untuk kebutuhan lain, misal minyak pelumas, kerosen, avgas, serta bahan-bahan lain. Hal ini sangat mengkhawatirkan mengingat cadangan minyak bumi yang semakin menipis. Salah satu energi alternatif untuk bahan bakar transportasi adalah bioetanol sebagai pengganti bensin dan biodiesel sebagai pengganti solar (BPS,2005).

Produksi bioetanol yang dikembangkan saat ini dapat dibuat dengan bahan dasar substrat yang mengandung glukosa yang selanjutnya dihidrolisis menjadi etanol melalui proses fermentasi. Sumber glukosa yang digunakan dapat berupa bahan pangan yang kaya akan glukosa, misalnya singkong dan umbi-umbian lainnya. Penggunaan bahan pangan tersebut mempunyai potensi yang sangat besar untuk menghasilkan bioetanol, namun dalam prosesnya dinilai kurang efektif karena akan menimbulkan persaingan terhadap kebutuhan bahan pangan masyarakat.

Salah satu alternatif lain yang dapat digunakan untuk menyediakan sumber glukosa adalah penggunaan biomassa berupa selulosa yang banyak terkandung dalam limbah pertanian, misalnya jerami, tongkol jagung, dan bagas tebu.

Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan biokatalis berupa enzim selulase. Kendala baru yang dimunculkan dalam hal penyediaan glukosa dengan bahan dasar selulosa adalah masih mahalnya harga enzim selulase dipasaran, sehingga dinilai kurang efektif untuk produksi dalam skala besar.

Kapang *Trichoderma sp.* merupakan salah satu jenis fungi atau jamur yang dikenal memiliki potensi menghasilkan enzim selulase. Produksi selulase dengan menggunakan *Trichoderma sp.* sebagai sumber enzim dapat dilakukan untuk memperoleh enzim selulase dengan biaya produksi yang lebih rendah. Selulase yang diproduksi oleh *Trichoderma sp.* bersifat induktif dan ekstraseluler, yang berarti dibutuhkan substrat untuk mengaktifkan produksinya.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi enzim selulase dari *Trichoderma viride* yang difermentasi menggunakan jerami sebagai sumber selulosa. Produksi enzim selulase ini menggunakan fungsi *Trichoderma viride* strain asli Indonesia. Enzim selulase yang terdapat pada *Trichoderma viride* merupakan enzim induktif, sehingga enzim akan dihasilkan jika terdapat substrat selulosa. Dalam penelitian ini dipilih substrat jerami yang merupakan limbah pertanian yang banyak dihasilkan di Indonesia dan mengandung selulosa dengan kadar yang tinggi. Untuk memperoleh enzim dengan aktivitas yang tinggi, dilakukan variasi nutrisi yang bertujuan untuk mengetahui faktor yang paling berpengaruh terhadap aktivitas enzim, dilanjutkan fraksinasi amonium sulfat dan uji pH serta pengaruh logam terhadap enzim yang dihasilkan.

1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah ada perbedaan aktivitas selulase yang dihasilkan oleh *Trichoderma viride* strain T051 yang dipengaruhi oleh komposisi nutrisi dalam medium fermentasi dengan substrat jerami?
2. Kapan waktu fermentasi yang memberikan aktivitas selulase tertinggi pada kondisi substrat yang sesuai?
3. Pada pH berapakah enzim selulase memiliki aktivitas optimum?
4. Apakah terdapat pengaruh logam tertentu terhadap aktivitas enzim selulase?

1.3 Hipotesis

Variasi komposisi nutrisi dalam medium fermentasi dengan substrat jerami akan memberikan nilai aktivitas pada enzim selulase yang dihasilkan.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Melakukan isolasi enzim selulase dari *Trichoderma sp.* strain T051 yang dihasilkan pada proses fermentasi menggunakan substrat jerami padi.
2. Membandingkan pengaruh variasi nutrisi pada medium fermentasi terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan dari *Trichoderma viride* strain T051.
3. Membandingkan pengaruh waktu fermentasi terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan.
4. Menentukan pH optimum enzim selulase hasil fraksinasi dengan garam ammonium sulfat dan dialisis dengan membran selofan, serta pengaruh logam terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jerami Padi

Jerami padi merupakan limbah pertanian yang paling banyak dihasilkan di Indonesia. Dalam setahun, Indonesia mampu menghasilkan limbah jerami sebanyak 180 ton (N.Anwar, 2010).Komponen dan nutrisi yang terdapat dalam jerami dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi komponen dalam jerami

Komponen	Komposisi (%) (Dewi, 2002)	Kandungan Nutrisi dalam Basis Kering (%) (Dobermann, 2002)
Selulosa	37,71	
Hemiselulosa	21,99	
Lignin	16,62	
N		0,5-0,8
P ₂ O ₅		0,16-0,27
K ₂ O		1,4-2,0
S		0,05-0,1
Si		4,0-7,0



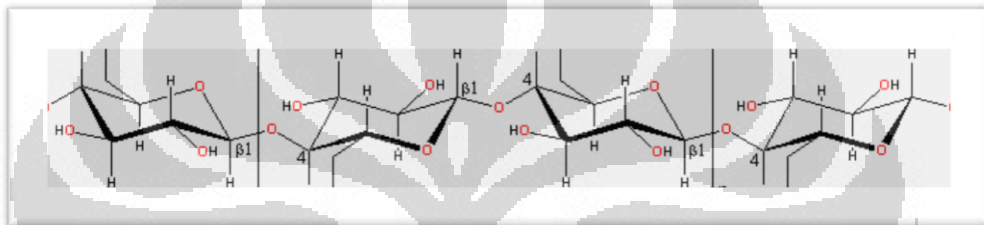
[Sumber : safan.wordpress.com,2011]

Gambar 2.1 Jerami padi

Pemanfaatan jerami padi sebagai pakan ternak baru mencapai 31-39 %, sedangkan yang dibakar atau dimanfaatkan sebagai pupuk 36-62 %, dan sekitar 7-16 % digunakan untuk keperluan industri (Zulfatus S, 2010).

2.2 Selulosa

Selulosa merupakan suatu polimer alami yang terdiri dari unit-unit glukosa anhidrida yang membentuk ikatan β -1,4. Struktur selulosa dapat digambarkan seperti pada Gambar 2.2.



[Sumber : <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycel.html>, 2011]

Gambar 2.2 Struktur selulosa

Formula di atas biasa ditulis sebagai $(C_6H_{10}O_5)_n$. Hasil penelitian tentang berat molekul selulosa sangat beragam, antara 1000-5000, bahkan bisa mencapai antara 163.000 – 810.000, tergantung pada metode isolasi, *treatment*, pemurnian, dan determinasi yang digunakan. Nilai n disebut sebagai derajat polimerisasi (Wise and Lauer, 1962).

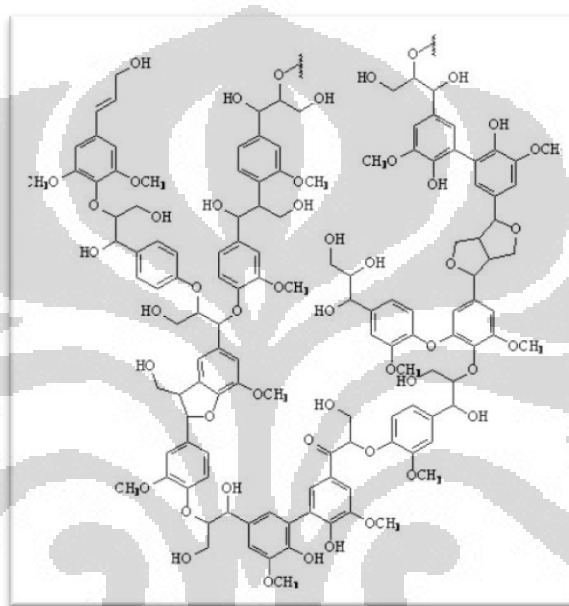
Ikatan glikosidik β -1,4 dan ikatan hidrogen pada struktur selulosa yang sangat kohesif menyebabkan serat-serat selulosa sangat kuat dan sukar larut dalam air. Pada dinding sel tanaman, serat-serat selulosa melekat dan bersilangan dengan matriks yang mengandung polisakarida lain serta lignin (Monica, 2007).

2.3 Lignin

Lignin merupakan senyawa polimer tiga dimensi yang terdiri dari unit fenilpropana yang diikat dengan ikatan eter (C-O-C) dan ikatan karbon (C-C).

Universitas Indonesia

Polimer lignin tersebut tidak dapat dikonversi ke monomernya tanpa mengalami perubahan pada bentuk dasarnya. Lignin secara fisik membungkus mikrofibril selulosa dalam suatu matriks hidrofobik dan terikat secara kovalen pada selulosa maupun hemiselulosa. Hubungan lignin memberikan kekuatan pada struktur sel melalui ikatan bersama-sama yang terjadi pada serat-serat dari polisakarida-polisakarida (Fan, et al, 1987). Struktur lignin dapat dilihat pada gambar 2.3.



[sumber : <http://www.ili-lignin.com/aboutlignin.php>, 2011]

Gambar 2.3. Struktur lignin

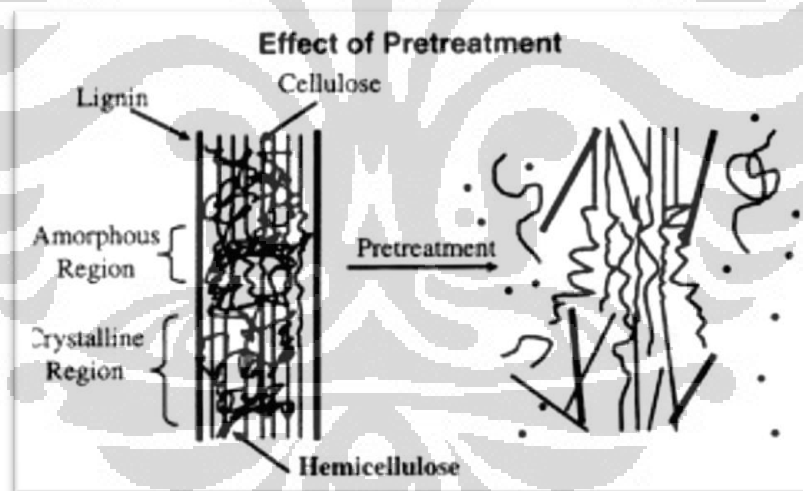
2.4 Delignifikasi

Delignifikasi merupakan proses pemisahan struktur lignin yang berikatan dan menyelimungi selulosa. Proses ini diperlukan untuk mempermudah hidrolisis selulosa.

Hambatan proses hidrolisis selulosa baik secara asam maupun enzimatik adalah adanya struktur kristalin dan lignin yang berfungsi sebagai pelindung selulosa (Enari, 1983). Masalah tersebut dapat diatasi dengan pemberian perlakuan pendahuluan terhadap bahan yang akan dihidrolisis. Salah satu metode

perlakuan pendahuluan secara kimia adalah perlakuan delignifikasi menggunakan NaOH.

Delignifikasi dilakukan dengan larutan NaOH, karena larutan ini dapat menyerang dan merusak struktur lignin, bagian kristalin dan amorf, memisahkan sebagian lignin dan hemiselulosa serta menyebabkan pembengkakan atau pembengkakan struktur selulosa (Marsden, et al, 1986). Terjadinya pembengkakan tersebut dapat dituangkan dalam beberapa teori yang berbeda namun saling berhubungan. Teori yang pertama menyatakan bahwa permukaan serat bekerja sebagai membran semi permeabel dimana tekanan osmotik terbentuk oleh larutan selulosa dalam pelarut. Teori kedua menyatakan bahwa pelarutan selulosa membuat efek pembengkakan. Teori ketiga menyatakan bahwa pembengkakan disebabkan oleh penolakan elektrostatis antara partikel selulosa, yang bermuatan karena ionisasi (Judoamijojo, 1989). Efek dari delignifikasi dapat dilihat pada gambar 2.4 berikut.



Gambar 2.4 Efek *pretreatment* delignifikasi

2.5 Enzim

Kata “enzyme” diperkenalkan oleh W.Kuhne pada tahun 1878 untuk suatu zat yang bekerja pada suatu substrat, dan berasal dari istilah Yunani yang berarti “didalam sel”. Enzim sulit didefinisikan secara tepat. Definisi yang dikemukakan

antara lain adalah enzim merupakan protein yang mempunyai daya katalitik karena karena aktivitas spesifiknya. Secara biokimia enzim dikatakan sebagai suatu kelompok protein yang berperan sangat penting dalam proses biologis. Tugasnya adalah sebagai katalisator dalam sel dan sangat bersifat khas. Enzim juga dinyatakan sebagai elektrolit dan menyerupai substansi amfoterik dalam membentuk garam bila bereaksi dengan asam dan basa. Kerja enzim pada umumnya mempercepat reaksi dengan menurunkan energi aktivasinya (Judoamijojo, 1989).

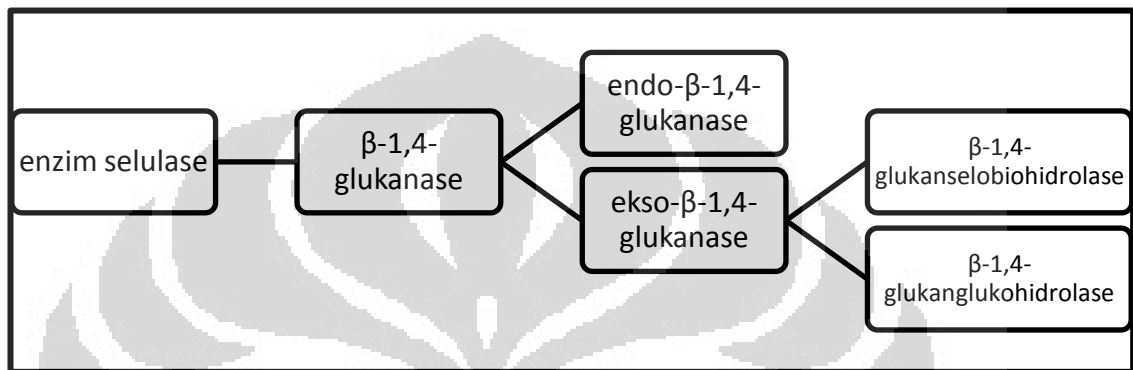
Setiap enzim mempunyai nomor kode enzim, nama rekomendasi dan nama sistematis. Nomor kode enzim diawali huruf EC (Enzyme Commission) dan mempunyai empat kelompok angka. Kelompok angka pertama menunjukkan kelas enzim berdasarkan jenis reaksinya, antara lain : oksidoreduktase (mengkatalisis reaksi oksidasi dan reduksi), transferase (mengkatalisis reaksi pemindahan gugus fungsi), hidrolase (mengkatalisis reaksi hidrolisis), liase (mengkatalisis reaksi pelepasan gugus), isomerase (mengkatalisis geometri atau perubahan struktur), dan ligase (mengkatalisis reaksi penggabungan dua senyawa disertai peruraian molekul ATP). Kelompok angka kedua menunjukkan sub-kelas enzim, kelompok angka ketiga menunjukkan sub-sub kelas enzim dan kelompok angka keempat menunjukkan nomor seri enzim dalam sub-sub kelas tersebut (Judoamijojo, 1989).

Ada dua pendapat yang membahas tentang pembentukan ikatan kompleks enzim-substrat. Pendapat pertama dikemukakan oleh Emil Fishcer yang mengajukan teori kunci dan gembok (lock and key theory), artinya spesifitas enzim termasuk adanya struktur komplementer antara enzim dengan substrat terjadi karena substrat mempunyai kesesuaian bentuk ruang dengan enzim pada struktur sisi aktif enzim. Pendapat kedua menyatakan bahwa enzim memiliki konformasi yang tidak kaku, sehingga dalam pembentukan kompleks enzim-substrat, sisi aktif dan bentuk ruang enzim dapat menyesuaikan dengan kondisi substrat. Teori ini lebih dikenal sebagai teori Induced-fit (Judoamijojo, 1989).

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain pH, temperatur, konsentrasi substrat, konsentrasi aktivator dan konsentrasi inhibitor.

2.5.1 Enzim Selulase

Selulase merupakan suatu kompleks enzim yang terdiri dari beberapa enzim yang bekerja bertahap atau bersama-sama menguraikan selulosa menjadi glukosa dengan cara menghidrolisis ikatan β -1,4 pada selulosa. Ada empat kelompok enzim utama yang menyusun selulase berdasarkan spesifitas substrat masing-masing enzim, seperti yang terdapat pada gambar 2.3.



Gambar 2.5 Pengelompokan enzim selulase berdasarkan spesifitas substrat

Empat kelompok enzim utama yang menyusun selulase berdasarkan spesifitas substrat masing-masing, yaitu (Enari, 1983) :

1. Enzim endo- β -1,4 glukanase, memiliki nama sistimatik β -1,4-D-Glukano hidrolase (EC. 3.2.1.4). Enzim ini menghidrolisis ikatan glikosidik β -1,4 secara acak dan bekerja terutama pada daerah amorf dari serat selulosa, seperti pada *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC).
2. Enzim β -1,4-D-Glukan Selobiohidrolase (EC.3.2.1.91), menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan selobiosa.
3. Enzim β -1,4-D-Glukan Glukohidrolase (EC.3.2.1.74), menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan D-glukosa.
4. Enzim β -1,4-Glukosidase dengan nama sistimatik β -1,4-Glukosida Glukohidrolase (EC.3.2.1.21), menghidrolisis selobiosa dan rantai pendek selo-oligosakarida dan menghasilkan D-glukosa.

2.6 *Trichoderma viride*

Trichoderma merupakan kapang dari Subdivisi Deuteromycotina, Kelas Hyphomycetes, Ordo Moniliales, konidiofor tegak, bercabang banyak, agak berbentuk kerucut, dapat membentuk kladospora, pada umumnya koloni dalam biakan tumbuh dengan cepat, berwarna putih sampai hijau (Agustina, 2010). Kapang *Trichoderma viride* juga digunakan untuk meningkatkan nilai manfaat jerami padi melalui fermentasi, karena kapang ini mempunyai sifat selulolitik dan mengeluarkan enzim selulase yang dapat merombak selulosa menjadi selubiosa hingga akhirnya menjadi glukosa.

Selulase yang dihasilkan oleh *Trichoderma viride* mengandung $\text{exo-}\beta\text{-1,4-}$ glucanase, $\text{endo-}\beta\text{-1,4-}$ glucanase dan $\beta\text{-1,4-}$ glucosidase. Kompleks selulase pada *Trichoderma viride* telah benar-benar dipelajari. Enzim ini dapat mengubah selulosa alami sama baiknya dengan selulosa turunan menjadi glukosa (Worthington, 1988).

2.7 Fermentasi Padat

Sistem Fermentasi padat telah menarik banyak perhatian semenjak diketahui bahwa sistem fermentasi ini memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan fermentasi cair (Zulfatus, 2010). Kelebihan yang dimiliki antara lain tingkat produktivitasnya tinggi, tekniknya sederhana, biaya investasi rendah, kebutuhan energi rendah, jumlah air yang dibuang sedikit, recovery produknya lebih baik, dan busa yang terbentuk sedikit. Dalam sistem fermentasi padat, substrat padat tidak hanya menyediakan nutrisi bagi kultur tetapi juga sebagai tempat penyimpanan air untuk sel mikroba (Tanyildizi, 2007).

Media fermentasi harus mengandung komponen-komponen yang diperlukan untuk pertumbuhan sel, pembentukan metabolit dan menyediakan energi yang cukup untuk biosintesa dan pemeliharaan sel. Nutrisi yang diperlukan oleh mikroorganisme diklasifikasikan sebagai berikut :

1. *Macronutrient*, diperlukan dalam konsentrasi lebih besar dari 10^{-4} M. C, N, S, P, Mg^{+2} dan K^{+} termasuk *macronutrien*.
2. *Micronutrient*, diperlukan dalam konsentrasi kurang dari 10^{-4} M. Trace element seperti Mo^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Na^{+} , vitamin, hormon pertumbuhan dan *metabolic precursor* termasuk *micronutrient*.

2.8 Isolasi Enzim

Dalam mengisolasi enzim dari suatu organisme harus dilihat terlebih dahulu karakteristik enzim tersebut berdasarkan fungsinya, yaitu enzim ekstraseluler atau enzim intraseluler. Pada enzim ekstraseluler isolasi enzim lebih mudah dilakukan dibandingkan enzim intraseluler, karena pada enzim intraseluler dibutuhkan suatu perlakuan untuk memecahkan dinding sel terlebih dahulu.

Isolasi enzim intraseluler merupakan suatu proses pelepasan enzim dari sel, sehingga harus dilakukan pemecahan dinding sel terlebih dahulu untuk mendapatkan enzim yang diinginkan. Teknik yang digunakan untuk memecah dinding sel dibagi menjadi dua, yaitu cara fisik dan cara kimia. Cara fisik dapat dilakukan dengan: alat homogenizer (efektif untuk memecah dinding sel hewan dan tumbuhan, tapi tidak untuk sel mikroba karena dinding selnya lebih keras), pembekuan dan pencairan, kejutan osmosa (bakteri gram negative lebih rentan terhadap perubahan tekanan osmosa yang besar dibandingkan bakteri gram positif), sonifikasi (pemberian getaran di atas frekuensi batas pendengaran manusia $> 20\text{kHz}$, ultrasonic), dan agitasi dengan abrasi (Setiasih, 2005).

Cara kimia yang digunakan antara lain: penggunaan detergen (dapat merusak dinding sel), penggunaan enzim litik (umumnya yang digunakan adalah lisozim, cara kerjanya adalah dengan memutus ikatan β -1,4 glikosida dari polisakarida penyusun dinding sel), dan juga penggunaan alkali (cara ini berhasil pada enzim-enzim yang stabil pada pH tinggi).

2.8.1 Teknik Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan serta ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1994). Metode-metode pemurnian enzim antara lain pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas dan filtrasi.

2.8.1.1 Pengendapan

Pengendapan biasanya dilakukan dengan menggunakan ammonium sulfat, pelarut organik, dan polimer dengan berat molekul tinggi.

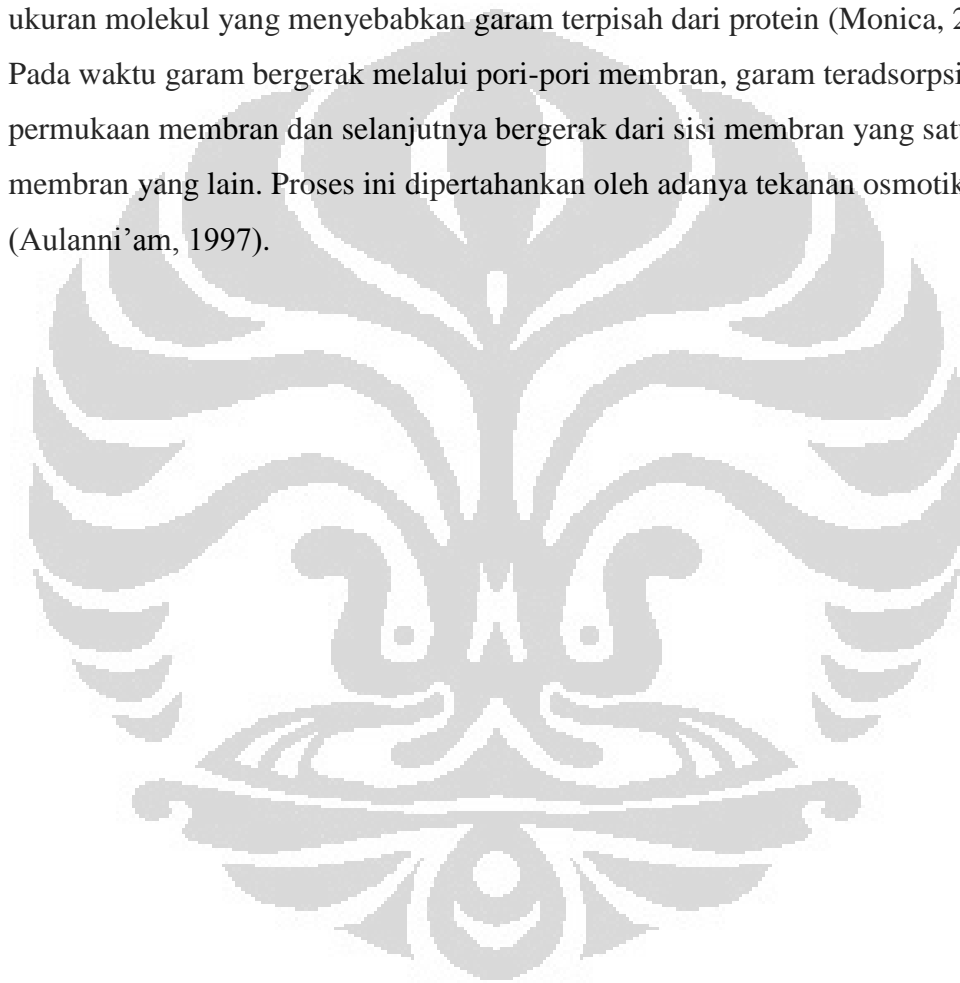
Dalam penggunaan ammonium sulfat, enzim dapat diendapkan dan difraksionasi dengan “salting out”, prinsipnya adalah pengendapan terjadi karena pada awalnya molekul air menghidrasi/mengelilingi molekul-molekul protein, namun saat ammonium sulfat ditambahkan maka protein akan mengendap karena afinitas air terhadap ammonium sulfat lebih besar daripada dengan protein sehingga protein menjadi tidak stabil dan akhirnya mengendap. Garam ini sering dipilih karena memiliki beberapa keuntungan yaitu: murah, mudah larut, “Self cooling” pada pelarutannya dalam air, dan kebanyakan enzim tidak rusak oleh adanya garam ini (Aulanni'am, 1997).

Penggunaan pelarut organik bertujuan untuk mengurangi tetapan dielektrik air, dengan demikian dapat mengurangi kelarutan protein karena interaksi antar molekul protein lebih disukai dibandingkan antara molekul protein dengan air. Protein dapat diendapkan dengan pelarut organik tanpa merusak struktur protein bila diendapkan pada suhu di bawah 4⁰C. Pelarut organik yang biasa digunakan antara lain: isopropanol, metanol, etanol dan aseton.

Jika pengendapan protein dengan menggunakan polimer berat molekul tinggi, maka biasanya yang digunakan adalah Polietilen glikol (PEG) dengan BM antara 4000-6000. Berbeda dengan pelarut organik, polimer ini dalam larutan protein akan memberikan efek penstabil molekul protein. Penggunaan polimer ini efektif pada konsentrasi rendah, sekitar 6-12% (Setiasih, 2005).

2.8.1.2 Dialisis

Dialisis adalah proses transpor solut melalui membran, dimana solut dipindahkan antara dua cairan. Pada proses dialisis terjadi perpindahan garam ammonium sulfat yang mempunyai berat molekul rendah dari sampel berganti dengan larutan buffer dalam dialisat (Aulanni'am, 1997). Difusi garam dari satu sisi membran ke sisi yang lain terjadi karena adanya gradien konsentrasi. Perbedaan kecepatan difusi melalui membran timbul karena adanya perbedaan ukuran molekul yang menyebabkan garam terpisah dari protein (Monica, 2007). Pada waktu garam bergerak melalui pori-pori membran, garam teradsorpsi pada permukaan membran dan selanjutnya bergerak dari sisi membran yang satu ke sisi membran yang lain. Proses ini dipertahankan oleh adanya tekanan osmotik (Aulanni'am, 1997).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bidang Teknologi Lingkungan Pusat Penelitian dan Pengembangan Kimia (P2K-LIPI), PUSPIPTEK, Serpong, pada bulan September sampai dengan Desember.

3.2 Alat-alat yang Digunakan

Pada penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah tabung reaksi, erlenmeyer, botol timbang, batang pengaduk, labu ukur, pipet tetes, pipet ukur, pipet mikro, plastik tahan panas, spatula, pinset, jarum ose, *cork borer* (diameter =1cm), pembakar spritus, *magnetic stirrer*, beaker glass, gelas ukur, alat timbang analitis, pH meter (Datalogging 9661), tabung *sentrifuge*, *sentrifuge*, *autoclave*, *vortex*, *waterbath*, *shaker*, inkubator, *hotplate*, oven, serta instrumen yang digunakan untuk analisis adalah spektrofotometer UV/VIS Hitachi-U-2000. Beberapa alat yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada lampiran 4.

3.3 Bahan

3.3.1 Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Trichoderma viride* isolat lokal yang berasal dari Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong, dengan kode T051. Biakan dipelihara dan diperbanyak pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA).

3.3.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari P2K-LIPI PUSPIPTEK, Serpong. Bahan-bahan Kimia yang digunakan untuk peremajaan jamur dan produksi enzim antara lain: PDA (Difco), amonium molibdat (Merck), glukosa (Merck), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), ekstrak yeast (Difco), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), H_3BO_3 (Merck), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), ekstrak malt (Difco), Pepton (Difco), jerami, dan akuades.

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam pembuatan buffer asetat antara lain: asam asetat glasial (Merck), natrium asetat (Merck), dan akuades.

Pada uji aktivitas selulase bahan-bahan yang digunakan terdiri dari: carboxymethyl cellulose (CMC) (BDH Laboratory Supply), kertas saring Whatman No.1, dan buffer asetat pH 5.

Reagen yang digunakan pada pengujian kadar protein digunakan bahan-bahan sebagai berikut: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), K-Na tartrat (Merck), NaOH (Merck), Na_2CO_3 (Merck), Folin-Ciocalteu (Merck), *bovine serum albumin* (BSA) (Merck) sebagai standar protein, dan akuades.

Glukosa yang terbentuk diukur dengan menggunakan metode Samogyi Nelson dengan bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), K-Na tartrat (Merck), Na_2CO_3 (Merck), Na_2SO_4 (Merck), ammonium molibdat (Merck), natrium arsenat (Wako Pure Chemical Industry), H_2SO_4 (Merck), glukosa (Merck) sebagai standar, dan akuades.

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang akan digunakan untuk media pertumbuhan jamur dan yang digunakan untuk regenerasi jamur seperti cawan petri, *cork borer* (diameter=1cm), spatula, pipet, jarum ose, erlenmeyer, disterilisasi terlebih dahulu

dalam oven 121⁰C selama 90 menit. Semua alat saat sterilisasi di bungkus dengan aluminium foil.

3.4.2 Preparasi Substrat Jerami

Sampel jerami diperoleh dari Garut, Jawa Barat varietas Sarinah. Jerami yang masih kasar dicacah hingga berukuran ± 2 cm dan dihaluskan dengan menggunakan *blender*. Selanjutnya jerami ditimbang, direndam dalam larutan NaOH 4% dengan perbandingan 1: 10 (w/v) selama 2 jam, lalu campuran tersebut di masukkan ke dalam alat *autoclave* selama 1 jam, pada suhu 121⁰C. Jerami selanjutnya disaring untuk dipisahkan dan dicuci berkali-kali dengan akuades hingga pH netral. Kondisi pH netral dinyatakan bila pH air cucian jerami sama dengan pH akuades. Kemudian sampel jerami tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 50⁰C lalu dihaluskan kembali menggunakan *blender*, dan disimpan pada suhu kamar untuk selanjutnya akan digunakan sebagai substrat medium pertumbuhan jamur *Trichoderma viride* strain T051.

3.4.3 Pembuatan Buffer dan Pereaksi

3.4.3.1 Pembuatan Pereaksi Uji Protein (Metode Lowry)

Pengujian kadar protein menggunakan metode Lowry. Pereaksi yang digunakan terdiri dari: larutan A yang dibuat dari 0,5 gram CuSO₄.5H₂O dan 1 gram K-Na tartrat. Keduanya dilarutkan dalam akuades sampai volume menjadi 100 mL. Larutan B dibuat dari 2 gram Na₂CO₃ dan 0,4 gram NaOH yang dilarutkan dalam akuades sampai volume mencapai 100 mL. Larutan C terdiri atas larutan A dan B yang dicampurkan dengan perbandingan 1:50. Larutan D adalah pereaksi Follin Ciocalteu 1N. Larutan standar yang dipakai adalah BSA dengan konsentrasi 1 mg/mL, lalu deret standar dibuat dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1mg/mL.

3.4.3.2 Pembuatan Pereaksi Uji Gula Pereduksi (Metodi Somogyi Nelson)

Pengujian terbentuknya gula pereduksi digunakan metode Somogyi Nelson. Pereaksi yang digunakan terdiri atas pereaksi tembaga alkali yang dibuat dari 4 gram CuSO₄.5H₂O, 16 gram K-Na tartrat, 24 gram Na₂CO₃ dan 180 gram

Na₂SO₄. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam akuades sampai volume mencapai 1 L. Pereaksi arsenomolibdat dibuat dari 100 gram ammonium molibdat yang dilarutkan dalam 1800 mL akuades ditambah 84 mL H₂SO₄ pekat, kemudian ditambahkan 12 gram Na-arsenat yang dilarutkan dalam 100 mL akuades. Campuran tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37⁰ C selama 24 jam dan disimpan dalam botol berwarna gelap. Larutan standar gula pereduksi adalah larutan glukosa yang dibuat dengan deret konsentrasi 0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16 mg/mL.

3.4.4 Pembuatan Medium

3.4.4.1 Pembuatan Medium Potato Dextrose Agar (PDA)

Sebanyak 3,9 gram PDA dilarutkan dalam 100 mL air, kemudian disterilisasi dalam *autoclave* selama 90 menit pada suhu 121⁰ C. Selanjutnya sebanyak 10 mL larutan PDA dituangkan dalam cawan petri dan didinginkan dalam *laminar air flow* dalam kondisi aseptik.

3.4.4.2 Pembuatan Medium Produksi dengan Variasi Nutrisi

Medium padat yang akan digunakan untuk proses fermentasi meliputi tiga jenis media dengan variasi komposisi nutrisi yang berbeda. Variasi yang dilakukan terdiri atas jerami dengan penambahan air (Medium Jerami-air), jerami dengan penambahan medium basal (Medium Basal), dan jerami dengan penambahan *trace element* (Medium *Trace Element*). Komposisi Medium Basal dan Medium *Trace Element* ditunjukkan pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2 seperti berikut:

Tabel 3.1 Komposisi Medium Basal

Komponen	Komposisi (gram/100 mL air)
Ekstrak malt	0,3
Ekstrak yeast	0,3
Pepton	0,5
Glukosa	1

Tabel 3.2 Komposisi *Medium Trace Element*

Komponen	Komposisi (mg/L air)
FeSO ₄ .7H ₂ O	100
MgSO ₄ .4H ₂ O	100
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,25
CaCl ₂ .2H ₂ O	10
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	20
H ₃ BO ₃	5

Semua bahan dilarutkan dengan 100 mL akuades.

3.4.4.3 Pembuatan Medium Aktivasi

Jenis fermentasi yang digunakan dalam pembuatan medium aktivasi adalah fermentasi padat. Sebanyak 5 gram sampel jerami dimasukkan dalam plastik tahan panas (ukuran 10x20 cm) dengan penambahan 10 mL nutrisi sesuai variasi yang ditentukan. Selanjutnya medium aktivasi disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 90 menit pada suhu 121⁰ C. Medium didinginkan dan siap digunakan sebagai medium aktivasi untuk kapang *Trichoderma viride* strain T051.

3.4.5 Persiapan Inokulum *Trichoderma viride*

Tujuan pembuatan inokulum adalah untuk mendapatkan biakan jamur *Trichoderma viride* strain T051 dengan umur yang diinginkan. Caranya adalah dengan menggosokkan biakan murni pada agar miring PDA (sediaan), lalu dipindahkan ke dalam cawan petri yang telah berisi medium PDA secara aseptis. Biakan diinkubasi, selama 3 hari pada suhu 30⁰C.

3.4.6 Pembuatan Starter

Inokulum hasil peremajaan yang berusia 3 hari pada cawan petri di cetak dengan menggunakan *cork borer* diameter 1 cm. Tiga butir inokulum hasil cetakan diinokulasikan ke medium aktivasi dalam beberapa variasi komposisi nutrisi seperti yang telah ditentukan pada poin 3.4.4.2, kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu 30⁰C.

3.4.7 Produksi Enzim Selulase Kasar

Inokulum hasil aktivasi yang berumur 3 hari diinokulasikan ke dalam masing-masing medium produksi yang telah disiapkan pada berbagai variasi komposisi nutrisi, lalu diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 10 hari. Pengambilan medium produksi selama proses fermentasi dilakukan pada hari ke-1, 3, 5, dan 7 untuk memperoleh ekstrak kasar enzim yang akan diuji aktivitas selulasenya.

3.4.8 Ekstrak Enzim Selulase Kasar

Media hasil fermentasi yang diperoleh pada hari ke- 1,3,5,dan 7 dimasukkan ke dalam gelas beker lalu ditambahkan 50 mL akuades, kemudian diaduk dan disaring dengan menggunakan kain kassa. Filtrat selanjutnya disentrifus pada suhu 4⁰C dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit. *Supernatant* yang diperoleh merupakan ekstrak enzim kasar dikumpulkan, kemudian dilakukan uji aktivitas selulase dan pengukuran kadar protein.

3.4.9 Pengujian Kadar Protein

Kadar protein ditentukan berdasarkan metode Lowry dengan menggunakan larutan standar BSA (bovin serum albumin). Sebanyak 0,1 mL enzim kasar ditambah dengan akuades hingga volume mencapai 4 mL, lalu ditambahkan 5,5 mL larutan Lowry C, dan 0,5 mL Lowry D. Campuran kemudian diaduk hingga homogen, dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya, campuran tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm. Hasil pembacaan absorbansi kemudian dikonversikan ke persamaan linier standar protein yang dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.4.10 Pengujian Aktivitas Enzim Selulase

Aktivitas selulolitik dari enzim kasar selulase yang diperoleh ditentukan berdasarkan kemampuannya dalam mengkatalisis hidrolisis dua macam substrat selulosa. Substrat yang digunakan pada percobaan ini yaitu: CMC 1%, dan Filter Paper Unit (kertas saring *whatman* no. 1). Komposisi pereaksi yang digunakan pada setiap pengukuran aktivitas selulase ditunjukkan pada Tabel 3.3 berikut:

Tabel 3.3 Komposisi substrat dan filtrat enzim untuk uji aktivitas

	Filter Paper Unit (FPU)	CMC 1%
Substrat	50 mg	1 mL
Buffer Asetat (pH 5)	1 mL	0,9 mL
Enzim	0,5 mL	0,1 mL

Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 45⁰C dengan variasi waktu inkubasi, yaitu 0, 30 dan 60 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan cara direndam dalam air mendidih selama ± 5 menit. Selanjutnya gula pereduksi yang terbentuk diuji dengan menggunakan metode Somogyi Nelson.

Rumus yang digunakan untuk menghitung aktivitas enzim berdasarkan NREL (1996) adalah sebagai berikut:

$$AE = \frac{(pt - q0)}{t} \times Fp$$

Keterangan:

AE = Aktivitas Enzim (U/mL)

pt = Konsentrasi glukosa pada waktu inkubasi t menit (µmol/mL)

q0 = Konsentrasi glukosa pada waktu inkubasi 0 menit (µmol/mL)

t = Waktu inkubasi (menit)

Fp = Faktor pengenceran

Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai 1 µmol glukosa yang dihasilkan permenit pada suhu 30⁰C.

Aktivitas spesifik enzim selulase dihitung berdasarkan rumus berikut :

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{aktivitas enzim}}{\text{konsentrasi protein}}$$

3.4.11 Pengujian Gula Pereduksi

Gula pereduksi yang terbentuk dari hasil hidrolisis substrat oleh enzim kasar selulase selanjutnya ditentukan , dengan menggunakan metode Samogyi Nelson.

Sebanyak 1 mL cairan hasil hidrolisis, ditambah dengan pereaksi tembaga alkali sebanyak 1 mL lalu campuran dipanaskan selama 20 menit dalam penangas air. Campuran setelah dingin, kemudian ditambah 1 mL pereaksi arsenomolibdat, dan diencerkan dengan 7 mL akuades, lalu diaduk hingga homogen, dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm. Hasil pembacaan absorbansi kemudian dikonversikan ke persamaan linier standar glukosa, dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.4.12 Pemurnian Enzim Selulase

Supernatan yang mengandung enzim kasar selulase kemudian di fraksinasi dengan penambahan garam ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan yang bervariasi, yaitu 0-20% (b/v), 20-50% (b/v), dan 50-70% (b/v).

Penambahan garam dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan pengaduk magnet (yang dilengkapi dengan *ice bath*) untuk mendapatkan konsentrasi garam yang merata di seluruh bagian larutan. Pengadukan dilakukan selama 2 jam, kemudian larutan dibiarkan mengendap selama satu malam. Campuran yang disentrifus pada kecepatan 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Jumlah ammonium sulfat yang ditambahkan dari larutan dengan tingkat kejenuhan S1% untuk menghasilkan larutan dengan tingkat kejenuhan S2% dalam 1 liter dapat dihitung dengan menggunakan rumus di bawah ini:

$$g = \frac{533(S_2 - S_1)}{100 - 0,3S_2}$$

S2= konsentrasi kejenuhan garam yang dituju

S1= konsntrasi kejenuhan garam mula-mula

Tiap endapan yang diperoleh dari berbagai fraksi ammonium sulfat selanjutnya ditentukan aktivitas enzim selulase dan kadar proteinnya.

3.4.13 Dialisis

Ukuran dan panjang membran selofan yang akan digunakan harus sesuai dengan volume larutan enzim yang akan dimurnikan. Kantung membran terlebih dahulu direndam dalam aquades selama 2 jam, lalu direndam dengan air panas

(70°C) selama 30 menit dan selanjutnya direndam dalam larutan EDTA alkalis selama 1 jam. Kantung membran kemudian dibilas dengan akuademin sampai bersih lalu direndam kembali dalam air panas 70°C.

Enzim hasil fraksinasi amonium sulfat dengan aktivitas tertinggi selanjutnya dimasukkan dalam membran selofan dan diikat kedua ujungnya. Membran direndam dalam buffer asetat 0,02 M pH 5 disertai pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* yang dilengkapi dengan *ice salt batch*. Buffer yang digunakan diuji setiap 2 jam sekali dengan penambahan larutan BaCl₂ 5% untuk menguji keberadaan sulfat dengan terbentuknya endapan putih BaSO₄. Bila terdapat endapan, buffer yang digunakan diganti. Dialisis dihentikan saat tidak lagi terbentuk endapan. Hasil dialisis selanjutnya diuji aktivitas enzim selulase dan kadar proteinnya.

3.4.14 Karakterisasi Enzim

Penentuan pH optimum aktivitas enzim dilakukan dengan melakukan uji aktivitas enzim dengan memvariasikan pH buffer yang digunakan yaitu 4; 4,5; 5; 5,5; 6; dan 7.

Penentuan pengaruh logam terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan cara uji aktivitas enzim dengan penambahan larutan CuCl₂, ZnSO₄, dan MgSO₄ dengan volume 1:1 terhadap volume enzim yang digunakan. Konsentrasi logam yang digunakan antara lain 1mM, 10 mM, 50mM, dan 100mM.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Peremajaan *Trichoderma viride* Strain T051

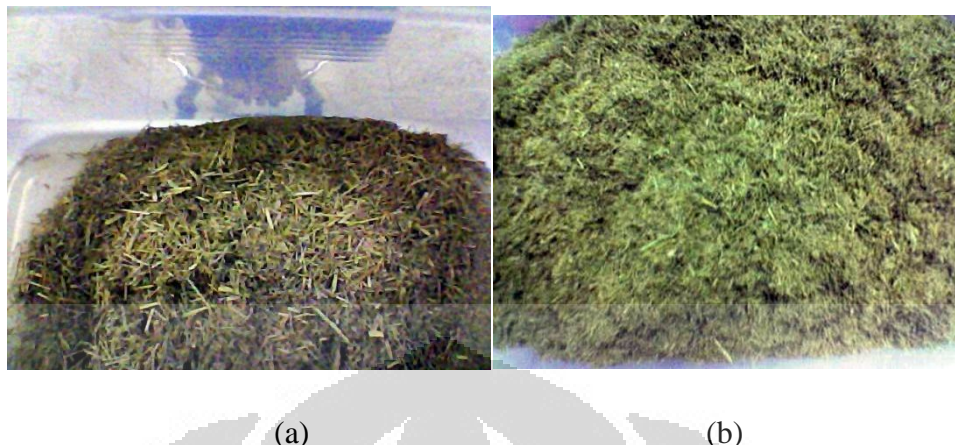
Pada penelitian ini sebagai sumber enzim digunakan kapang *Trichoderma viride* dengan strain T051. Kapang ini memiliki ciri-ciri konidia berwarna putih. Sebelum digunakan untuk proses fermentasi, kapang ini diremajakan terlebih dahulu, selama tiga hari, karena pada selang waktu tersebut hifa telah memenuhi PDA pada cawan petri.



Gambar 4.1 *Trichoderma viride* strain T051

4.2 Pengaruh Delignifikasi Terhadap Aktivitas Enzim

Jerami padi yang akan digunakan sebagai substrat pada proses fermentasi, sebelumnya didelignifikasi. Delignifikasi adalah langkah pertama yang diperlukan untuk bahan lignoselulosa menjadi komponen-komponen utama, yaitu lignin, selulosa dan hemiselulosa. Tujuan delignifikasi adalah meminimalkan jumlah lignin di dalam bahan selulosa. Ada beberapa cara delignifikasi, yaitu *pretreatment* fisik, fisikokimia, kimia dan proses biologi. Pada penelitian ini, untuk meminimalkan kadar lignin pada jerami, dilakukan delignifikasi menggunakan *pretreatment* kimia dengan NaOH 4%. Jerami padi direndam dalam NaOH 4% selama 2 jam, kemudian disterilisasi dengan *autoclave* selama 1 jam. Pada Gambar 4.2 diperlihatkan jerami yang telah dihaluskan sebelum dan setelah *dipretreatment* dengan NaOH.



(a) (b)
Gambar 4.2 Substrat jerami (a) jerami kasar ; (b) jerami hasil delignifikasi dengan NaOH

Setelah didelignifikasi, warna jerami menjadi lebih kuning dan massanya menjadi lebih ringan. Delignifikasi substrat dengan menggunakan larutan basa dipilih karena jika dibandingkan dengan *pretreatment* menggunakan larutan asam, *pretreatment* basa dengan NaOH dapat menghilangkan fraksi lignin lebih banyak dari biomassa karena kelarutan lignin dalam larutan alkali (Hamisa, 2009). Adanya safonifikasi ikatan ester dari residu lignin atau hemiselulosa memberi dampak selulosa menjadi lebih terbuka dan lebih mudah untuk berinteraksi dengan enzim, sehingga hidrolisis selulosa menjadi glukosa akan lebih mudah. Selain itu preparasi ini juga dapat menurunkan derajat polimerisasi dan kistalinitas dari struktur selulosa (Sun, 2002).

Pada penelitian ini dibandingkan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan dari fermentasi padat *Trichoderma viride* menggunakan substrat jerami yang didelignifikasi dan tidak didelignifikasi pada medium jerami air.

Tabel 4.1 Pengaruh pretreatment (delignifikasi) jerami padi terhadap aktivitas selulase yang dihasilkan dari *Trichoderma viride* strain T051

Waktu Fermentasi (hari)	Aktivitas (mU/mL)			
	Pretreatment Waktu inkubasi (menit)		Tanpa Pretreatment Waktu inkubasi (menit)	
	30	60	30	60
1	1,708	1,388	1,476	1,694
3	5,124	7,633	3,576	2,135
5	2,669	0,214	2,348	0,974
7	1,495	0,202	0,854	0,867

Dari Tabel 4.1 dapat dilihat bahwa delignifikasi dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase. Aktivitas tertinggi diperoleh pada waktu fermentasi selama 3 hari, sebesar 7,633 mU/mL pada jerami yang telah didelignifikasi, dan 3,576 mU/mL pada jerami yang tidak didelignifikasi.

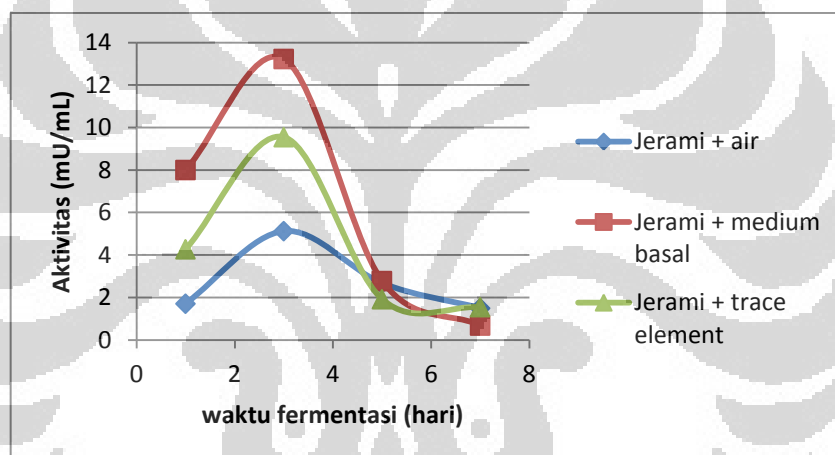
4.3 Pengaruh Variasi Komposisi Nutrisi Dalam Medium Fermentasi

Untuk mengetahui pengaruh variasi komposisi dalam medium fermentasi terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan, maka pada penelitian ini dilakukan fermentasi menggunakan tiga medium yang berbeda, yaitu medium jerami dengan penambahan air (medium jerami-air), jerami dengan penambahan medium basal (medium basal), dan jerami dengan penambahan *trace element* (medium *trace element*). Penambahan medium basal dalam medium fermentasi bertujuan untuk menambahkan konsentrasi sumber karbon dan nitrogen yang merupakan sumber utama pembentukan struktur sel. Penambahan *trace element* bertujuan untuk menambahkan nutrisi berupa mineral yang berfungsi sebagai kofaktor enzim, dan merupakan bagian dari struktur material sel. Fermentasi tanpa penambahan nutrisi dilakukan untuk mengetahui potensi substrat jerami sebagai sumber selulosa yang diharapkan dapat menjadi substrat untuk mensintesis enzim selulase.

Pengaruh variasi komposisi nutrisi dalam medium fermentasi terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan, dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Data uji aktivitas selulase pada berbagai medium fermentasi

waktu fermentasi (hari)	Aktivitas (mU/mL) pada variasi komposisi nutrisi		
	medium Jerami air	medium basal	medium <i>trace element</i>
1	1,708	8,000	4,270
3	5,124	13,226	9,548
5	2,668	2,773	1,921
7	1,494	0,682	1,547



Gambar 4.3 Pola aktivitas enzim selulase selama proses fermentasi pada berbagai medium produksi

Pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.3 dapat dilihat aktivitas enzim selulase yang dihasilkan dari medium dan waktu fermentasi yang berbeda. Aktivitas selulase tertinggi dihasilkan pada fermentasi hari ke-3 dengan menggunakan medium basal, yaitu sebesar 13,227 mU/mL diikuti medium *trace element* sebesar 9,548 mU/mL dan medium tanpa penambahan nutrisi 5,124 mU/mL.

Aktivitas selulase yang tinggi pada medium basal, dikarenakan pada medium ini mengandung tambahan sumber karbon berupa glukosa dan nitrogen berupa pepton. Sumber karbon akan dirombak dan digunakan untuk membangun massa sel. Nitrogen dalam sel merupakan komponen penyusun protein sel dan asam nukleat. Dengan banyaknya sel yang terbentuk, dibutuhkan lebih banyak

nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan sehingga enzim selulase yang bersifat induktif lebih banyak dihasilkan.

Penambahan *trace element* dalam medium produksi juga memberikan efek peningkatan aktivitas selulase, namun tidak sebanyak penambahan karbon dan glukosa. *Trace element* merupakan nutrisi esensial. Kekurangan *trace element* akan memperpanjang fase lag (adaptasi mikroba) dan dapat menurunkan laju pertumbuhan dan *yield*. Pengaruh *trace element* terhadap *yield* beberapa metabolit primer atau sekunder lebih besar dibandingkan terhadap pertumbuhan mikroba (Shuler, et al, 1992). Penambahan *trace element* yang berlebihan dapat menghambat produksi enzim yang dihasilkan.

4.4 Pengaruh Waktu Inkubasi dan Perbedaan Substrat Uji terhadap Aktivitas Selulase

Pada percobaan ini, pengujian aktivitas selulase dari hasil fermentasi jamur *Trichoderma viride* strain T051 pada ketiga medium produksi selama fermentasi 3 hari digunakan CMC dan FPU sebagai substrat uji. Selain itu pada percobaan ini, aktivitas selulase nya diuji pada waktu inkubasi yang berbeda, 30 dan 60 menit.

Selulase merupakan suatu kompleks enzim yang terdiri dari beberapa enzim yang bekerja secara bertahap atau bersama-sama menguraikan selulosa menjadi glukosa dengan cara menghidrolisis ikatan glikosida $\beta(1\rightarrow4)$ pada selulosa. Ada empat kelompok enzim selulase, yang dibedakan berdasarkan spesifisitas terhadap substratnya, yaitu endo- β -1,4 glukonase, β -1,4-D-glukan selobiohidrolase, β -1,4-D-glukan glukohidrolase dan β -1,4-glukosidase. Enzim endo-1,4- β -glukanase memiliki spesifisitas yang tinggi terhadap substrat yang bersifat amorf, seperti CMC. Enzim ini menghidrolisis ikatan glikosida $\beta(1\rightarrow4)$ secara acak. Endo-1,4- β -glukanase bekerja pada rantai dalam CMC menghasilkan oligo-sakarida atau rantai selulosa yang lebih pendek. *Cellulose* (CMC) memiliki kelarutan lebih tinggi daripada selulosa, sehingga mudah dihidrolisis. Satu unit

aktivitas (U) didefinisikan sebagai 1 μmol glukosa yang dihasilkan dari degradasi CMC tiap menit pada temperatur pengujian 45°C .

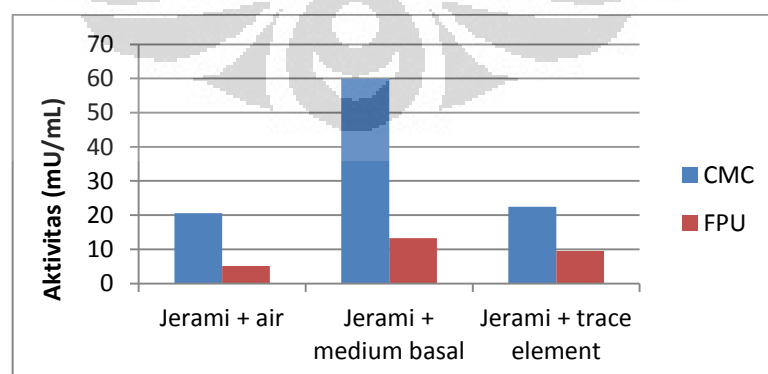
Uji aktivitas dengan FPU (Filter Paper Unit) digunakan untuk menunjukkan total aktivitas selulase sakarifikasi selulase dan lebih dikenal dengan sebutan FP-ase atau total aktivitas dari selulase. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai 1 μmol glukosa yang terbentuk selama satu menit pada pH 5 dan temperatur 45°C . Uji aktivitas dengan menggunakan kertas saring filter Whatman no.1 dengan ukuran strip 1x6 cm seberat 50 mg sebagai standar substrat lazim dilakukan karena substrat uji tersebut mudah diperoleh dan murah (Shuler, et al, 1992). Uji aktivitas dengan menggunakan metode ini memiliki beberapa kelemahan, diantaranya adalah inkonsistensi dalam ukuran, bentuk, dan metode melipat substrat uji dapat menyebabkan kesalahan dalam penentuan aktivitas. Sifat amorf atau kristalin yang heterogen pada kertas filter dapat mempengaruhi glukosa yang dihasilkan selama hidrolisis sehingga fungsi yang dihasilkan tidak linier dengan jumlah enzim selulase (Zhang et al., 2009). Fakta bahwa kompleks selulase alami cenderung memiliki kekurangan aktivitas β -glukosidase (Breuil et al, 1986) juga memberikan pengaruh terhadap hasil uji aktivitas. Jika sebuah kompleks enzim selulase memiliki aktivitas β -glukosidase yang rendah, absorbansi yang terbaca pada pengukuran gula pereduksi sebagian besar merupakan selobiosa yang tidak terhidrolisis sempurna menjadi glukosa (Mehdi, et al, 2010). Enzim selulase pada *Trichoderma viride* diketahui memiliki kandungan β -glukosidase yang cenderung rendah, sehingga akan berpengaruh terhadap hasil uji aktivitas, dimana selulosa yang terhidrolisis sebagian besar berupa selobiosa.

Tabel 4.3 Data aktivitas selulase dari berbagai medium produksi menggunakan substrat uji CMC dan FPU

	Aktivitas (mU/mL) pada variasi komposisi nutrisi					
	Medium jerami air		Medium basal		Medium <i>trace element</i>	
Substrat uji	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
CMC	20,558	29,985	59,971	31,106	22,457	17,514
FPU	5,124	7,633	13,226	6,080	9,548	5,658

Pada Tabel 4.3 dapat dilihat data hasil uji aktivitas enzim selulase menggunakan substrat uji CMC dan FPU dengan waktu inkubasi 30 menit dan 60 menit. Nilai unit aktivitas pada medium basal menggunakan substrat CMC adalah 59,971 mU/mL sedangkan dengan substrat FPU adalah 13,227 mU/mL. Demikian juga, dengan nilai unit aktivitas pada medium *trace element*, yaitu CMC (22,457 mU/mL) dan FPU (9,548 mU/mL), dan pada medium jerami air, yaitu CMC (20,559 mU/mL) dan FPU (5,124 mU/mL).

Penggunaan substrat uji CMC untuk penentuan aktivitas selulase pada semua medium fermentasi baik pada waktu inkubasi 30 maupun 60 menit menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan substrat uji FPU.



Gambar 4.4 Unit aktivitas optimum pada enzim selulase dengan substrat uji CMC dan FPU dengan waktu inkubasi 30 menit

4.5 Pemurnian Selulase

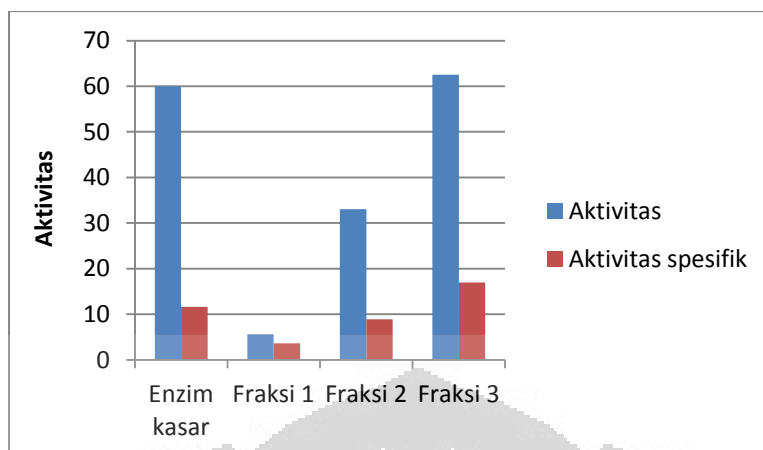
Pengendapan merupakan proses awal dalam pemurnian enzim, bertujuan untuk memisahkan protein enzim dari protein-protein lainnya. Penambahan garam atau pelarut organik dapat dilakukan untuk mengendapkan protein tanpa protein tersebut mengalami denaturasi. . Garam-garam yang mengandung anion bermuatan lebih dari satu seperti sulfat, fosfat dan sitrat dapat mempengaruhi kelarutan protein. Pada konsentrasi rendah, ion-ion garam akan melingkungi molekul- molekul protein. Peristiwa ini disebut dengan *salting in*. Sedangkan pada konsentrasi tinggi, ion-ion garam menyebabkan meningkatnya muatan listrik disekeliling molekul protein, serta menarik mekul air yang ada disekeliling molekul protein. Peristiwa ini menyebabkan menurunnya kelarutan protein dan disebut dengan *salting out* (Scopes, 1987).

Amonium sulfat merupakan garam yang paling umum/sering digunakan untuk mengendapkan protein enzim, karena, memiliki kelarutan yang besar (533 g/l, pada suhu 20°C), bersifat tidak beracun, harganya relatif murah dan dapat menstabilkan protein, pada konsentrasi tinggi dapat mencegah kerja enzim proteolitik dan bakteri.

Pada penelitian ini dilakukan pemurnian selulase dengan fraksinasi bertingkat amonium sulfat terhadap enzim selulase hasil fermentasi pada substrat jerami dengan penambahan medium basal selama 3 hari, dengan variasi kejenuhan sebesar 0-20% (fraksi 1), 20-50% (fraksi 2), dan 50-70% (fraksi 3). Pada setiap fraksi yang diperoleh dilakukan uji aktivitas dan kadar protein, sehingga dapat diketahui nilai aktivitas spesifiknya.

Tabel 4.4 Data hasil fraksinasi enzim selulase

Tahapan	Aktivitas (mU/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (mU/mg)	Tingkat kemurnian (kali)	Rendemen (%)
Enzim kasar	59,970	5,161	11,617	1	100
Fraksi 1	5,605	1,551	3,613	0,311	0,934
Fraksi 2	33,068	3,710	8,910	0,767	6,301
Fraksi 3	62,550	3,687	16,961	1,043	5,960
Filtrat sisa	-	1,157	-	-	-



Gambar 4.5 Grafik aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase dari fraksi ammonium sulfat

Dari Tabel 4.4 dan Gambar 4.5 dapat dilihat bahwa aktivitas dan aktivitas spesifik yang tertinggi terdapat pada fraksi 3 (50-70%) yaitu sebesar 62,550 mU/mL dan 16,9613 mU/mg. Kadar protein ekstrak kasar selulase lebih besar dibandingkan kadar protein selulase yang telah dimurnikan. Hal ini disebabkan karena di dalam ekstrak kasar selulase masih terdapat banyak protein non enzim. Pemurnian dengan penambahan amonium sulfat mengakibatkan kadar protein selulase menurun karena protein non enzim dalam selulase terendapkan.

Setelah diperoleh hasil fraksionasi dengan aktivitas tertinggi, dilakukan dialisis dengan kantong selofan terhadap fraksi tersebut. Tujuannya ialah menghilangkan kelebihan garam amonium sulfat yang ditambahkan selama proses fraksionasi. Perbandingan aktivitas enzim sebelum dan sesudah dialisis dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Data Aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase sebelum dan sesudah dialisis

	Aktivitas (mU/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (mU/mg)
Fraksi 3 sebelum dialisis	62,5501	3,68775	16,9613
Fraksi 3 setelah dialisis	53,992	2,1646	24,943

Dari data pada Tabel 4.5 terlihat bahwa setelah dialisis terjadi kenaikan aktivitas spesifik enzim menjadi 24,943mU/mg sementara aktivitasnya menurun menjadi 53,992mU/mL. Hal ini dikarenakan selama proses dialisis terjadi pengenceran, yang diakibatkan oleh tingginya konsentrasi dalam sampel enzim sehingga terjadi pembungan akibat tekanan osmotik dimana air memasuki kantung dialisis. Sedangkan tingginya penurunan total protein pada penggunaan membran dialisis, disebabkan adanya protein yang keluar dari membran (Scopes, 1987). Fraksi dialisis meningkatkan kemurnian enzim 1,147 kali dari enzim kasar.

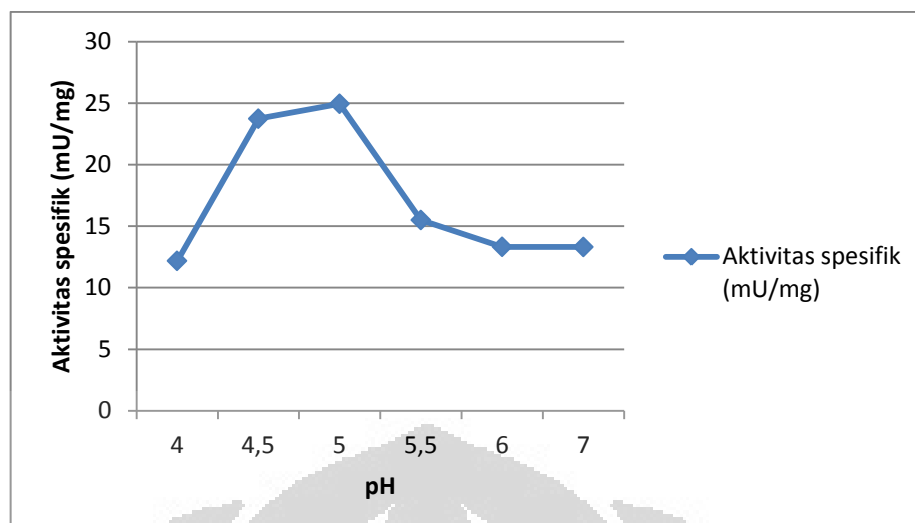
4.6 Penentuan pH optimum dan pengaruh logam terhadap aktivitas spesifik enzim selulase

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH, karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Perubahan pH atau pH yang tidak sesuai akan menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim berubah. Selain itu perubahan pH juga menyebabkan denaturasi enzim dan mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim (Girindra, 1993).

Pengaruh pH dalam larutan enzim akan melibatkan konsentrasi ion H^+ . Perubahan konsentrasi H^+ dapat mempengaruhi sifat ionik rantai samping residu asam amino di sisi aktif maupun di luar sisi aktif enzim tersebut.

Tabel 4.6 Aktivitas enzim selulase pada berbagai nilai pH

pH	Aktivitas (mU/mL)	Aktivitas Spesifik (mU/mg)
4	26,3648	12,18
4,5	51,3703	23,732
5	53,992	24,943
5,5	33,5491	15,499
6	28,8304	13,319
7	28,8043	13,307



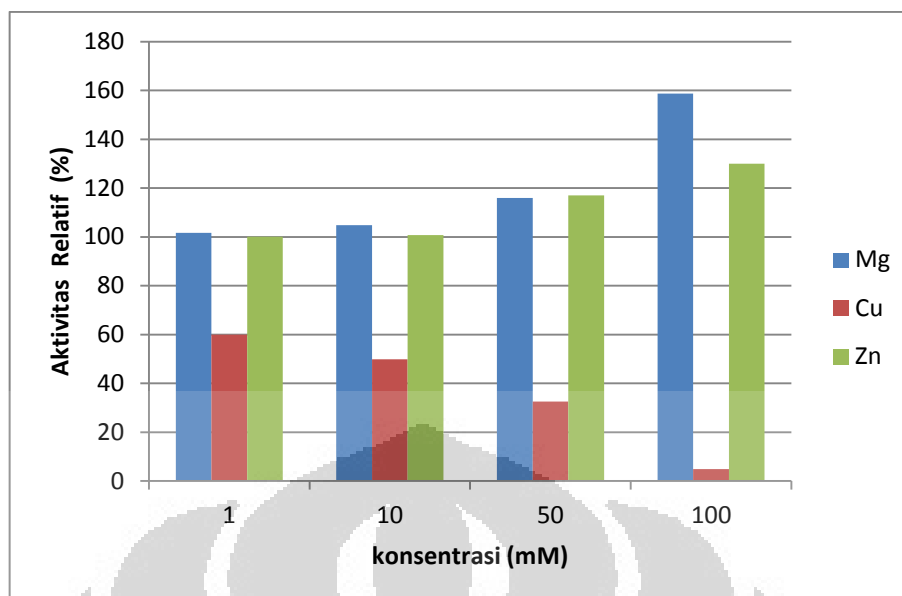
Gambar 4.6 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim selulase

Berdasarkan data yang diperoleh pada Tabel 4.6, aktivitas enzim selulase dari *Trichoderma viride* strain T051 optimum pada pH 5. Kondisi pH optimum untuk jamur penghasil selulase umumnya bersifat asam, pH optimum aktivitas enzim selulase berkisar pada pH 4,5 – 6,5 (Susilawati, 2002). Pada umumnya enzim hanya aktif pada kisaran pH yang terbatas.

Setelah diketahui pH optimum, selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan menambahkan ion logam. Ion logam yang digunakan adalah beberapa jenis logam dengan muatan bivalen, antara lain Mg^{2+} , Cu^{2+} dan Zn^{2+} .

Tabel 4.7 Pengaruh ion logam pada berbagai konsentrasi

Logam	Aktivitas Spesifik (mU/mg)				Aktivitas relatif (%)			
	1mM	10mM	5 mM	100mM	1 mM	10 mM	50 mM	100mM
Mg	25,34	26,12	28,92	39,574	101,603	104,755	115,944	158,657
Cu	14,96	12,43	8,118	1,218	60,005	49,834	32,546	4,883
Zn	24,95	25,131	29,173	32,426	100,02	100,75	116,958	130,00
Kontrol	24,943				100			



Gambar 4.7 Hubungan antara variasi konsentrasi logam terhadap % aktivitas enzim selulase yang dihasilkan *Trichoderma viride* strain T051

Dari Tabel 4.7 dan Gambar 4.7 dapat dilihat pengaruh logam terhadap aktivitas relatif enzim selulase. Logam Cu^{2+} menghambat kerja enzim seiring dengan bertambahnya konsentrasi yang digunakan, sementara pada konsentrasi yang sama Zn^{2+} dan Mg^{2+} bersifat mengaktifkan kerja enzim. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah adanya senyawa inhibitor atau aktivator.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

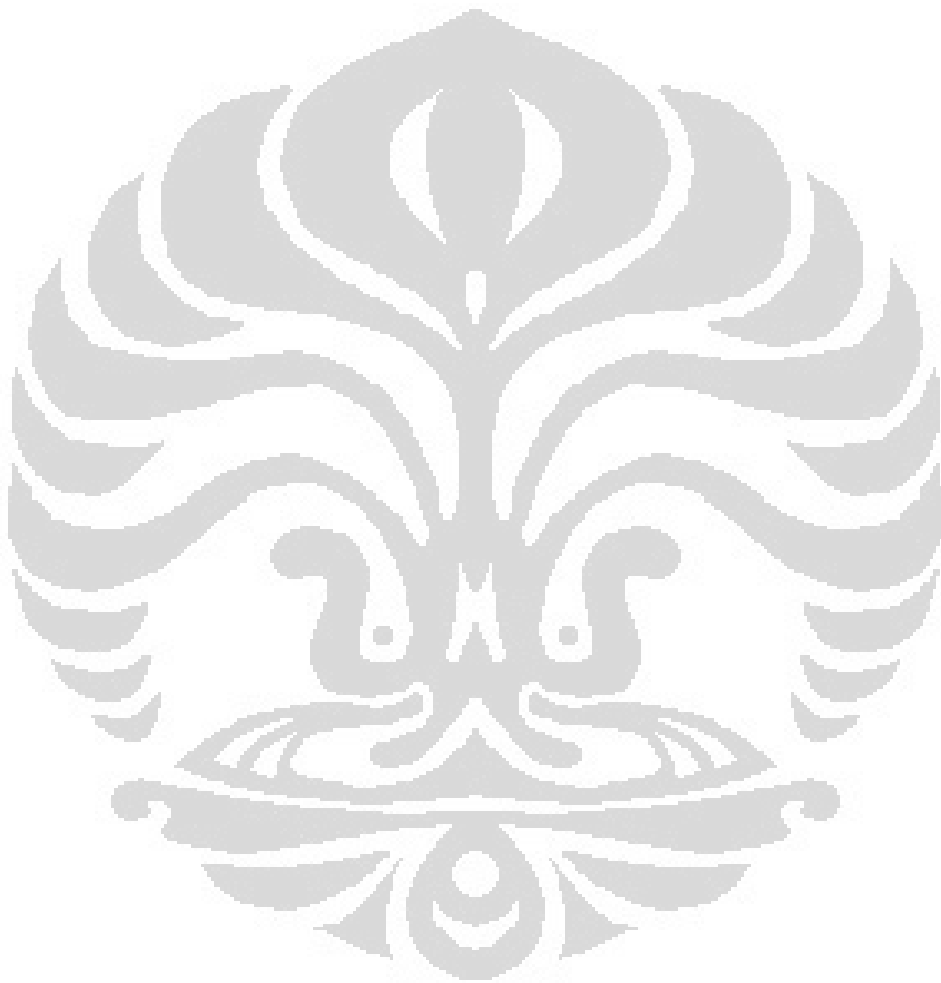
Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Delignifikasi substrat jerami sebagai medium pertumbuhan *Tirichoderma viride* meningkatkan aktivitas enzim selulase .
2. Aktivitas selulase tertinggi ditunjukkan pada medium jerami hasil delignifikasi dengan penambahan medium basal dan waktu fermentasi selama 3 hari sebesar 59,97 mU/mL. Aktivitas selulase ini diperoleh dari hasil pengujian menggunakan substrat uji CMC 1% dengan waktu inkubasi selama 30 menit.
3. Aktifitas spesifik tertinggi enzim selulase berada pada fraksi ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 50-70% sebesar 16,9613 U/mg.
4. Dialisis terhadap enzim hasil pemurnian dapat meningkatkan kemurnian enzim selulase sebesar 1,147 kali dari enzim kasar dengan aktivitas spesifik menjadi 24,943 mU/mg.
5. Hasil karakterisasi menunjukkan enzim selulase yang diperoleh memiliki pH optimum 5. Aktivitas enzim ini diinhibisi oleh ion logam Cu^{2+} dengan konsentrasi 100mM sebesar 4,883% dan diaktivasi oleh ion Zn^{2+} dan Mg^{2+} masing-masing pada konsentrasi 100mM berturut-turut sebesar 158,657% dan 130%.

5.2 Saran

1. Untuk penelitian selanjutnya, perlu diteliti kembali pengaruh masing-masing mineral dalam trace element terhadap aktivitas enzim selulase.
2. Perlu dilakukan penelitian terhadap variasi medium fermentasi lain, seperti penggabungan penambahan nutrisi berupa trace element dan medium basal dalam satu proses fermentasi yang sama.

3. Karakterisasi terhadap selulase yang dihasilkan perlu diteliti lebih lanjut, seperti pengaruh suhu dan kinetika enzim.



DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, Ika. (2010). *Studi Awal Produksi Enzim Selulase Oleh Trichoderma sp. Strain T004 dan T051 Menggunakan Substrat Pelepah Sawit*. Depok : Departemen Kimia FMIPA UI.
- Anwar N., Widjaja A., Winardi S. (2010). *Peningkatan Unjuk Kerja Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi Menggunakan Campuran Selulase Kasar dari Trichoderma reesei dan Aspergillus niger*. Makara, SAINS, Vol. 14 No.2, November 2010: 113-116.
- Aulanni'am, B.C., Warsito, A.P. & Mahdi, C. (1997). *Optimasi medium shake flask culture untuk produksi ezim selulase dari T.viride bebas & amobil*. Jurnal penelitian ilmu-ilmu teknik. 9: 25-34.
- Breuil C, Mayers P, Saddler JN. (1986). *Substrate conditions that influence the assays used for determining the beta-glucosidase activity of cellulolytic microorganisms*. Biotechnol Bioeng 28: 1653–1656.
- Dashtban M., Maki M., Leung K.T, Mao C., and Qin W. (2010). *Cellulase Activities in Biomass Conversion: Measurement Methods and Comparison*. Critical Reviews in Biotechnology, 2010, 1–8, Early Online.
- Dewi, Kurnia Herlina. (2002). *Hidrolisis Limbah Hasil Pertanian Secara Enzimatik*. Akta Agrosia, Vol. 5, No. 2, hal. 67 –71.
- Dobermann, A., T.H. Fairhust .(2002). *Rice Straw Management*. Better Crops International, Vol. 16, Special Supplement.
- Enari, T.M. (1983). *Microbial Cellulase*. Applied Science Publisher, New York.
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M., and Lee, Y.-H. (1987). *Cellulose hydrolysis*. Biotechnology Monographs, Springer-Verlag: New York.
- Girindra A.(1993). *Biokimia I*. Jakarta : PT Gramedia Pustaka. p. 91-113.

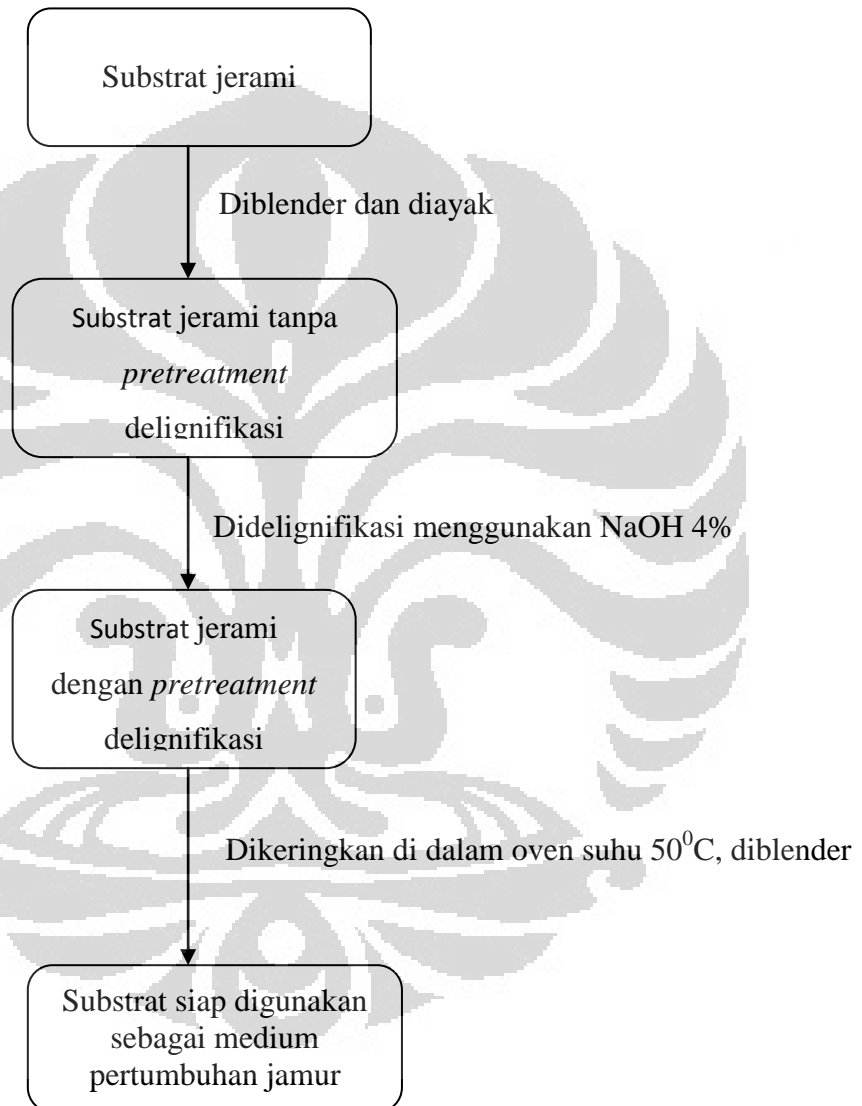
- Gunam, I.B.W., N.S, Antara. (1999). *Study on Sodium Hydroxide Treatment of Corn Stalk to Increase Its Cellulose Saccharification Enzymatically by Using Culture Filtrate of Trichoderma reesei*. Gitayana (Agric. Technol. J.). 5 (1): 34-38.
- Hamisan, A.H. (2009). *Delignification of Oil Palm Fruit Bunch using Chemical and Microbial Pretreatment Methode*. Malaysia. Universiti Putra Malaysia.
- Hudoyono, Sumi. (2004). *Hand Out Biokimia*. Depok: Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia
- Judoamidjojo, R.M., E.G Said dan L. Hartoto. (1989). *Biokonversi*. Bogor : PAU Bioteknologi IPB.
- Lehninger, A. L.(1994). *Dasar-dasar Biokimia, Jilid 2*.Alih bahasa: Maggy, T., Jakarta : Erlangga, 234-239.
- Marsden, W.L and P.P. Gray. (1986). *Enzymatic Hydrolysis of Cellulases in Lignocellulosic Material*. CRC. Critical Rev. In Biotechnol. 3: 235-276
- Monica, A.D.N. (2007). *Studi Aktivitas Spesifik Selulase dari Lactobacillus collinoides Yang Dimurnikan Dengan Pengendapan Bertingkat Amonium Sulfat*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.
- Scopes, R. K. (1987). *Protein Purification : Principle and Practice. Second Edition*. New York : Springer Verlag.
- Setiasih, Siswati. (2005). *Hand Out Bioteknologi*. Depok: Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia.
- Shuler Michael L., Fikret Kargi. (1992). *Bioprocess Engineering Basic Concepts*, Prentice-Hall International Inc., New Jersey.
- Sun, Y. (2002). *Enzymatic Hydrolysis of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production*, Ph.D. thesis: NC State University, Raleigh, NC.

- Susilawati, D.N., Rosmimik, Saraswati, R., Simanungkalit, R .D.M. & Gunarto, L.(2002). *Koleksi, karakterisasi, dan preservasi mikroba penyubur tanah dan perombak bahan organik*. Prosiding seminar hasil penelitian rintisan dan bioteknologi tanaman. Balai penelitian bioteknologi dan sumberdaya genetik pertanian.
- Tanyildizi M.S,Özer D., Elibol M..(2007). *Production of bacterial α -amylase by *B. amyloliquefaciens* Under Solid Substrate Fermentation*. Biochemical Engineering Journal Volume 37, Issue 3, 15 December 2007, Pages 294-297.
- Vintila, T., Croitoriu, V. , Dragomirescu, M., and Nica, D.(2010). *The Effects of Bioprocess Parameters on Cellulase Production with *Trichoderma viride* CMIT35*. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 2010, 43 (1).
- Walker, G.M.. (2000). *Role of Metal Ions in Brewing Yeast Fermentation Performance*. Brewing Yeast Fermentation Performance, Blackwell Science Ltd., pgs.86-91.
- Wen Z., Liao W., Chen S. (2005). *Production of Cellulase by *Trichoderma reesei* From Dairy Manure*. Bioresource Technology 96 (2005) 491–499.
- Wise, L.E., and Lauer, K.H. (1962). *Pulp and Paper Science and Technology, Vol I, Ch. 3*.Mc.Graw-Hill Book Co.Inc., New York.
- Worthington, C.E. (1988). *Worthington Enzyme Manual* pp. 76-79. Worthington Biochemical Corporation, Freehold. NJ
- Zhang Y-HP, Hong J, Ye X.(2009). *Cellulase assays*. Methods Mol Biol 581: 213–231.
- Zulfatus S., Noviana I.S., Abdullah.(2010). *Produksi Enzim Selulase oleh *Aspergillus niger* Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat*. Semarang: Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik UNDIP.

LAMPIRAN

Lampiran 1: Bagan Kerja

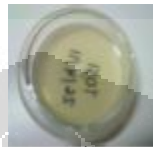
I. Persiapan Substrat Medium Produksi



II. Peremajaan Jamur *Trichoderma viride* strain T051



Biakan murni T051



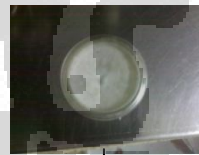
Inokulasi 1 ose biakan murni

Inkubasi pada suhu 30°C dalam inkubator selama 3 hari



III. Pembuatan Starter

Dicetak menggunakan *cork borer* diameter 1 cm, diinokulasi 3 butir ke medium starter



starter jerami tanpa nutrisi

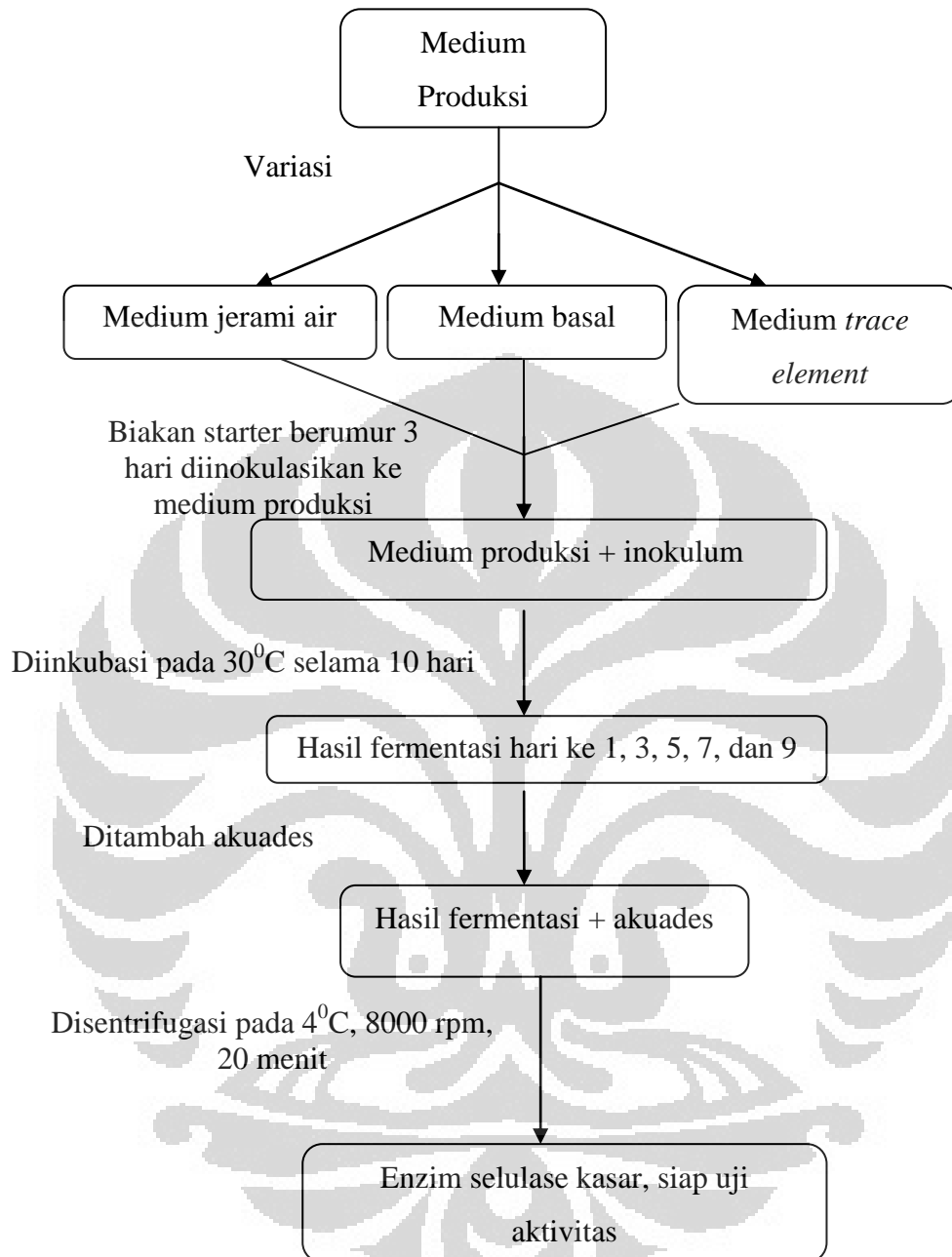
starter jerami + medium basal

Starter jerami + trace element

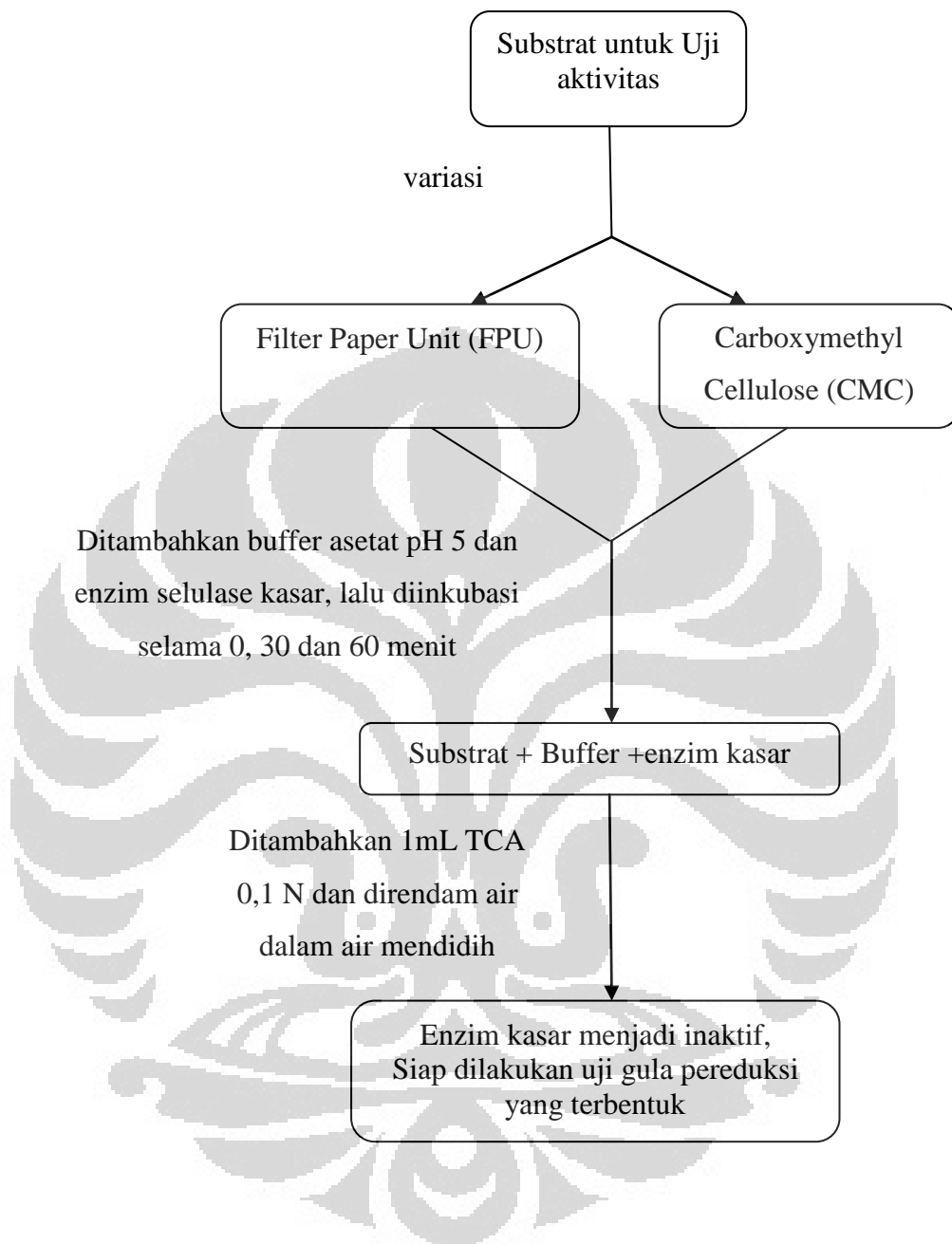
Inkubasi pada 30°C selama 3 hari

Hasil aktivasi jamur *Trichoderma viride* strain T051 (starter berumur 3 hari)

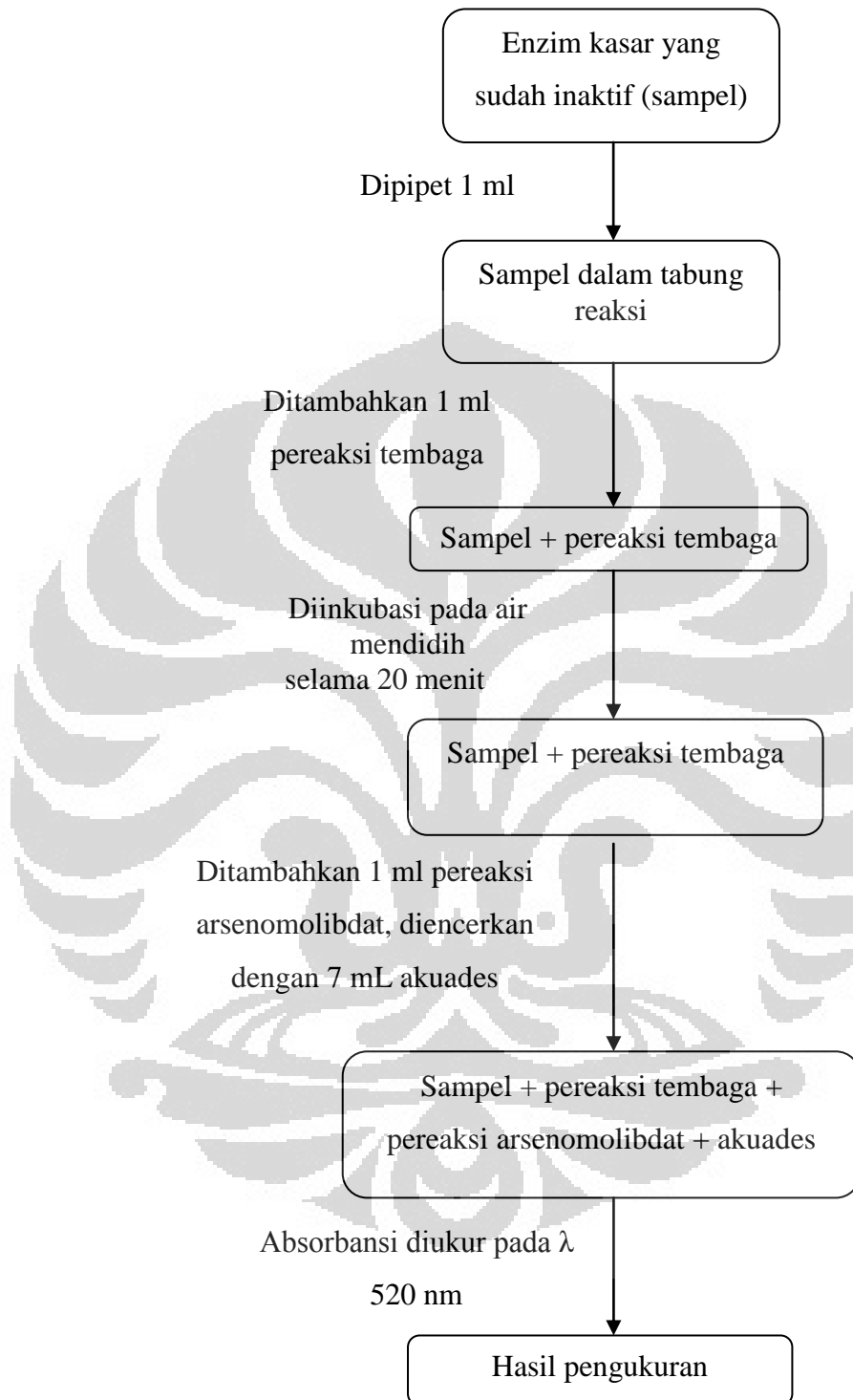
IV. Produksi Enzim Selulase Kasar



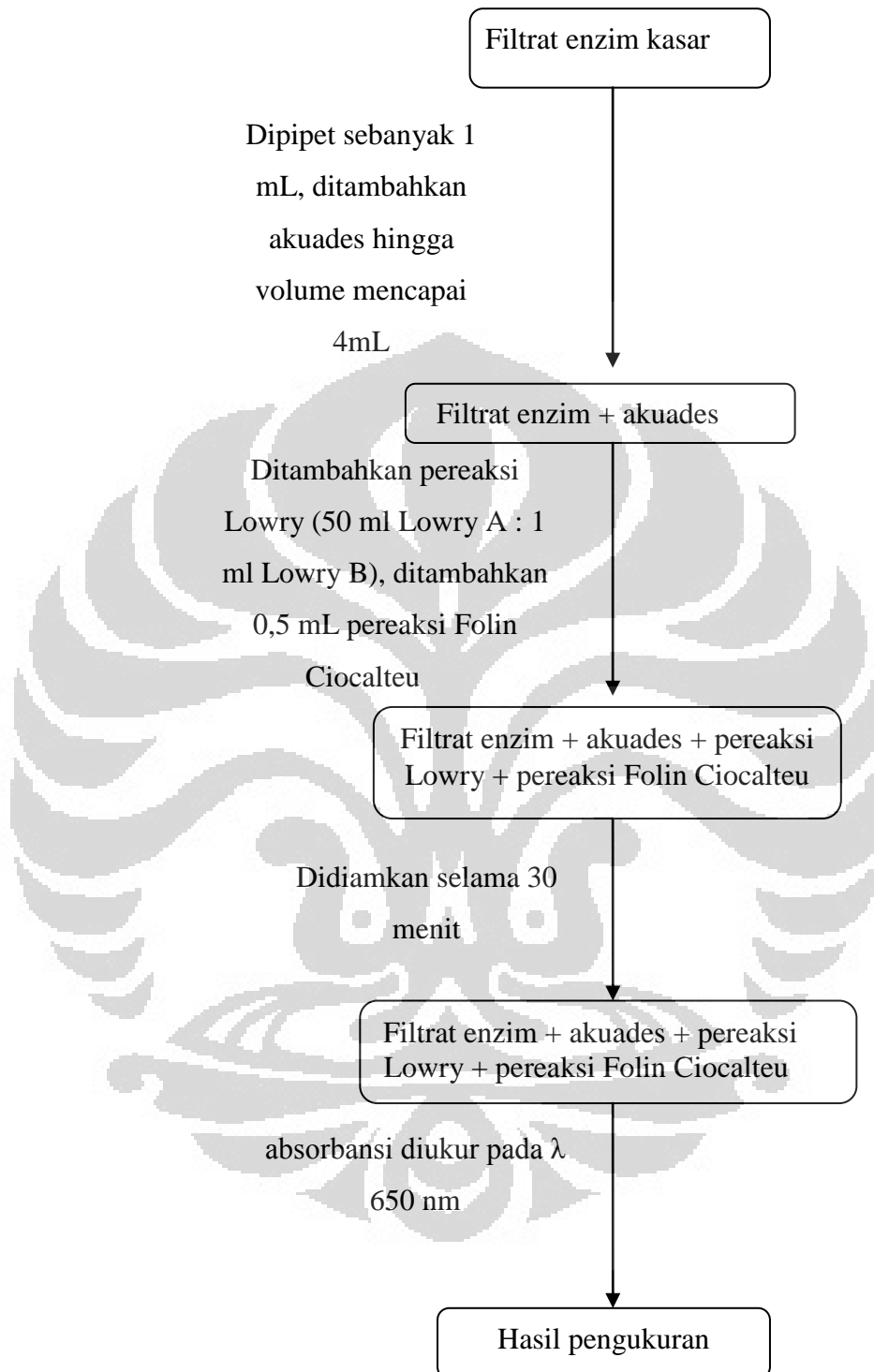
V. Uji Aktivitas Enzim Selulase Kasar



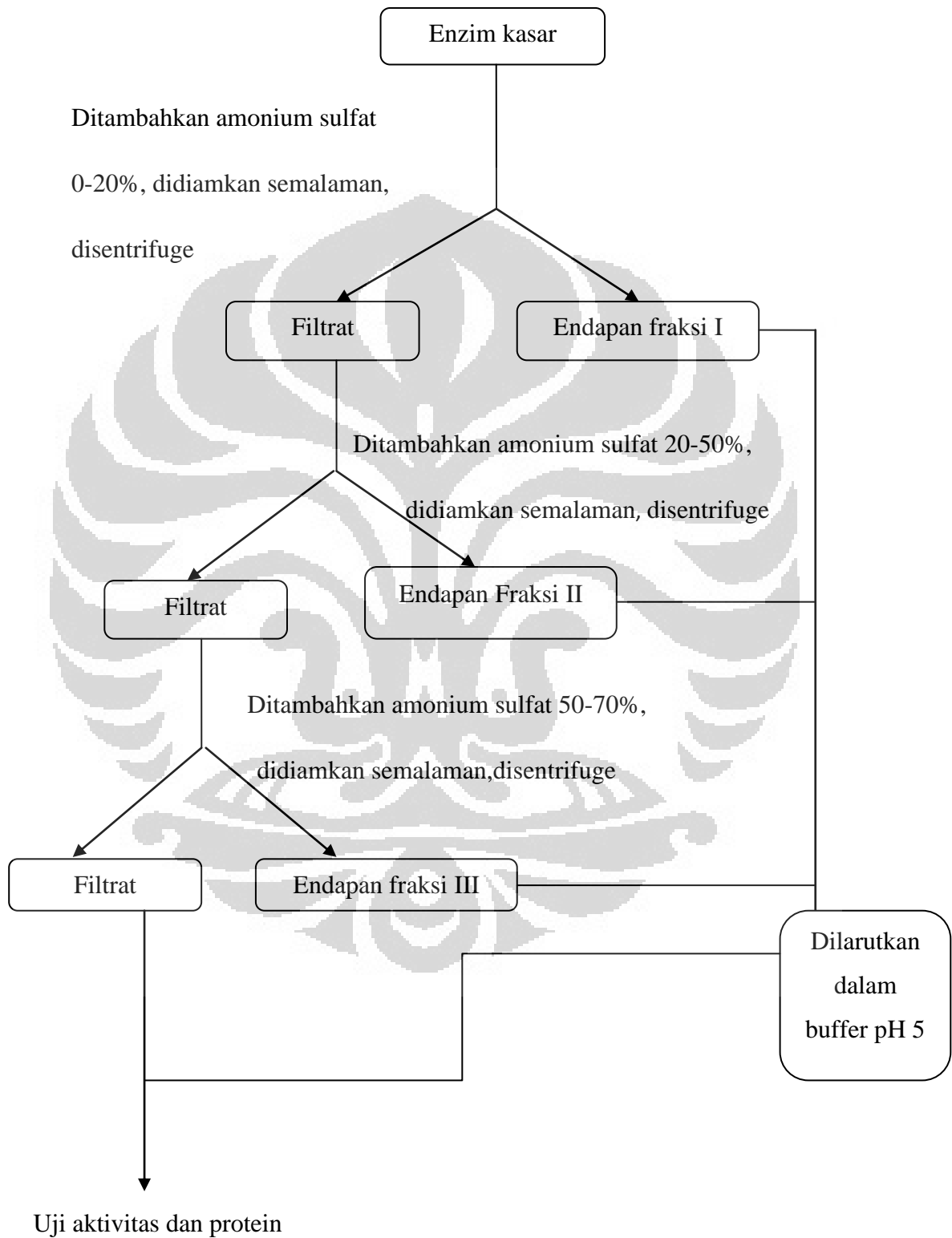
VI. Pengukuran Gula Pereduksi (Somogyi Nelson)



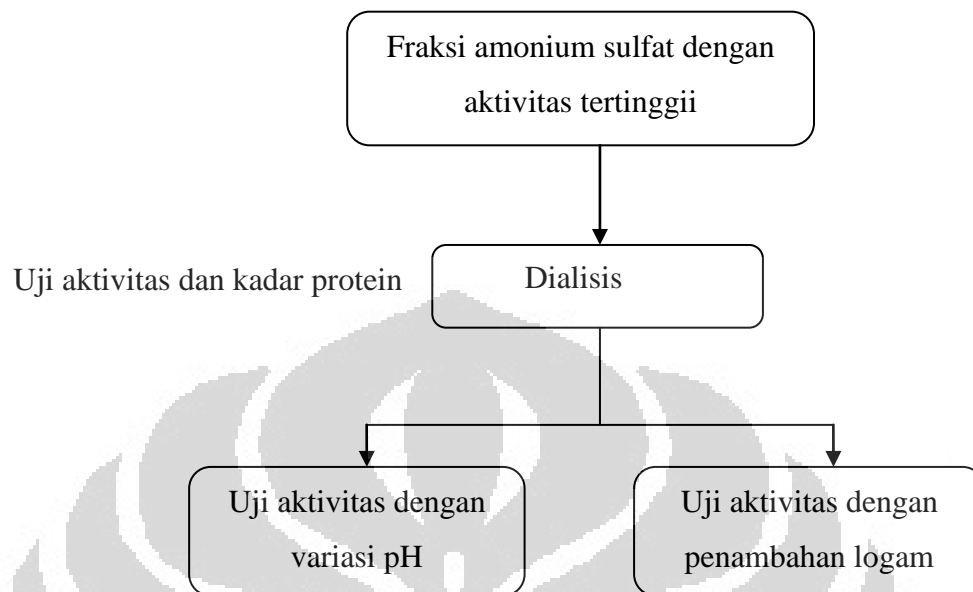
VII. Pengukuran Kadar Protein



VIII. Pemurnian Enzim Selulase



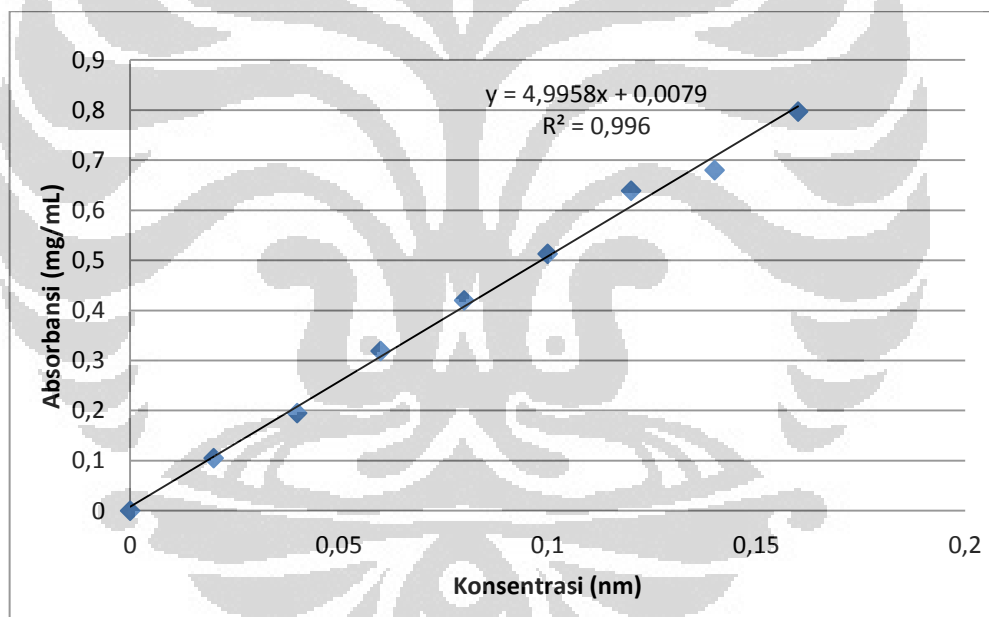
IX. Dialisis dan penentuan pH optimum dan pengaruh logam



Lampiran 2 : Data Standar Glukosa

Tabel L. 2. Konsentrasi Standar Glukosa

Konsentrasi (mg/mL) (x)	Absorbansi λ_{650} (y)
0	0
0,02	0,098
0,04	0,187
0,06	0,263
0,08	0,328
0,1	0,388
0,12	0,466
0,14	0,528
0,16	0,605
0,18	0,748

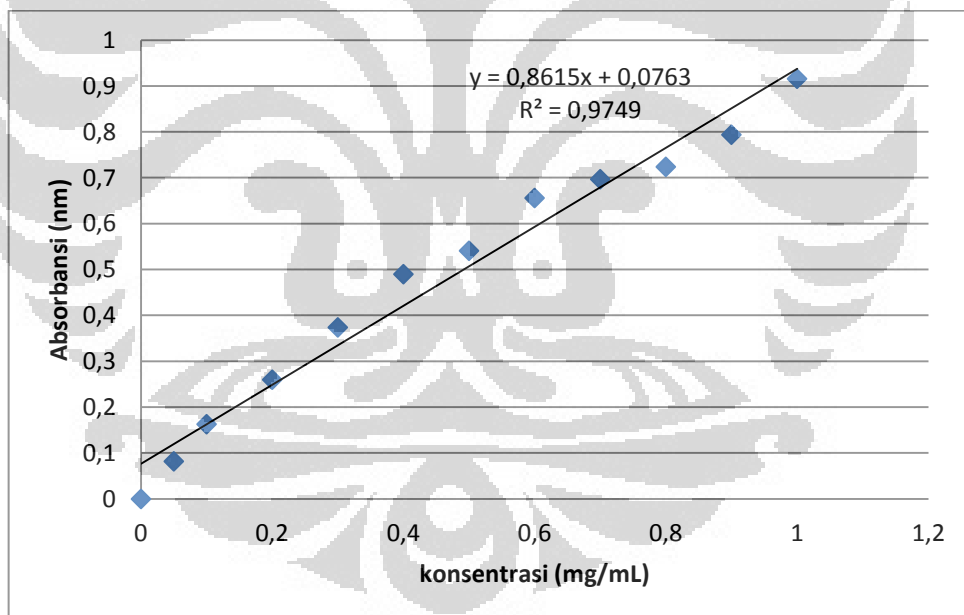


Gambar L.2. Grafik Standar Glukosa

Lampiran 3 : Standar Protein (BSA)

Tabel L.3. Konsentrasi Standar BSA

Konsentrasi (mg/mL) (x)	Absorbansi λ_{520} (y)
0	0
0,05	0,082
0,1	0,163
0,2	0,26
0,3	0,374
0,4	0,49
0,5	0,541
0,6	0,656
0,7	0,697
0,8	0,724
0,9	0,794
1	0,916



Gambar L.3. Grafik Standar Protein (BSA)

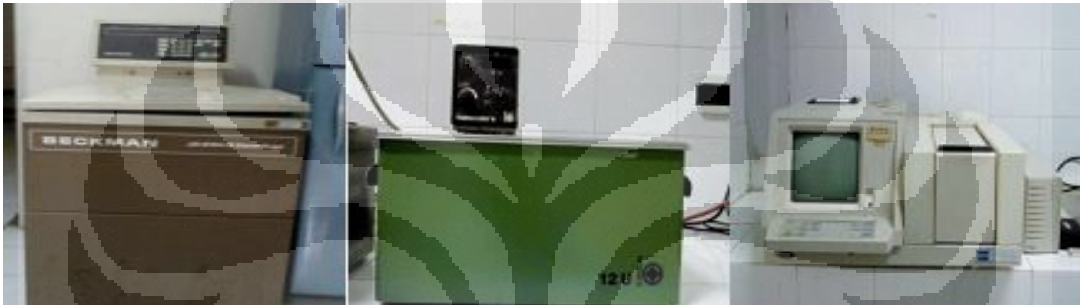
Lampiran 4: Alat-alat yang Digunakan



Hotplate

Stirrer

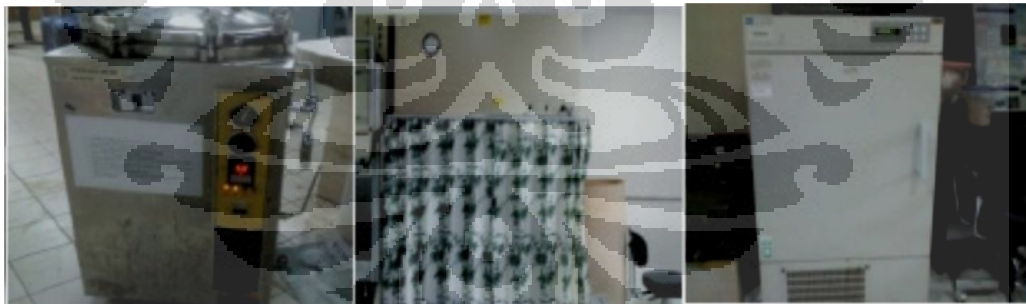
Vortex



Ultra Sentrifuge

Waterbath

*Spektrofotometer UV/VIS
Hitachi 2000*



Autoclave

Laminar flow

Inkubator



Cork borer (diameter 1 cm)