

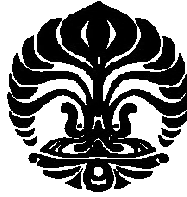
**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PURIFIKASI PARSIAL DAN KARAKTERISASI  
ENDOGLUKANASE DARI *Trichoderma viride* T051 PADA  
FERMENTASI MENGGUNAKAN SUBSTRAT DEDAK PADI**

**SKRIPSI**

**FITRIANA SARI  
0706263132**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**PURIFIKASI PARSIAL DAN KARAKTERISASI  
ENDOGLUKANASE DARI *Trichoderma viride* T051 PADA  
FERMENTASI MENGGUNAKAN SUBSTRAT DEDAK PADI**

**SKRIPSI**

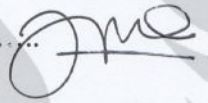
**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

**FITRIANA SARI  
0706263132**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI KIMIA S1 REGULER  
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 : Fitriana Sari  
NPM : 0706263132  
Tanda Tangan :   
Tanggal : 9 Januari 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Fitriana Sari  
NPM : 0706263132  
Program Studi : Kimia S1 Reguler  
Judul Skripsi : **Purifikasi Parsial dan Karakterisasi  
Endoglukanase dari *Trichoderma viride* T051 Pada  
Fermentasi Menggunakan Substrat Dedak Padi**


Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia S1 Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

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

Pembimbing : Dra. Tami Idiyanti M.Sc (  )

Penguji : Drs. Riswiyanto (  )

Penguji : Prof. Sumi Hudiyono PWS (  )

Penguji : Drs. Erzi Rizal Azwar (  )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 9 Januari 2012

## KATA PENGANTAR

Segala puji hanya kepada Allah SWT, pemilik alam semesta yang senantiasa memberikan nikmat dan rahmat yang luas kepada seluruh hamba-Nya. Atas nikmat-Nya yang tak terhitung, penulis masih diberi kesehatan, indahnya berislam serta dapat menyelesaikan tugas akhir ini dengan baik. Sholawat dan salam tak lupa pula terlimpahkan kepada junjungan besar Nabi Muhammad SAW, yang mengeluarkan kita dari zaman kejahiliyahan menuju cahaya keilmuan. Penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam meraih gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Dalam hal ini, penulis pun menyadari banyak bantuan dimulai dari awal perkuliahan hingga penyusunan skripsi ini, yang berasal dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis berterima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Mama dan Papa tercinta atas doa yang tak pernah putus, perhatian, kasih sayang serta dukungan baik moril maupun materil sehingga menjadi semangat bagi penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
2. Ibu Dra. Siswati Setiasih, Apt. M.Si., selaku dosen pembimbing 1, yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk membimbing penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Ibu Dra. Tami Idiyanti, M.Sc., selaku pembimbing 2, yang dengan baik hati memfasilitasi penulis dalam melakukan penelitian di LIPI KIMIA, serta ilmu yang bermanfaat dalam tiap diskusi bersama beliau.
4. Bapak Dr. Riwandi Sihombing Ph.D, selaku pembimbing akademik, yang selalu memberi dukungan moral dan motivasi dalam hal akademis kepada penulis selama perkuliahan ini.
5. Ibu Hani, Ibu Ai, Lisna, Ibu Irni, Ibu Sri Sugiwati, serta seluruh pegawai PUSLIT KIMIA LIPI, Serpong, atas bantuan, masukan serta dukungannya selama penulis melakukan penelitian di Laboratorium Bidang Teknologi Lingkungan, PUSLIT KIMIA TERAPAN, LIPI, Serpong.

6. Pak Nur selaku supir bis BATAN jurusan Mampang-Serpong, serta seluruh pegawai dalam bis tersebut yang sudah penulis anggap sebagai keluarga, yang ramah, menyenangkan dan banyak memberi informasi yang bermanfaat kepada penulis ketika perjalanan menuju Serpong.
7. Kakak-kakak dan adik yang sangat penulis sayangi, khususnya kepada Kak Lia dan suami atas motivasi dan dukungan materinya sehingga meringankan penulis dalam menjalankan tugas akhir ini.
8. Rani, Sherly, Gisha, Iki, Mely, Sabil, Widya sebagai sahabat-sahabat terbaik yang saling mendoakan dan memberi semangat kepada penulis selama perkuliahan ini.
9. Nenci dan Mita sebagai teman seperjuangan bersama di laboratorium BTL, atas *sharing* informasi, dan suka duka yang dilewati bersama dalam penelitian ini.
10. Teman-teman Kimia 2007, atas segala kebersamaannya dalam suka dan duka menjalankan perkuliahan.
11. Mba Sinta dan Mba Ita, atas ilmu, dukungan dan doanya kepada penulis, serta teman-teman halaqoh (Ika A, Evi, Bandu, Izza, Penny, Tiwi, Ika N) atas semangat yang diberikan.
12. Teman-teman Bintang Kecil, Fathanmubina dan BM, atas kebersamaannya dan pemberi semangat serta doa kepada penulis.
13. Seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, atas bantuan dan dukungannya kepada penulis dalam perkuliahan maupun penyusunan tugas akhir ini.

Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2011



A small, square image containing a handwritten signature or set of initials in black ink. The signature is stylized and appears to be written on a light blue or grayish background. The letters are fluid and interconnected, with a prominent horizontal stroke at the bottom.

## ABSTRAK

**Nama** : Fitriana Sari  
**Program Studi** : Kimia  
**Judul** : Purifikasi Parsial dan Karakterisasi Endoglukanase dari *Trichoderma viride* T051 Pada Fermentasi Menggunakan Substrat Dedak Padi

Enzim selulase merupakan enzim hidrolase yang mengkatalisis reaksi pemecahan selulosa menjadi unit glukosa. Enzim ini akan digunakan dalam pemanfaatan limbah pertanian (dedak padi) yang kaya akan selulosa untuk dijadikan senyawa lain seperti bioetanol. Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi dan pemurnian enzim selulase dari mikroorganisme jamur *Trichoderma viride* (T051) melalui fermentasi padat menggunakan dedak padi sebagai substratnya. Pemurnian ekstrak kasar enzim dengan pengendapan bertingkat (fraksinasi) menggunakan garam ammonium sulfat, menghasilkan aktivitas spesifik selulase paling tinggi pada tingkat kejenuhan ammonium sulfat 20 -50% (11,4530 mU/mg) dengan tingkat kemurnian 5,3 kali dari ekstrak kasarnya. Pemurnian lebih lanjut dengan kromatografi kolom penukar anion (DEAE-Streamline) menghasilkan 6 puncak protein dengan aktivitas CMCCase. Puncak protein ke-1 memiliki aktivitas spesifik paling tinggi (85,6703 mU/mg) dengan tingkat kemurnian 39,1 kali dari ekstrak kasarnya. Aktivitas selulolitik enzim ini ditentukan sebagai aktivitas CMCCase (endoglukanase) menggunakan substrat CMC (*carboxymethyl cellulose*). Enzim selulase hasil pemurnian parsial memiliki aktivitas optimum pada pH 5,5 dan suhu inkubasi 50°C dan enzim ini diinhibisi oleh ion-ion  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , dan  $Cu^{2+}$  (konsentrasi ion logam 100 mM) dengan persen inhibisi berturut-turut sebesar 16,4; 64,2; 60,2 %.

Kata Kunci : Selulase, CMCCase (endoglukanase), dedak padi, *Trichoderma viride*, kromatografi penukar anion.

xiii + 61 halaman : 13 gambar, 15 tabel, 11 lampiran

Daftar pustaka : 36 (1975-2011)



## ABSTRACT

**Name** : Fitriana Sari  
**Study Program** : Chemistry  
**Title** : **Partial Purification and Characterization of Endoglucanase from *Trichoderma viride* T051 in Fermentation Using Rice Bran as A Substrate**

Cellulase is a hydrolase enzyme that catalyzes the reaction of the breakdown of cellulose into glucose units. This enzyme will be used in the utilization of agricultural waste (rice bran) that is rich in cellulose to be used as other compounds such as bioethanol. In this study has been carried out isolation and purification of the cellulase from *Trichoderma viride* fungal microorganisms (T051) through solid fermentation using rice bran as a substrate. Purification of crude enzyme extract with multilevel deposition (fractionation) using ammonium sulfate salt, generating the highest specific activity of cellulase (11.4530 mU / mg) at 20 -50% level of saturation of ammonium sulfate, with a purity level of roughly 5.3 times of the extract. Further purification by anion-exchange chromatography column (DEAE-Streamline) produces 6 protein peaks with CMC<sub>ase</sub> activity. Peak-1 protein to have the highest specific activity (85.6703 mU / mg) with a purity level of roughly 39.1 times of the extract. Cellulolytic enzyme activity was determined as CMC<sub>ase</sub> activity (endoglucanase) using the substrate CMC (carboxymethyl cellulose). Partial purification of cellulase enzyme has optimum activity at pH 5.5 and incubation temperature 50°C, and this enzyme had inhibition by ions Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Cu<sup>2+</sup> with inhibition percent respectively at 16.4, 64.2, 60.2%.

Keywords : Cellulase, CMC<sub>ase</sub> (endoglucanase), rice bran, *Trichoderma viride*, anion exchange chromatography.

xiii + 61 pages : 13 figures, 15 tables, 11 attachments

Bibliography : 36 (1975-2011)

## DAFTAR ISI

	<b>HALAMAN</b>
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR .....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	3
1.3. Hipotesis .....	3
1.4. Pembatasan Masalah .....	3
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Enzim .....	4
2.1.1 Karakterisasi Enzim .....	4
2.1.2 Isolasi dan Fraksinasi Enzim .....	5
2.1.2.1 Fraksinasi dengan Metode Pengendapan .....	6
2.1.2.2 Pemekatan .....	7
2.1.2.3 Kromatografi Kolom Penukar Ion .....	8
2.1.3 Enzim Selulase .....	11
2.2 Dedak Padi .....	13
2.2.1 Kandungan Dedak Padi .....	14
2.2.2 Selulosa .....	16
2.3 Jamur <i>Trichoderma viride</i> .....	18
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	20
3.2 Peralatan .....	20
3.3 Bahan .....	20
3.3.1 Mikroorganisme .....	20
3.3.2 Substrat Fermentasi .....	20
3.3.4 Bahan Kimia .....	21
3.4 Prosedur Kerja .....	21
3.4.1 Preparasi Enzim Selulase dari <i>Trichoderma viride</i> .....	21
3.4.1.1 Persiapan Inokulum <i>Trichoderma viride</i> .....	22
3.4.1.2 Pembuatan Starter (Media Aktivasi) .....	22
3.4.1.3 Produksi Enzim Selulase .....	22
3.4.1.4 Ekstraksi Enzim Selulase .....	22

3.4.2 Pemurnian Enzim .....	23
3.4.2.1 Fraksinasi Enzim dengan Ammonium Sulfat .....	23
3.4.2.2 Pemekatan .....	23
3.4.2.3 Dialisis .....	24
3.4.2.4 Kromatografi Kolom Penukar Ion .....	24
3.4.3 Karakterisasi Enzim .....	25
3.4.3.1 Penentuan pH optimum .....	25
3.4.3.2 Penentuan Suhu optimum .....	25
3.4.3.3 Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim ....	26
3.4.4 Uji Aktivitas Enzim ( <i>Enzyme Assay</i> ) .....	26
3.4.5 Penentuan Konsentrasi Glukosa (Metode Somogyi-Nelson)	27
3.4.6 Penentuan Konsentrasi Protein (Metode Lowry) .....	27
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Preparasi Enzim Selulase dari <i>Trichoderma viride</i> .....	29
4.2 Pemurnian Enzim Selulase .....	31
4.2.1 Fraksinasi Enzim dengan Ammonium Sulfat .....	31
4.2.2 Kromatografi Kolom Penukar Ion .....	33
4.3 Karakterisasi Enzim .....	37
4.3.1 Penentuan pH optimum .....	37
4.3.2 Penentuan Suhu optimum .....	39
4.3.3 Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim .....	40
<b>BAB 5 PENUTUP</b>	
5.1 Kesimpulan .....	43
5.2 Saran .....	44
DAFTAR REFERENSI .....	45
LAMPIRAN .....	48

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Proses Dialisis .....	8
Gambar 2.2 Ilustrasi Mekanisme Kromatografi Penukar Ion .....	10
Gambar 2.3 Mekanisme Reaksi Katalisis Enzim Selulase .....	12
Gambar 2.4 Struktur Selulosa .....	16
Gambar 2.5 Daerah Kristalin dan Amorf pada Selulosa .....	16
Gambar 2.6 Kompleks Lignoselulosa .....	17
Gambar 4.1 <i>Trichoderma viride</i> (T051) .....	29
Gambar 4.2 Fermentasi Padat Jamur T051 pada Media Dedak padi .....	30
Gambar 4.3 Struktur CMC ( <i>Carboxymethyl Cellulose</i> ) .....	31
Gambar 4.4 Profil Elusi Kromatografi Kolom Penukar Anion .....	34
Gambar 4.5 Grafik Aktivitas CMCase terhadap Variasi pH .....	38
Gambar 4.6 Grafik Aktivitas CMCase terhadap Variasi Suhu .....	39
Gambar 4.7 Grafik Pengaruh Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim .....	41

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Resin penukar ion .....	9
Tabel 2.2 Data kandungan dedak padi .....	15
Tabel 3.1 Komposisi substrat dan filtrat enzim untuk uji aktivitas .....	26
Tabel 4.1 Ringkasan tahap pemurnian enzim .....	37
Tabel L.1 Komposisi Larutan A dan B dalam pembuatan buffer asetat .....	52
Tabel L.2 Komposisi Larutan A dan B dalam pembuatan buffer fosfat .....	52
Tabel L.3 Komposisi x mL Larutan B dalam pembuatan buffer Tris-HCl .....	53
Tabel L.4 Data Kandungan Dedak Padi (per 100 gram) .....	54
Tabel L.5 Konsentrasi Standar Glukosa .....	55
Tabel L.6 Konsentrasi Standar Protein BSA .....	56
Tabel L.7 Aktivitas CMCCase (mU/mL) dalam variasi pH buffer .....	57
Tabel L.8 Aktivitas CMCCase (mU/mL) dalam variasi suhu .....	57
Tabel L.9 Aktivitas CMCCase (mU/mL) terhadap pengaruh ion logam .....	57
Tabel L.10 Glukosa dari Uji Aktivitas CMCCase pada Tahap Pemurnian .....	58
Tabel L.11 Glukosa dari Uji Aktivitas CMCCase pada Karakterisasi Enzim .....	59

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan Alur Kerja Penelitian .....	48
Lampiran 2. Bagan Preparasi Enzim .....	49
Lampiran 3. Bagan Fraksinasi Enzim Menggunakan Ammonium Sulfat .....	51
Lampiran 4. Pembuatan Buffer .....	52
Lampiran 5. Data Kandungan Dedak Padi .....	54
Lampiran 6. Data Standar Glukosa (Somogyi-Nelson) .....	55
Lampiran 7. Data Standar Protein (Lowry) .....	56
Lampiran 8. Data Aktivitas CMCase pada Karakterisasi Enzim .....	57
Lampiran 9. Data Glukosa dari Uji Aktivitas CMCase .....	58
Lampiran 10. Gambar Larutan Fraksi .....	60
Lampiran 11. Gambar Peralatan .....	61

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim selulase merupakan kelompok enzim hidrolase yang mengkatalisis reaksi pemecahan selulosa menjadi unit glukosa. Enzim ini banyak memiliki manfaat, baik dalam industri komersial maupun dalam mengoptimalkan pemanfaatan limbah pertanian yang mengandung selulosa seperti dedak padi. Dalam hal pemanfaatan limbah, selulase mampu mendegradasi limbah-limbah pertanian maupun perkebunan yang mengandung selulosa untuk dihasilkan menjadi monomernya yakni glukosa. Glukosa yang dihasilkannya dapat diproses lebih lanjut menjadi produk lain yang bermanfaat seperti bioetanol.

Di Indonesia, sekarang ini sudah mulai dikembangkan pemanfaatan limbah pertanian dan perkebunan dalam memproduksi bioetanol menggunakan teknologi fermentasi. Perkembangan bioetanol dengan teknologi fermentasi ini tidak lepas dari adanya peran mikroorganisme yang menjadi sumber dihasilkannya enzim selulase sebagai pemecah selulosa.

Enzim ini dapat diisolasi dari mikroorganisme, seperti bakteri atau fungi. Bakteri yang telah dilaporkan mampu memproduksi enzim selulase diantaranya seperti *Cellulomonas CSI-17* (Purwadaria, 1999), *Bacillus thermoalcaliphilus* (Sarkar, 1992), *Lactobacillus collinoides* (Monica, 2007), dan *Streptomyces ruber* (El-Sersy, *et al*, 2010). Sedangkan dari golongan jamur (fungi) diantaranya *Trichoderma viride* (Okada, 1975; Tae Lin Huh dan See Young Lee, 1981), *Trichoderma reesei* (Mardiah, 1995), dan *Aspergillus niger* (Hurst *et al*, 1977; Milala, *et al*, 2005).

Selulase merupakan kompleks enzim yang tersusun dari 3 komponen berdasarkan mekanisme sinergis pemutusan ikatan  $\beta$ -1,4 glikosida, yaitu: Endo- $\beta$ -1,4-glukanase (EC 3.2.1.4), Ekso- $\beta$ -1,4-glukanase atau selobiohidrolase (EC 3.2.91) dan  $\beta$ -1,4-glukosidase atau selobiase (EC 3.2.1.21) (Purwadaria, 1999). Endo- $\beta$ -1,4-glukanase (CMCase atau *carboxymethylcellulase*) bekerja

menghidrolisis secara acak struktur selulosa menghasilkan rantai polisakarida selulosa, ataupun selobiosa, dan enzim ini aktif menghidrolisis bagian selulosa yang amorf atau derivat selulosa seperti CMC (*carboxymethyl cellulose*) sehingga sering disebut enzim CMCase (Sami, 1989). Ekso- $\beta$ -1,4-glukanase (*avicelase* atau *cellobiohydrolase*) menghidrolisis dari ujung rantai polisakarida atau pada bagian selulosa kristalin seperti *Avicel* (*cellulose micro-crystalline*), menghasilkan tetrasakarida atau disakarida (selobiosa). Sedangkan, selobiose atau  $\beta$ -1,4-glukosidase menghidrolisis selobiosa (disakarida) produk eksoglukanase maupun endoglukanase menjadi monomer glukosa.

Dalam upaya menghasilkan selulase dengan aktivitas optimal yang akan dimanfaatkan untuk menghasilkan produk lain seperti bioetanol, diperlukan pengetahuan akan karakteristik dari selulase itu sendiri dari kondisi optimum selulase, baik dari faktor pH, suhu, substrat, pengaruh ion logam, maupun faktor lain yang mempengaruhi aktivitas selulase.

Pada penelitian ini, dilakukan karakterisasi enzim selulase yang bersumber dari mikroorganisme jamur *Trichoderma viride* (T051), dengan memanfaatkan limbah dedak padi sebagai sumber selulosa dalam proses fermentasi padat. Untuk memperoleh data karakteristik selulase dari jamur ini, perlu dilakukan isolasi yang diikuti dengan proses pemurnian atau purifikasi pada ekstrak kasar selulase hasil fermentasi, sehingga diharapkan dapat diperoleh selulase yang relatif lebih murni. Tahap awal proses pemurnian ekstrak enzim kasar dilakukan pengendapan bertingkat atau fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat dengan kejenuhan bertahap yakni 0-20%, 20-50%, 50-70%. Semua hasil fraksi yang diperoleh diuji aktivitas selulasenya serta ditentukan kadar proteinnya. Dari fraksi ammonium sulfat yang diperoleh dengan aktivitas spesifik selulase tertinggi, selanjutnya dilakukan dialisis, dan pemekatan larutan enzim. Larutan enzim hasil fraksinasi ini, dimurnikan kembali dengan kromatografi kolom penukar ion. Enzim selulase hasil pemurnian parsial ini selanjutnya dikarakterisasi dengan melihat kondisi optimum aktivitas selulase terhadap variasi pH, suhu, dan pengaruhnya terhadap ion logam.

Dari hasil penelitian ini diharapkan enzim selulase yang diisolasi dari sel jamur *Trichoderma viride* (T051) strain asli Indonesia dapat dimanfaatkan lebih



lanjut baik untuk industri seperti produksi bioetanol maupun untuk pengembangan ilmu pengetahuan lebih lanjut.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh enzim selulase yang relatif lebih murni dari isolasi yang diikuti dengan proses pemurnian atau purifikasi pada ekstrak kasar selulase hasil fermentasi, dan memperoleh data karakteristik aktivitas selulase berdasarkan pengaruh pH dan suhu yang divariasikan serta pengaruh ion logam.

## 1.3 Hipotesis

- a. Pengendapan bertingkat menggunakan garam ammonium sulfat terhadap ekstrak kasar selulase yang dilanjutkan dengan dialisis dan fraksinasi menggunakan kromatografi kolom penukar ion, dapat menghasilkan peningkatan kemurnian yang signifikan.
- b. Selulase yang diperoleh dari fraksinasi atau pemurnian enzim dapat menggambarkan profil kondisi optimum aktivitas selulase yang lebih baik.

## 1.4 Pembatasan Masalah

Pada penelitian ini, penulis membatasi permasalahan ke dalam ruang lingkup, sebagai berikut :

- a. Penelitian hanya difokuskan pada produksi enzim selulase dari hasil fermentasi padat *Trichoderma viride* (T051) menggunakan substrat dedak padi
- b. Seluruh tahapan prosedur, baik dari tahap ekstrak kasar enzim hasil fermentasi maupun hasil pemurnian, diuji aktivitas selulase sebagai aktivitas CMCase atau endoglukanase, menggunakan substrat CMC (*carboxymethyl cellulose*).

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Enzim**

Enzim adalah biokatalisator dan unit fungsional dalam proses metabolisme sel. Enzim memiliki tenaga katalitik yang luar biasa, yang biasanya jauh lebih besar dari katalisator sintetik (Lehninger, 1982). Enzim mengkatalisis ratusan reaksi kimia dalam tubuh organisme secara bertahap seperti penguraian molekul nutrien, perubahan energi kimiawi, ataupun pembuatan makromolekul sel dari prekursor yang sederhana. Kerja suatu enzim adalah spesifik dan spesifitasnya dapat terhadap suatu gugus tertentu maupun secara absolut (Hudiyono, 1998).

Enzim disebut biokatalisator karena umumnya berperan dalam reaksi-reaksi kimiawi pada agen biologi. Enzim merupakan protein yang terdiri dari rantai polipeptida dan mengandung residu asam amino sehingga aktivitas katalitiknya bergantung pada integritas strukturnya sebagai protein. Namun, terdapat pula enzim yang membutuhkan molekul lain untuk bergabung dengan protein enzim, seperti kofaktor berupa senyawa anorganik (seperti ion  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ), atau senyawa organik yang disebut sebagai koenzim membentuk suatu enzim aktif yang disebut holoenzim. Jika kofaktor terikat sangat kuat dengan enzim maka disebut sebagai gugusan prostetik.

##### **2.1.1 Karakteristik Enzim**

Karakteristik suatu enzim dapat terlihat dari aktivitasnya yang dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain : konsentrasi substrat, suhu, pH, waktu inkubasi, aktivator maupun inhibitor.

Konsentrasi substrat dapat mempengaruhi kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Pada konsentrasi substrat yang sangat rendah, kecepatan reaksi pun akan rendah, karena aktivitas katalitik enzim terhadap substrat juga rendah. Sedangkan, pada konsentrasi substrat yang tinggi dapat meningkatkan pula kecepatan reaksi dan aktivitas enzim, sampai mencapai suatu titik batas kecepatan maksimum yang disebut juga  $V_{max}$ , karena

enzim menjadi jenuh oleh substratnya, dan tidak dapat berfungsi lebih cepat (Lehninger, 1982).

Suhu dapat pula mempengaruhi kondisi aktivitas enzim dalam mengkatalisis reaksi dengan substrat. Oleh karena sifatnya sebagai protein, umumnya enzim akan terdenaturasi pada suhu tinggi, sehingga menurunkan aktivitas enzim tersebut. Namun, setiap enzim memiliki suhu optimum yang bekerja secara optimal terhadap substrat, dimana ketika mencapai titik optimum tersebut aktivitas enzim meningkat pada kondisi tertinggi atau maksimal.

Selain itu, pH juga menjadi faktor penting dalam mempengaruhi aktivitas enzim. Pada pH terlalu asam atau terlalu basa, umumnya dapat menyebabkan struktur tiga dimensi enzim terganggu akibat denaturasi. Oleh karena itu, enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas enzim maksimal.

Faktor lingkungan lain yang mempengaruhi aktivitas enzim seperti adanya penambahan ion logam, dapat menjadi inhibitor ataupun aktivator dalam proses katalitik yang dilakukan enzim. Dikatakan inhibitor karena menghambat jalannya reaksi katalitik enzim sehingga aktivitas yang terukur menjadi menurun. Sedangkan aktivator dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzim yang mengakibatkan aktivitasnya meningkat.

### **2.1.2 Isolasi dan Fraksinasi Enzim**

Enzim yang terkandung dalam tubuh suatu organisme atau mikroorganisme, dapat ditemukan dalam sel (intraseluler) ataupun luar sel (ekstraseluler). Enzim ekstraseluler dapat mengubah nutrisi disekitarnya sehingga nutrisi tersebut masuk ke dalam sel, sedangkan enzim intraseluler mensintesis bahan seluler atau menguraikan nutrisi untuk menyediakan energi yang dibutuhkan sel (Monica, 2007). Dalam mengisolasi enzim diperlukan informasi terkait keberadaan enzim tersebut dalam tubuh organisme atau mikroorganisme.

Isolasi enzim yang bersifat intraseluler umumnya selalu disertai oleh ikut terekstraknya asam nukleat, beberapa protein lain, karbohidrat, dan

lemak dari dalam sel. Oleh karena itu, proses pemisahannya harus mempertimbangkan metoda pemecahan sel untuk mengeluarkan enzim sehingga perlu penanganan yang lebih hati-hati. Sedangkan, enzim ekstraseluler relatif mudah untuk dipisahkan karena tidak memerlukan proses pemecahan sel terlebih dahulu.

Umumnya, tahapan isolasi dan fraksinasi enzim adalah ekstraksi, sentrifugasi, fraksinasi dengan cara pengendapan, pemekatan dan pemurnian berlanjut seperti kromatografi. Dalam ekstraksi enzim perlu diperhatikan sumber enzimnya, jika enzim berasal dari mikroorganisme maka diperlukan proses fermentasi terlebih dahulu sehingga dapat diperoleh ekstrak enzim yang diinginkan.

#### **2.1.2.1 Fraksinasi Enzim dengan Metode Pengendapan**

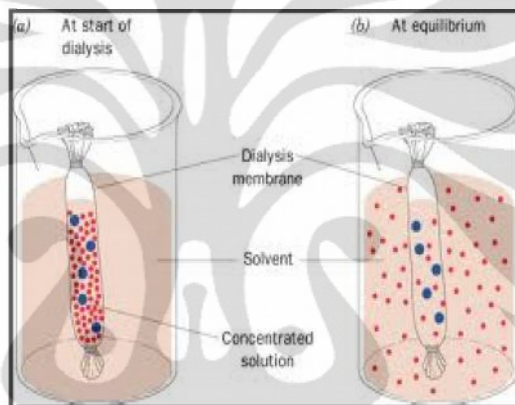
Fraksinasi enzim dengan metode pengendapan berguna untuk memisahkan protein dalam ekstrak kasar enzim dari komponen non-protein. Cara pengendapan enzim dapat dilakukan dengan dua metode kimiawi yaitu dengan pelarut organik dan garam. Penambahan pelarut organik ke dalam larutan protein akan menurunkan konstanta dielektrik dan menyebabkan medium kurang cocok bagi permukaan enzim yang polar sehingga mudah terjadi pengendapan (Thenawijaya, 1989). Namun, hal yang perlu diperhatikan adalah pelarut organik cenderung mendenaturasi protein pada suhu agak tinggi, umumnya bersifat toksik dan dapat memungkinkan terjadinya proses inaktivasi pada enzim.

Metode kedua adalah dengan penambahan garam. Ion garam yang ditambahkan dapat mempengaruhi kelarutan protein. Pada konsentrasi garam rendah, ion-ion garam akan melingkungi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul protein sehingga protein melarut, dan peristiwa ini disebut juga dengan *salting-in*. Pada konsentrasi garam tinggi (jenuh), terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein, dimana garam akan menarik air dari koloid protein. Interaksi hidrofobik antara protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein dalam air dan menyebabkan terjadinya pengendapan sehingga komponen protein dan zat terlarut lainnya dapat dipisahkan. Peristiwa ini disebut juga dengan *salting-out*. Garam yang umum

digunakan dalam fraksinasi enzim adalah garam ammonium sulfat karena memiliki keuntungan seperti harga yang relatif murah, tidak bersifat toksik, solubilitasnya tinggi, dan cenderung tidak mempengaruhi struktur protein.

Pada proses fraksinasi enzim menggunakan garam, dimungkinkan masih terdapat sisa-sisa garam yang tertinggal dalam larutan enzim, sehingga diperlukan tahapan selanjutnya untuk menghilangkan sisa garam tersebut, seperti dengan melakukan dialisis.

**Dialisis** adalah pergerakan molekul dalam proses difusi dari konsentrasi tinggi menuju konsentrasi rendah melalui membran *semi-permeable*. Proses dialisis diperlihatkan pada **Gambar 2.1**.



**Gambar 2.1 Proses Dialisis**

[Sumber : <http://ehumanbiofield.wikispaces.com>]

Ion-ion garam yang memiliki ukuran molekul lebih kecil dibanding protein akan mudah lolos melalui pori-pori membran *semi-permeable* yang berukuran pori lebih kecil dari molekul protein sehingga protein akan tertahan di dalam membran.

### 2.1.2.2 Pemekatan

Pemekatan enzim termasuk dalam rangkaian fraksinasi protein enzim yang berguna untuk mengurangi air yang terkandung dalam protein terlarut sehingga diperoleh konsentrat protein. Hal itu dapat bermanfaat dalam penyimpanan produk enzim yang diperoleh karena protein enzim dalam konsentrat cenderung lebih stabil pada penyimpanan yang lama. Protein enzim yang encer atau kandungan airnya tinggi dapat menurunkan aktivitas enzim dalam penyimpanan enzim yang lama. Selain itu, tahap pemekatan ini juga perlu dilakukan terlebih dahulu jika ingin melakukan proses pemurnian selanjutnya

**Universitas Indonesia**

seperti kromatografi. Hal itu berguna agar protein tetap dapat terdeteksi walaupun telah melalui tahapan kromatografi yang menggunakan banyak volume pelarut sebagai eluen.

Pemekatan enzim dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu ultrafiltrasi, dan pengeringanbeku atau liofilisasi. Ultrafiltrasi merupakan proses pemekatan dengan prinsip pemisahan berdasarkan ukuran molekul, yang dilewatkan pada membran dengan ukuran pori tertentu di bawah pengaruh tekanan tinggi atau gaya sentrifugal. Membran ditentukan berdasarkan spesifikasi molekul, berat molekul (*molecular weight cut-off*).

Sedangkan, teknik liofilisasi atau pengeringanbeku (*freeze-drying*) adalah teknik pemekatan enzim dengan prinsip menghilangkan pelarut dari sampel protein beku (*frozen sample*) dalam proses sublimasi. Teknik liofilisasi ini adalah salah satu teknik yang paling efektif untuk memekatkan material yang sensitif akan suhu tinggi seperti protein. Dalam hal ini, molekul yang mudah menguap (*volatile*) seperti pelarut air akan tersublimasi dibawah kondisi suhu -40°C (*frozen*), sedangkan molekul yang *non-volatile* (seperti protein, buffer garam, asam nukleat, dan lain-lain) akan terpekatkan (Boyer, 1993). Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam teknik liofilisasi ini yaitu pelarut yang terkandung dalam sampel bukan merupakan pelarut organik karena pelarut organik memiliki titik lebur (*melting point*) yang rendah dibanding pelarut air sehingga akan meningkatkan peleburan sampel protein dan menjadi terdenaturasi selama proses liofilisasi.

### 2.1.2.3 Kromatografi Penukar Ion

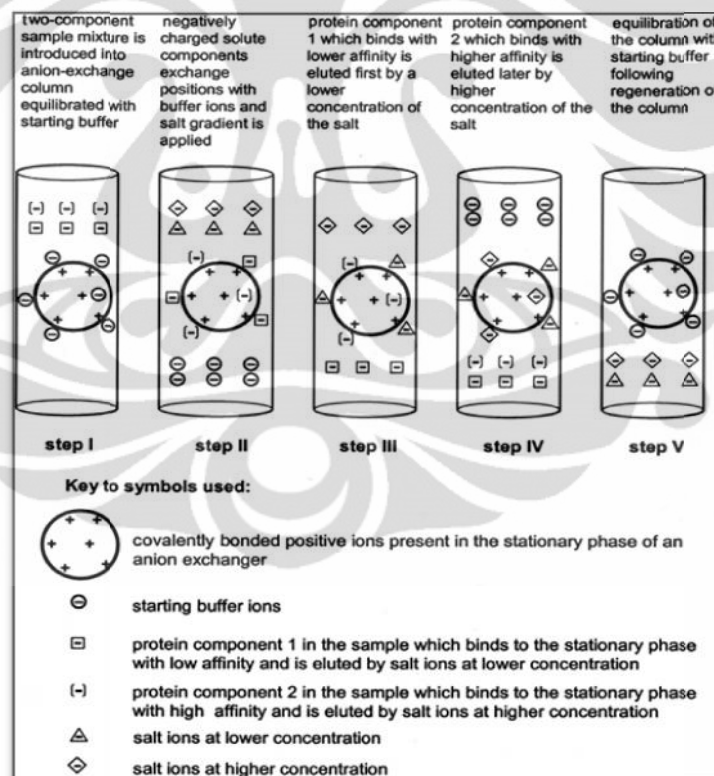
Kromatografi kolom termasuk dalam teknik fraksinasi protein yang didasarkan pada adsorpsi fasa gerak terhadap fasa diam. Adsorpsi tersebut didasari pada afinitas sampel dalam fasa gerak terhadap fasa diamnya. Terdapat beberapa teknik kromatografi kolom yang umum diaplikasikan dalam fraksinasi protein diantaranya kromatografi penukar ion, filtrasi gel, afinitas ion logam, interaksi hidrofobik dan kromatofocusing.

Dalam hal ini, kromatografi penukar ion didasarkan pada perbedaan afinitas molekul bermuatan di dalam larutan fasa gerak dengan molekul bermuatan pada fasa diam. Fasa diam yang merupakan resin penukar ion ini

Jenis	Gugus Fungsional	Matriks
Penukar Anion		
<b>DEAE-cellulose</b>	Dietilaminoetil (DEAE)	Selulosa
<b>DEAE-Sephadex</b>	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$ $ \text{N}^+\text{-H}$ $ \text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	Dekstran
<b>DEAE-Sepharose</b>	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$	Agarose
<b>QAE-Sephadex</b>	Dietil-(2-hidroksi-propil) aminoetil	Dekstran
Penukar kation		
<b>CM-cellulose</b>	<i>Carboxymethyl</i> (CM) $-\text{O-CH}_2\text{-COO}^-$	Selulosa
<b>SP-Sephadex</b>	<i>Sulfopropyl</i> (SP) $-\text{O-SO}_3^-$	Dekstran

melemahkan ikatan ionik antara protein yang berikatan dengan matriks sehingga protein tersebut akan terelusi kemudian.

Tahapan mekanisme yang terjadi pada kromatografi penukar anion diilustrasikan pada **Gambar 2.2**. Pada tahap pertama, larutan sampel yang mengandung campuran muatan, baik positif maupun negatif, dimasukkan ke dalam kolom matriks penukar anion yang bermuatan positif dan telah terikat lemah oleh ion buffer. Kemudian, ion buffer dalam matriks akan bertukar oleh protein yang bermuatan negatif sehingga ion buffer bersama protein yang bermuatan positif akan terelusi keluar kolom. Ketika dilakukan elusi *stepwise*, protein yang berikatan lemah dengan matriks selanjutnya akan terlepas dan digantikan oleh ion garam dalam konsentrasi rendah. Sedangkan, protein yang berikatan lebih kuat akan digantikan selanjutnya oleh ion garam yang konsentrasinya tinggi.



**Gambar 2.2** Ilustrasi mekanisme kromatografi penukar ion

[Sumber : Malik, 2008]

Penambahan ion garam secara bertahap (*stepwise*) dapat meningkatkan kekuatan ion terhadap matriks sehingga dapat mengelusi molekul protein secara bertahap berdasarkan kekuatan interaksi dengan matriks. Oleh karena itu, akan



terjadi pemisahan protein dalam waktu elusi yang berbeda berdasarkan afinitas muatannya. Umumnya, jika ingin memperoleh protein yang lebih murni dan lebih spesifik, hasil fraksi kolom penukar ion dengan aktivitas spesifik tertinggi ini dapat dilanjutkan kembali tahapan pemurniannya dengan metode kromatografi kolom filtrasi gel yang didasarkan pada perbedaan berat molekul.

### 2.1.3 Enzim Selulase

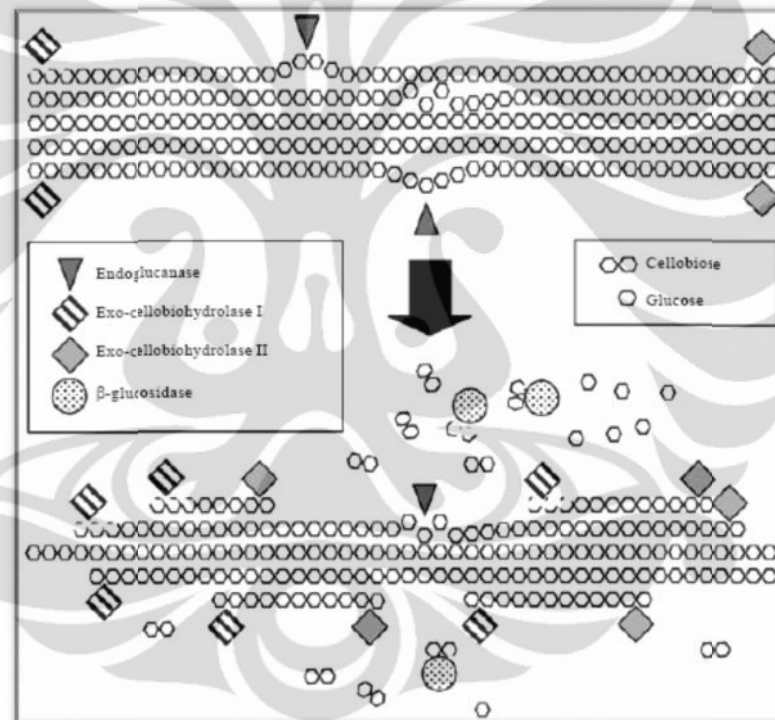
Selulase (EC 3.2.1.4) adalah enzim ekstraseluler yang umumnya diproduksi oleh mikroorganisme seperti bakteri, jamur (fungi), dan protozoa. Bakteri yang telah dipublikasikan sebagai penghasil enzim selulase antara lain seperti *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Acetobibrio*, *Mikrobispora* dan *Streptomyces*. Sedangkan dari golongan jamur antara lain *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* dan *Penicillium*. Selulase tidak dimiliki oleh manusia, karena itu manusia tidak dapat menguraikan selulosa dalam sayuran yang dimakan. Tetapi hal ini dapat dilakukan oleh beberapa hewan seperti kambing, sapi, dan insekta seperti rayap karena dalam sistem pencernaannya mengandung mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim selulase untuk menghidrolisis ikatan glikosida  $\beta$ -1,4 pada selulosa.

Enzim ini termasuk ke dalam kelompok enzim hidrolase karena kemampuannya mengkatalisis reaksi hidrolisis selulosa. Terdapat 3 kompleks besar dalam sistem enzim ekstraselular ini yang bekerja mengkatalisis substrat dalam reaksi pemutusan ikatan  $\beta$ -1,4 glikosida, yaitu: Endo- $\beta$ -1,4-glukanase (EC 3.2.1.4), Ekso- $\beta$ -1,4-glukanase atau selobiohidrolase (EC 3.2.91) dan  $\beta$ -1,4-glukosidase atau selobiase (EC 3.2.1.21) (Purwadaria, 1999).

Endo- $\beta$ -1,4-glukanase (CMCase atau *carboxymethylcellulase*) bekerja menghidrolisis secara acak struktur selulosa menghasilkan rantai polisakarida selulosa, ataupun selobiosa, dan enzim ini aktif menghidrolisis daerah selulosa yang amorf atau derivat selulosa seperti CMC (*carboxymethyl cellulose*) sehingga sering disebut enzim CMCase (Sami, 1989). CMC merupakan model substrat selulosa amorf atau selulosa dapat larut.

Ekso- $\beta$ -1,4-glukanase (*avicelase* atau *cellobiohydrolase*) menghidrolisis dari ujung rantai polisakarida atau pada daerah selulosa kristalin menghasilkan tetrasakarida atau disakarida (selobiosa). Eksoglukanase atau eksoselulase aktif menghidrolisis selulosa kristalin seperti model substrat *Avicel* (*cellulose micro-crystalline*), sehingga disebut pula sebagai enzim *avicelase* (Wulani, 2007).

Sedangkan, selobiose atau  $\beta$ -1,4-glukosidase menghidrolisis selobiosa (disakarida) produk eksoglukanase maupun endoglukanase menjadi monomer glukosa. Ketiga proses tersebut diperlihatkan pada **Gambar 2.3**.



**Gambar 2.3 Ilustrasi mekanisme katalisis enzim selulase**

[Sumber : Malherb dan Cloete, 2003]

Kemampuan adsorpsi enzim selulase terhadap substrat selulosa bergantung pada jumlah keberadaan enzim, permukaan selulosa, sifat fisik enzim (seperti ukuran, muatan, dan kelarutan), kondisi lingkungan (seperti pH, suhu), serta keberadaan molekul lain seperti lignin (Sami, 1989). Lignin dapat mengganggu proses hidrolisis selulase terhadap selulosa. Oleh karena itu, umumnya pada substrat selulosa yang mengandung kandungan lignin tinggi perlu dilakukan delignifikasi terlebih dahulu seperti dengan

penambahan senyawa kimia yang dapat memecah lignin. Sumber tanaman yang kandungan ligninnya tinggi biasa ditemukan pada bagian keras dalam limbah pertanian atau perkebunan seperti jerami atau pelepah batang.

Selulase banyak memiliki manfaat seperti dalam industri komersial misalnya industri tekstil yang berguna untuk mencegah serat kain berbulu, dan meningkatkan kehalusan serat kain. Selain itu, sekarang ini selulase juga sudah banyak dimanfaatkan dalam teknologi fermentasi dalam media aplikatif yang mengandung selulosa, karena kemampuannya memecah selulosa menjadi unit glukosa, dan dari produk glukosa yang diperoleh dapat diproses lebih lanjut untuk menghasilkan produk bioetanol. Produk bioetanol ini sangat bermanfaat di era sekarang sebagai energi terbarukan yang ramah lingkungan, guna memenuhi kebutuhan energi masyarakat.

## 2.2 Dedak Padi

Padi merupakan makanan pokok penduduk di Asia dan beberapa negara di Afrika dan Amerika. Padi mudah tumbuh di daerah yang memiliki cukup air dan suhu yang cukup hangat. Negara produsen padi terkemuka berdasarkan data FAO (*Food and Agriculture Organization*) tahun 2009 adalah Republik Rakyat Cina (31% dari total produksi dunia), India (20%), dan Indonesia (9%).

Untuk menghasilkan beras yang akan dikonsumsi, proses pengolahan padi dilakukan dengan memisahkan bulir padi atau gabah dari jerami padi ketika panen. Pemisahan dilakukan dengan memukulkan seikat padi sehingga gabah terlepas atau dengan bantuan mesin pemisah gabah. Gabah yang terlepas lalu dikumpulkan dan dijemur. Penjemuran biasanya memerlukan waktu tiga sampai tujuh hari, tergantung kecerahan penyinaran matahari. Gabah yang telah kering disimpan atau langsung digiling, sehingga beras terpisah dari sekam (kulit gabah). Beras merupakan bentuk olahan yang dijual pada tingkat konsumen. Hasil sampingan yang diperoleh dari pemisahan ini adalah: sekam (atau merang), dan dedak atau bekatul yang merupakan serbuk kulit ari beras. Banyaknya dedak padi dan komponen lain yang dihasilkan tergantung pada cara penggilingan, namun umumnya dapat dihasilkan 10% dedak padi dari total produk hasil penggilingan (Estika, 2011).

Produksi padi di Indonesia berdasarkan data Badan Pusat Statistik Indonesia, tahun 2009 sebesar 64,4 juta ton Gabah Kering Giling (GKG). Dari data tersebut, jika diasumsikan produksi padi di Indonesia konstan hingga tahun 2010, maka dapat dihasilkan sekitar 6,4 juta ton dedak padi yang tidak hanya dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak saja namun dapat pula dimanfaatkan dalam produk lain.

Dedak tidak hanya dapat diperoleh dari proses penggilingan padi, namun juga dapat dihasilkan dari proses penggilingan hasil sampingan tanaman berbijih lain seperti gandum, dan jagung sehingga dinamakan dedak gandum (atau *pollard*) dan dedak jagung.

### 2.2.1 Kandungan dan Manfaat Dedak Padi

Dedak padi merupakan bagian kulit ari sebagai hasil samping dari proses pemisahan beras dengan sekam (kulit gabah) pada gabah yang telah dikeringkan. Walaupun dedak padi dikategorikan sebagai limbah hasil penggilingan, dedak padi termasuk komponen limbah yang berharga dibanding komponen lainnya. Hal itu karena kandungan pangan yang tinggi pada dedak padi dan umumnya bermanfaat sebagai pakan ternak sehingga hal itu pula yang menyebabkan umumnya harga jual dedak padi di pasaran tinggi. Data kandungan dedak padi diperlihatkan pada **Tabel 2.2** serta lebih lengkapnya pada Lampiran 5.

**Tabel 2.2 Data Kandungan Dedak Padi**

Nutrien	Unit	Nilai
<b>Umum (dalam 100 gram dedak padi)<sup>1</sup></b>		
Air	g	6.13
Energi	kcal	316
Protein	g	13.35
Total Lipid	g	20.85
Karbohidrat	g	49.69
Abu	g	9.98
<b>Kandungan Lignoselulosa (dalam 0,5 gram sampel dedak padi)<sup>2</sup></b>		
Selulosa	%	9
Lignin	%	3
Hemiselulosa	%	12

[Sumber : <sup>1</sup>National Agriculture Library, USDA, 2010; <sup>2</sup>Purwani, *et al*, 1997]

Berdasarkan data tersebut, dapat terlihat bahwa dedak kaya akan nutrisi sehingga tidak hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak, namun

dapat pula berpotensi bagi kebutuhan lainnya. Dalam hal ini, jika dilihat dari komposisi kandungan minyaknya (sekitar 20%), dedak ini dapat diolah menjadi minyak dedak padi (*rice bran oil*) dengan nutrisi vitamin dan mineral yang baik sehingga bermanfaat bagi kesehatan, misalnya sebagai antioksidan. Kandungan asam aminonya yang tinggi juga membuat dedak padi bermanfaat dalam menghasilkan produk kosmetik, yang diketahui mampu memberikan efek perlindungan pada kulit (Estika, 2011).

Selain itu, sekarang ini dedak padi juga mulai dimanfaatkan dalam menghasilkan energi terbarukan seperti bioetanol. Dedak dimanfaatkan sebagai sumber substrat selulosa dalam media fermentasi untuk memproduksi enzim selulase dari mikroorganisme. Selulosa yang berasal dari limbah pertanian dan perkebunan, terkandung dalam kompleks lignoselulosa dan komposisi masing-masing komponen lignoselulosa tersebut bergantung pada sumber tanamannya.

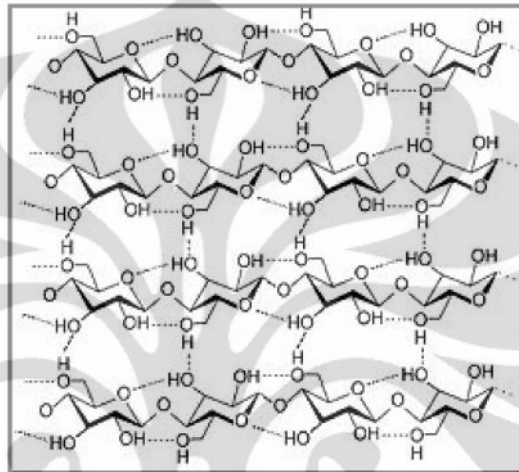
Kandungan lignoselulosa dari dedak padi (seperti terlihat pada **Tabel 2.2**), memperlihatkan bahwa kandungan lignin dari dedak padi cukup rendah sehingga umumnya pada penelitian yang menggunakan media fermentasi dedak lebih mudah penanganannya karena tidak memerlukan *pretreatment* terlebih dahulu. Selain itu, keuntungan penggunaan media fermentasi dedak dalam produksi selulase dari mikroorganisme adalah kandungan nutrisi seperti karbohidrat, protein, dan mineral yang tinggi dari dedak padi menjadi potensi yang sangat baik dalam pertumbuhan mikroorganisme seperti jamur dalam media fermentasinya.

Perlu diketahui, bioetanol merupakan salah satu bahan bakar alternatif pencampur premium. Selain dapat menghemat penggunaan bahan bakar, bioetanol juga dapat mengurangi pencemaran udara. Bahan baku bioetanol ini, dapat berupa biomassa yang mengandung gula, pati atau selulosa (Rosita, 2008).

### 2.2.2 Selulosa

Selulosa merupakan homopolisakarida dari monomer D-glukosa dalam suatu ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida, yang membentuk rantai linear dalam

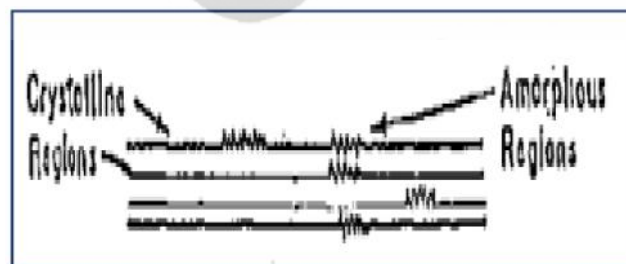
gabungan ribuan rantai homopolisakaridanya (**Gambar 2.4**). Pada tanaman banyak ditemukan selulosa, karena merupakan komponen struktural dari dinding sel utama pada tanaman hijau. Selulosa berupa serat, tidak larut dalam air, dan ditemukan dalam dinding sel pelindung tumbuhan terutama pada tangkai, batang, dahan, dan semua bagian berkayu dari jaringan tumbuhan.



**Gambar 2.4 Struktur Selulosa**

[Sumber : [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)]

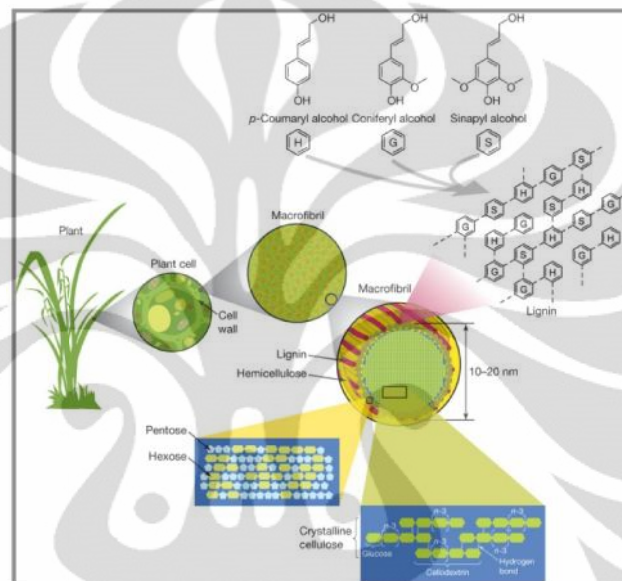
Selulosa yang ditemukan di alam terdapat daerah kristalin dan amorf dalam strukturnya (**Gambar 2.5**). Daerah kristalin ini merupakan daerah selulosa yang rantainya tersusun secara rapih, kuat, serta tidak larut. Sedangkan daerah amorf, rantainya tersusun secara acak, rapuh, dan mudah larut. Proses hidrolisis selulosa ini tidak lepas dari peranan kompleks enzim selulase yang secara spesifik menghidrolisis daerah-daerah tersebut.



**Gambar 2.5 Daerah Kristalin dan Amorf pada Selulosa**

Pada hewan-hewan herbivora, selulosa dapat dihidrolisis dalam tubuh hewan tersebut karena terdapat mikroorganisme dalam tubuh mereka yang mengandung selulase sehingga mampu menghidrolisis selulosa.

Selulosa banyak ditemukan dalam limbah pertanian seperti dedak, jerami padi, tongkol jagung, dan kulit pisang serta limbah perkebunan seperti pelepah sawit atau tandan kosong kelapa sawit. Dalam limbah tersebut tidak hanya terkandung selulosa melainkan terdapat pula komponen lain yaitu lignin, dan hemiselulosa, dimana gabungan ketiganya biasa disebut kompleks lignoselulosa. Seperti yang terlihat pada **Gambar 2.6**.



**Gambar 2.6 Kompleks Lignoselulosa**

[Sumber : Rubin, 2008]

Hemiselulosa merupakan polisakarida yang tidak hanya tersusun dari glukosa, melainkan bermacam-macam jenis gula. Monomer gula penyusun hemiselulosa terdiri dari monomer gula berkarbon 5 (C-5) dan 6 (C-6), misalnya: xylosa, mannososa, glukosa, galaktosa, arabinosa, dan sejumlah kecil rhamnosa, asam glukoroat, asam metal glukoronat, dan asam galaturonat. Xylosa adalah salah satu gula C-5 dan merupakan gula terbanyak kedua di biosfer setelah glukosa. Hemiselulosa lebih mudah dihidrolisis daripada selulosa, tetapi gula C-5 lebih sulit difermentasi menjadi etanol daripada gula C-6 (Ophardt, 2003).

Sedangkan, lignin merupakan molekul kompleks yang tersusun dari unit phenylpropane di dalam struktur tiga dimensi. Lignin adalah material yang paling kuat di dalam biomassa. Lignin sangat resisten terhadap degradasi, baik secara biologi, enzimatik, maupun kimia. Akibat adanya

**Universitas Indonesia**

kandungan karbon yang relatif tinggi dibandingkan dengan selulosa dan hemiselulosa, lignin memiliki kandungan energi yang tinggi (Ophardt, 2003).

Kandungan lignin, selulosa, hemiselulosa bervariasi bergantung pada sumber tanaman. Umumnya, tanaman perkebunan mengandung lignin yang lebih besar dibandingkan dengan tanaman yang berasal dari pertanian. Kandungan lignin yang tinggi dapat mengganggu kerja selulase dalam bereaksi dengan selulosa.

### 2.3 Jamur *Trichoderma viride*

*Trichoderma sp.* merupakan spesies kapang yang banyak ditemukan di tanah seperti lahan pertanian, maupun perkebunan. Spesies ini dapat berguna sebagai organisme pengurai, agen hayati, maupun, stimulator pertumbuhan tanaman. Koloni *Trichoderma* berwarna putih, kuning, maupun hijau dengan susunan benang-benang halus (hifa) yang berbentuk pipih, bersekat dan bercabang. Terdapat sekitar 89 spesies *Trichoderma* telah ditemukan, tiga diantaranya diketahui berperan dalam agen hayati yakni *T. Harzianum*, *T. Viride*, dan *T. Konigii*.

*Trichoderma viride* adalah mikroorganisme yang mampu menghancurkan selulosa tingkat tinggi dan memiliki kemampuan mensintesis beberapa faktor esensial untuk melarutkan bagian selulosa yang terikat kuat dengan ikatan hidrogen (Wood, 1985). Oleh karena itu, jamur ini termasuk jenis jamur selulolitik yang sangat efisien karena kemampuannya menghasilkan enzim selulase untuk merombak selulosa menjadi selobiosa hingga akhirnya menjadi glukosa. Miselium *Trichoderma* dapat menghasilkan enzim yang bermacam-macam termasuk enzim selulase (pendegradasi selulosa) dan kitinase (pendegradasi kitin) (Mulyani, dkk, 2011).

*Trichoderma viride* termasuk ke dalam kelas ascomycetes, dengan klasifikasi atau taksonomi sebagai berikut :

*Kingdom* : Fungi

*Phylum* : Ascomycota

*Class* : Sordariomycetes



*Subclass* : Hypocreomycetidae

*Order* : Hypocreales

*Family* : Hypocreaceae

*Genus* : Trichoderma

*Species* : **Trichoderma viride**

Biakan murni jamur *Trichoderma* dapat dibuat melalui isolasi dari perakaran tanaman, serta dapat diperbanyak dan diremajakan kembali pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Habitat *Trichoderma viride* merupakan jenis fungi yang dinding selnya mengandung zat selulosa yang biasa tumbuh pada daerah bersuhu 25°C – 30°C dengan suhu tumbuh maksimum antara 50°C – 60°C. *Trichoderma viride* biasa ditemukan di tempat – tempat yang memiliki pH antara 3,5 – 6,5 (Permatasari, 2010).

Sumber nutrisi bagi mikroorganismenya umumnya adalah sumber karbon, nitrogen, dan mineral. Pada kapang atau jamur, sumber karbon yang baik bagi pertumbuhannya adalah sumber karbon yang berasal dari karbon organik seperti glukosa yang dapat berasal dari glukosa murni atau glukosa yang berasal dari selulosa, molase, pati, dan sebagainya (Thenawijaya, 1989).

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini berlangsung selama 4 bulan dimulai pada bulan Agustus hingga November 2011, bertempat di Laboratorium Bidang Teknologi Lingkungan (BTL), Pusat Penelitian Kimia Terapan-LIPI, Kawasan PUSPIPTEK, Serpong.

#### **3.2 Peralatan**

Pada penelitian ini, peralatan yang digunakan adalah tabung reaksi, labu erlenmeyer, *beaker glass*, gelas ukur, labu ukur, pipet mikro (Eppendorf), pipet gondok, spatula, batang pengaduk, jarum ose, *cork borer* (diameter 1 cm), cawan petri, pembakar spritus, *magnetic stirrer*, neraca analitis, pH meter, *autoclave*, *waterbath*, *incubator* (SIBATA SSI-450), *hotplate*, *centrifuge* (Beckmann J2-12/E *Centrifuge*), kantong dialisis (Sigma D-9402, diameter 49 mm), kolom kromatografi tipe Hiloal XK 16/10 (Pharmacia Biotech), *gradient mixer*, pompa (Pump P 50, Pharmacia Biotech), alat *freeze dryer* (CoolSafe™ Scanvac), serta digunakan pula instrumen untuk analisis yaitu *spectrophotometer* UV/VIS (Hitachi U-2000). Beberapa alat yang digunakan diperlihatkan pada Lampiran 11.

#### **3.3 Bahan**

##### **3.3.1 Mikroorganisme**

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

##### **3.3.2 Substrat Fermentasi**

Untuk mendapatkan enzim selulase dari sumber mikroorganisme maka dilakukan terlebih dahulu fermentasi. Pada penelitian ini dilakukan

fermentasi padat dengan menggunakan substrat dedak padi yang berasal dari proses penggilingan padi daerah Gunung Sindur, Bogor. Media padat ini digunakan untuk menumbuhkan jamur *Trichoderma viride* strain T051 sebagai sumber enzim selulase.

### 3.3.3 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk peremajaan jamur adalah *Potato Dextrose Agar* atau PDA (Difco) dan akuades. Untuk uji aktivitas enzim selulase digunakan *Carboxymethyl cellulose Na-salt* atau CMC (BDH Laboratory Supply), Buffer asetat yang dibuat dari Asam asetat glasial (Merck), Natrium asetat (Merck), akuades, serta *Trichloroacetate* atau TCA (Merck).

Untuk penentuan kadar glukosa dengan metode Somogyi-Nelson digunakan bahan kimia antara lain : Na-K-tartrat tetrahidrat (Merck),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .anhidrat (Merck),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .anhidrat (Merck),  $\text{NaHCO}_3$  (Merck),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Merck), Natrium arsenat tetrahidrat (Merck), Ammonium molibdat (Merck),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Merck), akuades, dan glukosa (Merck) sebagai standar.

Sedangkan untuk penentuan kadar protein digunakan bahan kimia antara lain : NaOH (Merck),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck), Na-K-tartrat tetrahidrat (Merck),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Merck), Follin Ciocalteu (Merck), serta Bovine Serum Albumin atau BSA (Merck) sebagai standar.

Untuk isolasi dan pemurnian enzim digunakan bahan kimia sebagai berikut : Ammonium sulfat (Merck) sebagai garam untuk presipitasi, EDTA (Sigma) dan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck) serta air bebas mineral untuk *pretreatment* kantung dialisis, untuk kromatografi penukar ion digunakan DEAE-Streamline dengan matriks agarosa (Pharmacia Biotech), buffer Tris-HCl yang dibuat dari Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BDH Laboratory Supply), dan HCl (Merck), serta garam NaCl (Merck) sebagai eluen.

## 3.4 Prosedur Kerja

### 3.4.1 Preparasi Enzim Selulase dari *Trichoderma viride*

#### 3.4.1.1 Persiapan Inokulum *Trichoderma viride* (T051)

Tujuan pembuatan inokulum bertujuan untuk mendapatkan biakan jamur *Trichoderma sp* dengan umur yang diinginkan. Caranya adalah dengan menggosokkan biakan murni pada agar miring PDA, lalu dipindahkan secara aseptis ke dalam cawan petri yang telah berisi media PDA. Biakan diinkubasi selama 3 hari pada suhu 30<sup>0</sup>C. Semua kegiatan tersebut dilakukan dalam *laminar air flow* untuk menjaga adanya kontaminasi pada saat pemindahan kultur mikroorganismenya.

#### 3.4.1.2 Pembuatan Starter (Media Aktivasi)

Jenis fermentasi yang digunakan dalam pembuatan starter adalah fermentasi padat. Caranya adalah dengan menimbang dedak sebanyak 20 gram pada erlenmeyer 100 mL, untuk menjaga kelembaban ditambahkan 20 mL akuades, lalu medium tersebut disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121<sup>0</sup>C, selama 15 menit. Media didinginkan dan siap digunakan sebagai media aktivasi.

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 media aktivasi, kemudian diinkubasi selama 4 hari pada suhu 30<sup>0</sup>C. Semua kegiatan tersebut dilakukan dalam *laminar air flow* untuk menjaga kontaminasi mikroorganismenya.

#### 3.4.1.3 Produksi Enzim Selulase

Inokulum hasil aktivasi yang berumur 4 hari diinokulasikan ke dalam media produksi yang berupa 80 gram dedak dengan penambahan 80 mL akuades, lalu diinkubasi pada suhu 30<sup>0</sup>C selama 5 hari. Semua kegiatan tersebut dilakukan dalam *laminar air flow* untuk menjaga kontaminasi mikroorganismenya.

#### 3.4.1.4 Ekstraksi Enzim Selulase

Untuk menghasilkan ekstrak kasar enzim selulase, media padat hasil fermentasi selama 5 hari diekstrak dengan penambahan 100 mL akuades, kemudian dikocok menggunakan *rotary shaker* selama 15 menit dengan kecepatan 124 rpm. Campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm

selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan atau filtrat yang diperoleh merupakan larutan ekstrak kasar enzim selulase (*crude enzyme*).

### 3.4.2 Pemurnian Enzim Selulase

#### 3.4.2.1 Fraksinasi Enzim Menggunakan Ammonium Sulfat

Ekstrak kasar enzim selulase dipisahkan dengan pengendapan bertingkat menggunakan garam ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan bertahap 0-20%, 20-50%, 50-70%. Ammonium sulfat yang ditambahkan ke dalam larutan dengan tingkat kejenuhan S1-S2% dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah ammonium sulfat (gram)} = \frac{533(S2 - S1)}{100 - 0,3S2} \times \frac{\text{Vol supernatan (mL)}}{1000\text{mL}}$$

Keterangan :

S1= konsentrasi kejenuhan garam mula-mula (%)

S2= konsentrasi kejenuhan garam yang dituju (%)

Ekstrak kasar (150 mL) dalam *beaker glass* ditempatkan pada wadah dingin (*ice salt bath*) dan ditambahkan garam ammonium sulfat (0-20%) sedikit demi sedikit sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah penambahan garam selesai, pengadukan masih terus dilakukan selama 20 menit. Larutan tersebut dibiarkan mengendap semalam dalam lemari pendingin.

Larutan yang telah diendapkan semalam, disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Endapan hasil sentrifugasi disuspensikan dengan larutan buffer asetat 0,2 M pH 5. Sedangkan filtrat atau supernatannya digunakan untuk fraksi tingkat kejenuhan selanjutnya. Dilakukan hal yang sama pada penambahan ammonium sulfat 20-50% (fraksi 2), 50-70% (fraksi 3). Pada tiap fraksi dilakukan uji aktivitas enzim selulase dan kadar protein. Fraksi yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi dimurnikan lebih lanjut melalui proses dialisis dan diikuti dengan fraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom penukar ion.

#### 3.4.2.2 Dialisis

Untuk melakukan dialisis digunakan kantung dialisis (Sigma D-9402, diameter 49 mm) dengan panjang 10 cm. Kantung tersebut diikat pada satu ujung ,

lalu kedalamnya dimasukkan larutan enzim dan diikat pada ujung yang lain. Kemudian kantung berisi enzim direndam dalam larutan buffer asetat pH 5 dengan konsentrasi yang lebih encer dari buffer yang digunakan untuk melarutkan enzim. Proses ini berlangsung dengan disertai pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* dan suhu sistem dijaga 4°C dengan menempatkannya pada *ice salt bath*. Selama dialisis dilakukan pergantian buffer selama 2 jam sekali. Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai, buffer hasil dialisis diuji dengan larutan BaCl<sub>2</sub>, caranya 2 mL buffer dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 4 tetes HCl 0,1 M dan 1 mL BaCl<sub>2</sub> 5%(w/v). Apabila sudah tidak terbentuk endapan putih BaSO<sub>4</sub>, dialisis dihentikan.

Sebelum digunakan untuk dialisis enzim, kantung dialisis terlebih dahulu disiapkan dengan ukuran yang sesuai, lalu direndam dalam air bebas mineral selama 2 jam. Kemudian direbus dengan air bebas mineral pada suhu 70°C selama 2-5 menit dan direndam dalam larutan EDTA 0,001 M yang mengandung 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> selama 1 jam. Terakhir kantung dibilas dengan air bebas mineral sampai bersih dan dipanaskan kembali dalam air hingga suhu 70° C.

#### **3.4.2.3 Kromatografi Kolom Penukar Ion**

Sebelum dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom penukar ion, larutan enzim hasil dialisis dipekatan terlebih dahulu dengan teknik pengeringanbeku (*freeze-drying*) menggunakan alat *freeze-dryer*.

Pengisi kolom yang digunakan adalah DEAE-Streamline (Pharmacia Biotech) yang mengandung gugus fungsional berupa DEAE (Dietilaminoetil) sebagai penukar anion, dan matriks polisakarida berupa agarosa.

Prosedur yang dilakukan adalah dengan memasukkan sampel enzim ke dalam kolom kromatografi (HiLoad 16/10, ukuran 1,6 x 20 cm) yang telah terisi matriks DEAE-Streamline dan dilakukan elusi awal menggunakan buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,2, serta kemudian elusi *stepwise* (gradasi bertingkat) menggunakan garam NaCl 0,25; 0,5; 1 M dalam buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,2. Eluat dikumpulkan dalam tabung fraksi (2 mL/tabung). Laju alir yang digunakan adalah 2 mL/menit dengan bantuan pompa vakum (Pump P 50, Pharmacia Biotech).

Setelah seluruh fraksi terkumpul, dilakukan pengukuran protein dengan mengukur absorbansi larutan pada daerah UV dengan panjang gelombang 280 nm. Dari hasil pengukuran dapat dibuat grafik dengan mengalurkan nilai absorbansinya terhadap nomor fraksi sehingga diperoleh beberapa puncak protein. Semua puncak protein diuji aktivitas selulasenya sebagai aktivitas CMCase dengan menggunakan substrat CMC. Fraksi-fraksi yang mempunyai aktivitas selulase paling tinggi dikumpulkan menjadi satu fraksi yang dinamakan menjadi fraksi puncak atau fraksi P, dan diuji aktivitas selulasenya serta kadar protein dengan metode Lowry untuk menentukan aktivitas spesifiknya.

### **3.4.3 Karakterisasi Enzim Selulase**

#### **3.4.3.1 Penentuan pH optimum**

Pengujian aktivitas enzim pada berbagai pH dilakukan pada pH 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; dan 8, menggunakan buffer asetat 0,2 M (pH 3-5,5) dan buffer fosfat 0,2 M (pH 6-8). Komposisi penambahan buffer, substrat, dan enzim sama dengan uji aktivitas enzim (3.4.4). Kemudian diinkubasi selama 0 dan 30 menit pada suhu 45°C. Aktivitas enzim dihentikan dengan cara menambahkan 0,1 mL TCA 1% dan direndam dalam air mendidih selama ± 5 menit. Selanjutnya glukosa yang terbentuk ditentukan konsentrasinya dengan metode Somogyi-Nelson.

#### **3.4.3.2 Penentuan suhu optimum**

Pengujian aktivitas enzim pada berbagai suhu dilakukan pada suhu 4° (lemari es); 25° (suhu ruang); 30°; 40°; 45°; 50°; 55°; 60°; 65°C. Komposisi penambahan buffer asetat pH optimum, substrat, dan enzim sama dengan uji aktivitas enzim (3.4.4). Kemudian diinkubasi selama 0 dan 30 menit pada suhu yang divariasikan. Aktivitas enzim dihentikan dengan cara menambahkan 0,1 mL TCA 1% dan direndam dalam air mendidih selama ± 5 menit. Selanjutnya glukosa yang terbentuk ditentukan konsentrasinya dengan metode Somogyi-Nelson.

#### **3.4.3.3 Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim**

Tujuan percobaan ini adalah melihat pengaruh berbagai ion logam terhadap aktivitas enzim selulase sehingga dapat diketahui ion logam mana yang

akan bersifat sebagai inhibitor maupun aktivator. Ion logam yang digunakan adalah ion  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , dan  $Cu^{2+}$  dengan variasi konsentrasi 1 sampai 100 mM larutan ion logam tersebut dicampur dengan substrat, buffer pH optimum, dan larutan enzim. Sampel dikocok dan diinkubasi pada suhu optimum selama 0 dan 30 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan cara menambahkan 0,1 mL TCA 1% dan direndam dalam air mendidih selama  $\pm 5$  menit. Selanjutnya glukosa yang terbentuk ditentukan konsentrasinya dengan metode Somogyi-Nelson.

### 3.4.4 Uji Aktivitas Enzim (*Enzyme Assay*)

Aktivitas enzim selulase diuji dengan menggunakan substrat uji aktivitas yang mengandung selulosa, yaitu: CMC (*Carboxymethyl cellulose*) 1%. Komposisi bahan-bahan yang digunakan ditunjukkan pada **Tabel 3.1** berikut:

**Tabel 3.1** Komposisi substrat dan filtrat enzim untuk uji aktivitas

Pereaksi	Volume (mL)
Substrat CMC 1%	1 mL
Buffer Asetat 0,2 M (pH 5)	0,9 mL
Enzim	0,1 mL

[Sumber : NREL, 1996]

Sampel enzim diinkubasi pada suhu  $45^{\circ}C$  dengan waktu inkubasi, yaitu 0 dan 30 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan cara menambahkan 0,1 mL TCA 1% dan direndam dalam air mendidih selama  $\pm 5$  menit. Selanjutnya glukosa yang terbentuk ditentukan konsentrasinya dengan metode Somogyi-Nelson.

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

$$AE = \frac{(p_t - q_0)}{t} \times Fp$$

Keterangan:

AE = Aktivitas Enzim (U/mL)

$C_t$  = Konsentrasi glukosa pada waktu inkubasi t menit (mg/mL)

$C_0$  = Konsentrasi glukosa pada waktu inkubasi 0 menit (mg/mL)



t = Waktu inkubasi (menit)

Fp = Faktor pengenceran

Satu unit enzim selulase didefinisikan sebagai banyaknya glukosa (mg) yang dihasilkan selama 30 menit waktu inkubasi pada suhu 45<sup>0</sup>C dan pH 5.

### 3.4.5 Penentuan Konsentrasi Glukosa (Metode Somogyi-Nelson)

Glukosa yang terbentuk pada uji aktivitas enzim, selanjutnya ditentukan konsentrasinya dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson. Sampel yang berasal dari uji aktivitas dipipet hingga 1 mL (faktor pengenceran disesuaikan dengan tiap sampel), lalu ditambahkan pereaksi Nelson C (campuran Nelson A : Nelson B = 25:1) sebanyak 1 mL. Campuran dididihkan selama 20 menit, kemudian didinginkan. Selanjutnya, dilakukan penambahan 1 mL pereaksi arsenomolibdat, kemudian diencerkan dengan 7 mL akuades, lalu campuran dikocok menggunakan *vortex* dan diukur absorbansinya menggunakan *spectrophotometer* pada panjang gelombang 520 nm. Larutan standar yang digunakan adalah larutan Glukosa dengan konsentrasi 10 mg/mL.

Pereaksi Nelson A dibuat dari Na-K-tartrat tetrahidrat (12,5 gram), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.anhidrat (12,5 gram), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.anhidrat (100 gram), dan NaHCO<sub>3</sub> (10 gram), kemudian dilarutkan dengan akuades hingga volume 500 mL. Nelson B dibuat dari CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (7,5 gram) dan dilarutkan hingga volume 50 mL.

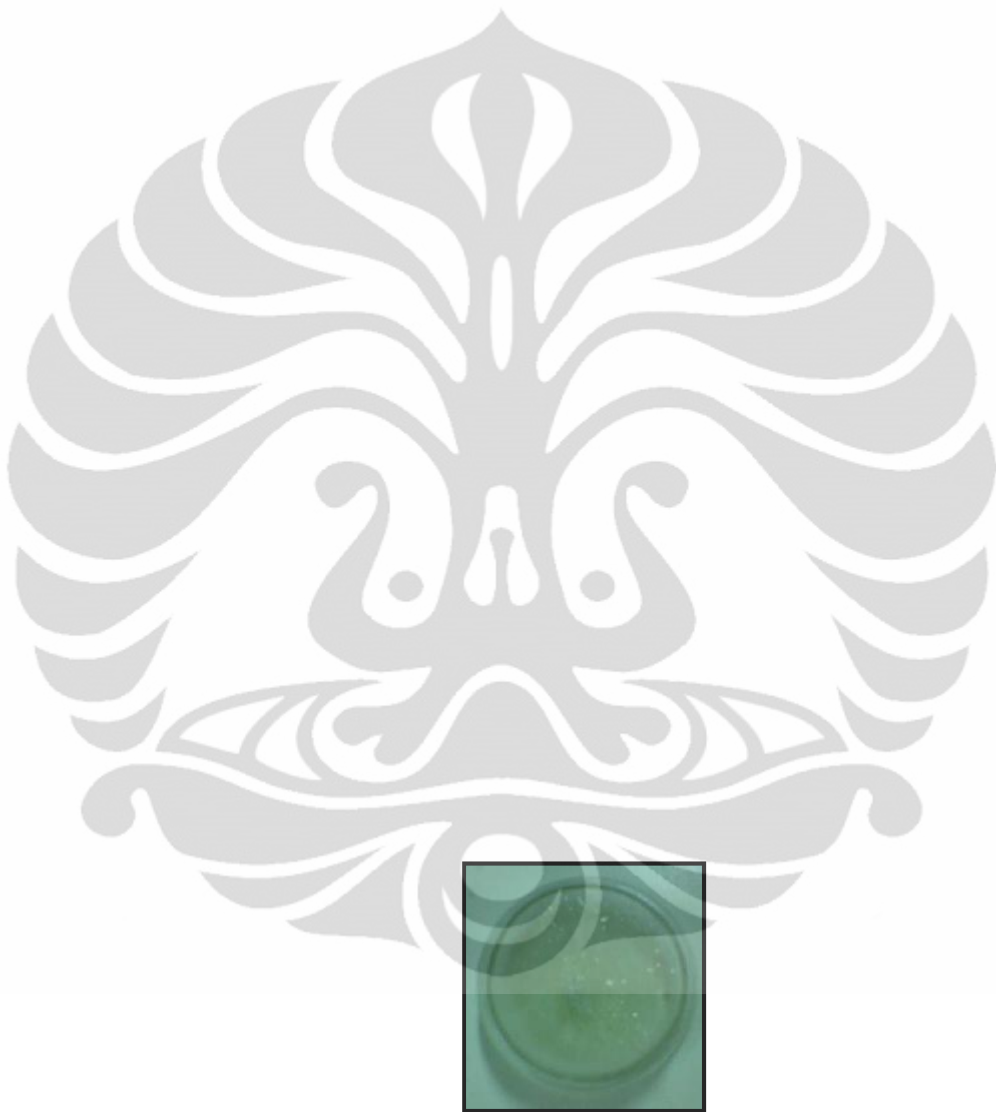
### 3.4.6 Penentuan Konsentrasi Protein (Metode Lowry)

Sampel enzim selulase dipipet dan diencerkan dengan akuades hingga volume 4 mL, kemudian ditambahkan 5,5 mL larutan Lowry C dan 0,5 mL larutan Lowry D, lalu divortex dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya, absorbansi diukur menggunakan *spectrophotometer* pada panjang gelombang 650 nm.

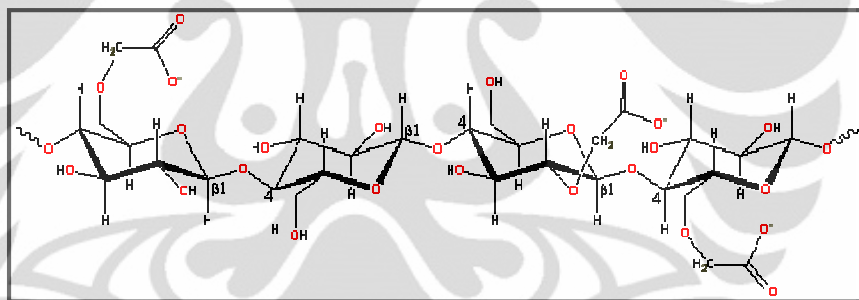
Pereaksi yang digunakan terdiri atas : Lowry A yang dibuat dari 0,5 gram CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dan 1 gram K-Na tartrat. Keduanya dilarutkan dalam

akuades sampai volume menjadi 100 mL. Lowry B dibuat dari 2 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 0,4 gram NaOH yang dilarutkan dalam akuades sampai volume mencapai 100 mL. Lowry C terdiri atas lowry A dan B yang dicampurkan dengan perbandingan 50:1. Lowry D adalah pereaksi Follin Ciocalteu : akuades (1:1).









karena dimungkinkan dapat menginaktivasi enzim, harganya mahal, mudah terbakar, umumnya memiliki sifat toksik, dan cenderung mendenaturasi protein pada suhu agak tinggi (Yanti, 2003).

Untuk mengefektifkan pemisahan maka digunakan metode *salting-out* dengan asumsi pada kondisi konsentrasi garam yang tinggi (jenuh) akan meningkatkan interaksi hidrofobik antara protein dan air, dimana air akan cenderung tertarik oleh ion-ion garam sehingga kelarutan protein dalam air akan menurun dan terjadi pengendapan protein. Oleh karena itu, protein-protein tersebut, satu dengan yang lainnya akan terpisahkan tergantung pada perbedaan ukuran berat molekul protein yang ada dalam larutan.

Fraksinasi menggunakan ammonium sulfat ini dilakukan dengan kejenuhan bertingkat yakni 0-20% (fraksi 1), 20-50% (fraksi 2), 50-70% (fraksi 3). Endapan protein yang dihasilkan pada tiap fraksi kejenuhan disuspensikan dengan 0,2 M buffer asetat pH 5, dan tiap fraksi ditentukan aktivitas enzim serta kadar proteinnya. Data aktivitas enzim dan kadar protein dapat menghasilkan nilai aktivitas spesifik yang dapat pula memperlihatkan tingkat kemurnian fraksi enzim.

Fraksi dengan aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada fraksi 2 dengan tingkat kejenuhan 20-50%, dimana menghasilkan aktivitas spesifik sebesar 11,4530 mU/mg dengan tingkat kemurnian 5,3 kali terhadap ekstrak kasar, serta perolehan enzim 16,31% (seperti terlihat pada **Tabel 4.1**). Pada fraksi tersebut dapat dikatakan bahwa protein dengan aktivitas selulase paling tinggi terdapat pada fraksi dengan kejenuhan ammonium sulfat 20-50%. Sedangkan pada fraksi lain, walaupun terdeteksi memiliki aktivitas selulase, namun nilai aktivitas spesifik dan tingkat kemurniannya relatif rendah. Fraksinasi dengan pengendapan menggunakan garam ini dapat dikatakan belum murni karena masih tercampur dengan protein lain, walaupun sudah terbebas dari kontaminan non-protein terlarut.

Pengaruh garam ammonium sulfat dalam protein enzim hasil fraksinasi yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi, dihilangkan dengan melakukan dialisis menggunakan kantung dialisis (selofan) dengan pori-pori lebih kecil dari molekul protein sehingga protein akan tertahan didalam

**Universitas Indonesia**

kantung dan molekul yang berukuran kecil seperti ion garam akan lolos melalui kantung dan terpisah dari protein. Fraksi hasil dialisis memberikan tingkat kemurnian yang lebih baik dibanding fraksi sebelumnya yang diperlihatkan dengan meningkatnya nilai aktivitas spesifik menjadi 15,4033 mU/mg dengan tingkat kemurnian sebesar 7,1 kali terhadap ekstrak kasar dan perolehan enzim 13,91%.

Protein terlarut yang diperoleh dari ekstraksi dan fraksinasi enzim akan banyak mengandung pelarut air didalamnya sehingga larutan enzim berada dalam keadaan encer. Keadaan ini dapat menurunkan aktivitas enzim dalam jangka waktu penyimpanan. Untuk mengatasi hal itu, perlu dilakukan pemekatan protein untuk mengurangi kandungan pelarut sehingga larutan protein enzim dapat tahan disimpan dalam jangka waktu yang lama. Selain itu, tahap pemekatan ini perlu dilakukan terlebih dahulu untuk menuju ke proses pemurnian selanjutnya seperti kromatografi. Hal ini berguna untuk memperoleh konsentrat protein, agar larutan protein tidak terlalu encer ketika dielusi melalui kolom kromatografi, yang menggunakan volume eluen (pelarut) dalam jumlah banyak.

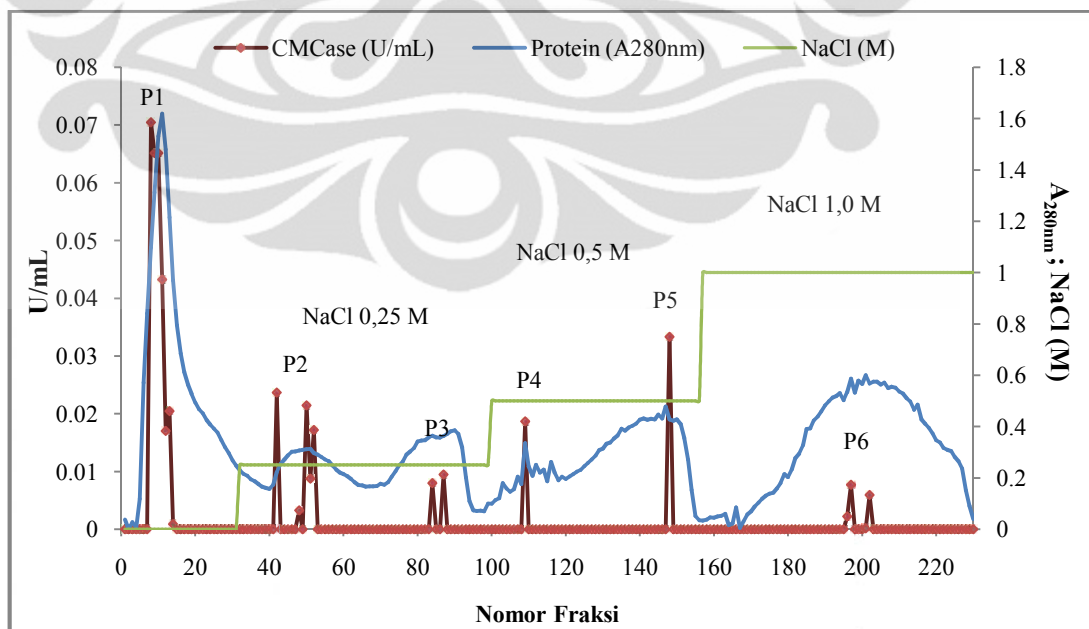
Pemekatan yang umum dilakukan adalah dengan cara ultrafiltrasi dan liofilisasi (*freeze-drying*). Dalam penelitian ini digunakan teknik liofilisasi (*freeze-drying*) pada fraksi dialisis untuk selanjutnya dilakukan kromatografi kolom. Teknik liofilisasi ini adalah salah satu teknik yang paling efektif untuk memekatkan material yang sensitif akan suhu tinggi seperti protein. Dalam hal ini, molekul yang mudah menguap (*volatile*) seperti pelarut air akan tersublimasi dibawah kondisi suhu  $-40^{\circ}\text{C}$  (*frozen*), sedangkan molekul yang *non-volatile* (seperti protein, buffer, garam, asam nukleat, dan lain-lain) akan terpekatkan.

#### **4.2.2. Kromatografi Kolom Penukar Ion**

Kromatografi kolom merupakan tahap fraksinasi protein enzim yang dapat menghasilkan protein enzim lebih murni. Konsentrat fraksi dialisis dimasukkan ke dalam kolom penukar anion DEAE-Streamline. Seluruh fraksi yang ditampung dilakukan pengukuran absorbansi pada daerah UV

panjang gelombang 280nm. Pengukuran absorbansi ini sangat efisien untuk mendeteksi dan menggambarkan profil protein dalam larutan hasil fraksinasi kromatografi kolom. Protein dapat diserap pada panjang gelombang 280nm karena adanya keberadaan residu asam amino tirosin dan triptofan dalam protein. Metode absorpsi protein oleh sinar UV memiliki beberapa keuntungan yaitu : (1) larutan sampel dapat langsung diukur absorbansinya tanpa penambahan reagen, (2) tidak memerlukan waktu inkubasi untuk reaksi, (3) hubungan konsentrasi protein linear terhadap absorbansi (Deutscher, 1990).

Seluruh fraksi yang diperoleh melalui elusi bertingkat (*stepwise*), setelah diukur proteinnya pada panjang gelombang 280 nm dan ditentukan aktivitas selulasenya, dihasilkan 6 puncak protein (P1, P2, P3, P4, P5, dan P6) seperti diperlihatkan pada **Gambar 4.4**. Fraksi puncak pertama (P1) muncul ketika elusi dengan buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,2. Puncak kedua dan ketiga (P2 dan P3) diperoleh setelah elusi oleh NaCl *stepwise* 0,25 M. Puncak keempat dan kelima (P4 dan P5) muncul setelah elusi oleh NaCl *stepwise* 0,5 M, sedangkan fraksi puncak keenam (P6) muncul setelah elusi oleh NaCl *stepwise* 1,0 M.



**Gambar 4.4. Profil elusi kromatografi kolom penukar anion (DEAE-Streamline).** Kondisi analisis : Ukuran kolom 1,6x20 cm (HiLoad 16/10). Volume resin 20 mL.



Elusi dengan Buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,2, serta dilanjutkan dengan elusi *stepwise* (gradasi bertingkat) dilakukan pada buffer tersebut yang mengandung kadar NaCl 0,25; 0,5; 1,0 M. Laju alir 2 mL/menit. Volume eluat 2 mL/tabung. P1 (fraksi 1), P2 (fraksi 2), P3 (fraksi 3), P4 (fraksi 4), P5 (fraksi 5), P6 (fraksi 6).

Semua fraksi yang dikumpulkan dari masing-masing puncak protein tersebut diukur aktivitas spesifiknya. Aktivitas spesifik tertinggi terdapat pada fraksi pertama (P1) yaitu sebesar 85,6703 mU/mg dan tingkat kemurnian 39,1 kali terhadap ekstrak kasar. Hal ini diduga fraksi enzim selulase telah lolos pada fraksi P1 sebelum elusi menggunakan garam NaCl ditandai dengan terdeteksinya aktivitas selulase tertinggi dalam fraksi tersebut sebesar 48,387 mU/mL. Aktivitas selulase tersebut terukur sebagai aktivitas CMCCase, sehingga dimungkinkan terjadi pemisahan kompleks selulase dimana pada fraksi P1 mengandung lebih banyak enzim endoglukanase (CMCase).

Pada fraksi lain seperti fraksi P3 dan P4 dalam elusi buffer dan garam NaCl 0,25 dan 0,5 M, setelah dilakukan uji aktivitas enzim, didapati bahwa aktivitas CMCCase tidak dapat terdeteksi yang berarti pada fraksi tersebut tidak mengandung enzim endoglukanase (CMCase), walaupun terdeteksi proteinnya. Dapat dikatakan bahwa ketika elusi menggunakan dua eluen (buffer dan garam) telah meloloskan protein namun bukan protein enzim endoglukanase (CMCase).

Sedangkan, pada fraksi P2, P5, dan P6, aktivitas CMCCase dapat terdeteksi yang ditandai dengan adanya aktivitas CMCCase masing-masing 2,9598; 2,3679; dan 7,3996 mU/mL dengan aktivitas spesifik 49,4292; 33,5113; dan 56,6848 mU/mg.

Dalam hal ini, fraksi P1 tidak terikat kuat pada matriks karena diduga muatan protein enzim pada fraksi tersebut sama dengan muatan pada matriks sehingga protein langsung lolos dalam eluen buffer melewati matriks. Hal itu dapat terjadi karena protein enzim dalam larutan memiliki variasi muatan yang berbeda sehingga ketika dilewatkan ke dalam matriks penukar anion yang bermuatan positif, akan terjadi fraksinasi atau pemisahan protein berdasarkan afinitas muatan protein terhadap muatan matriks. Kekuatan

ikatan antara muatan protein enzim dalam larutan terhadap matriks bergantung pada ukuran muatan dan kerapatan muatan (Boyer, 1993). Muatan terbesar akan berinteraksi lebih kuat terhadap matriks. Afinitas komponen yang terikat secara ionik dengan penukar ion dapat dilepaskan dengan mengubah kadar garam atau pH larutan eluen (Yamamoto, 1988). Pada pemisahannya, dapat dihasilkan protein enzim yang berbeda antara fraksi eluat karena adanya perbedaan muatan protein dalam tiap komponen enzim.

Diketahui bahwa enzim selulase merupakan kompleks enzim yang terdiri dari 3 komponen enzim yaitu Endo- $\beta$ -1,4-glukanase (CMCase), Ekso- $\beta$ -1,4-glukanase atau selobiohidrolase (Aviselase) dan  $\beta$ -1,4-glukosidase atau selobiase (Purwadaria, 1999). Pada tiap komponen selulase tersebut dapat dideteksi dengan menggunakan substrat yang berbeda.

Pada penelitian ini, dibatasi hanya menggunakan substrat CMC sehingga dari fraksinasi menggunakan kolom penukar anion DEAE-Streamline ini diperoleh fraksi P1 (dalam elusi buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,2) mengandung paling banyak komponen endoglukanase (CMCase) yang nantinya dilakukan karakterisasi enzim tersebut berdasarkan pengaruhnya terhadap variasi pH dan suhu, serta penambahan ion logam. Dalam hal ini, mungkin saja terdapat komponen selulase yang lain seperti komponen eksoglukanase (aviselase) ataupun  $\beta$ -1,4-glukosidase (selobiase) pada fraksi-fraksi lain yang tersebar ketika elusi *stepwise* menggunakan garam NaCl.

Protein yang diperoleh dari fraksi hasil kromatografi kolom memperlihatkan penurunan perolehan enzim dan kadar protein yakni 4,13 % (P1), 0,25 % (P2), 0,17 % (P5), 0,52 (P6). Namun, dalam hal peningkatan kemurnian enzim diperoleh tingkat kemurnian yang cukup signifikan menggunakan kromatografi kolom ini yaitu 39,7 kali terhadap ekstrak kasar, jika dibandingkan dengan fraksi konsentrat dialisis sebelumnya yakni 7,1 kali terhadap ekstrak kasar.

**Tabel 4.1 Ringkasan tahap pemurnian enzim**

Fraksi	Volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total Protein (mg)	Aktivitas CMCase (mU/mL)	Total Aktivitas (mU)	Aktivitas Spesifik (mU/mg)	Tingkat Kemurnian (kali)	Yield (%)
<b>Ekstrak Kasar</b>	400	<b>16.467</b>	6586.83	<b>35.518</b>	14207.2	<b>2.1569</b>	-	100
<i>Fraksinasi Enzim dengan Ammonium Sulfat</i>								
Fraksi 1 (0-20%)	5.5	7.329	40.31	23.679	130.23	3.2307	1.5	0.92
<b>Fraksi 2 (20-50%)</b>	12.55	<b>16.120</b>	202.30	<b>184.619</b>	2316.97	<b>11.4530</b>	<b>5.3</b>	16.31
Fraksi 3 (50-70%)	11.4	27.162	309.64	140.962	1606.97	5.1897	2.4	11.31
Fraksi 4 (Filtrat sisa)	173	8.695	1504.17	54.757	9472.94	6.2978	2.9	66.68
<b>Dialisat</b>	10	<b>12.826</b>	128.26	<b>197.569</b>	1975.69	<b>15.4033</b>	<b>7.1</b>	13.91
<i>Kromatografi Kolom Penukar Anion (DEAE-Streamline)</i>								
<b>P1</b>	12	<b>0.570</b>	6.84	<b>48.837</b>	586.047	<b>85.6703</b>	<b>39.7</b>	4.13
P2	12	0.060	0.72	2.960	35.518	49.4292	22.9	0.25
P3	12	0.087	1.04	TT	TT	TT	TT	TT
P4	10	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
P5	10	0.071	0.71	2.368	23.679	33.5113	15.5	0.17
P6	10	0.131	1.31	7.400	73.996	56.6848	26.3	0.52

Keterangan : TT = Tidak Terdeteksi

### 4.3 Karakterisasi Enzim

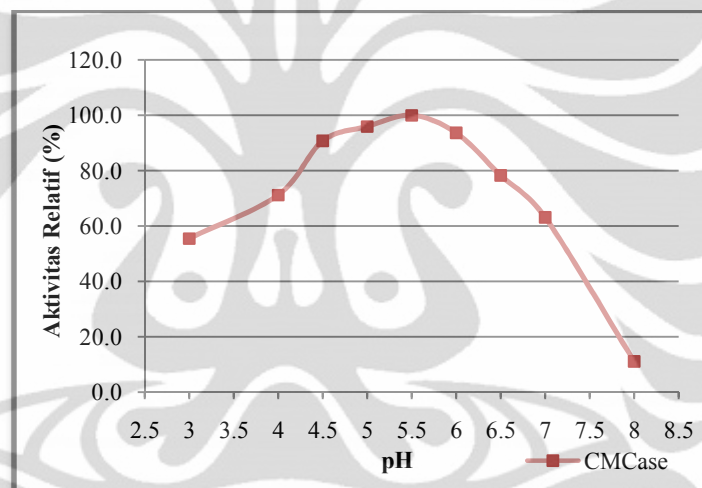
Enzim selulase hasil pemurnian parsial selanjutnya dikarakterisasi dengan menentukan pH dan suhu optimumnya serta pengaruh ion logam terhadap aktivitas CMCase.

#### 4.4.1. Penentuan pH optimum

Semua reaksi enzimatik dipengaruhi oleh pH lingkungannya, sehingga enzim memerlukan larutan buffer untuk mengontrol pH reaksinya. Aktivitas enzim akan mencapai optimum ketika berada pada kondisi pH yang tepat dalam menjalankan reaksi. Untuk menentukan pH optimum suatu enzim dilakukan dengan memvariasikan kondisi pH larutan buffer ketika uji aktivitas enzim. Dalam penelitian ini digunakan variasi pH 3 sampai 8 dalam suhu inkubasi 45°C. Fraksi yang diambil untuk karakterisasi ini adalah fraksi

P1 yang diperoleh dari fraksinasi menggunakan kromatografi kolom penukar anion.

Fraaksi P1 mencapai aktivitas CMCase yang optimum pada pH 5,5 dengan aktivitas sebesar 50,909 mU/mL. Berdasarkan hasil variasi pH yang dilakukan (seperti terlihat pada **Gambar 4.5**), menunjukkan peningkatan aktivitas selulase dalam daerah pH asam hingga mencapai titik optimum pada pH 5,5. Namun, mengalami penurunan aktivitas yang drastis ketika nilai pH mulai naik sampai menjadi basa. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Pusat Penelitian Kimia Terapan LIPI, terhadap ekstrak kasar selulase dari hasil fermentasi padat dedak padi oleh jamur *Trichoderma viride* memperlihatkan hasil pH optimum selulase yang sama yakni pH 5,5.

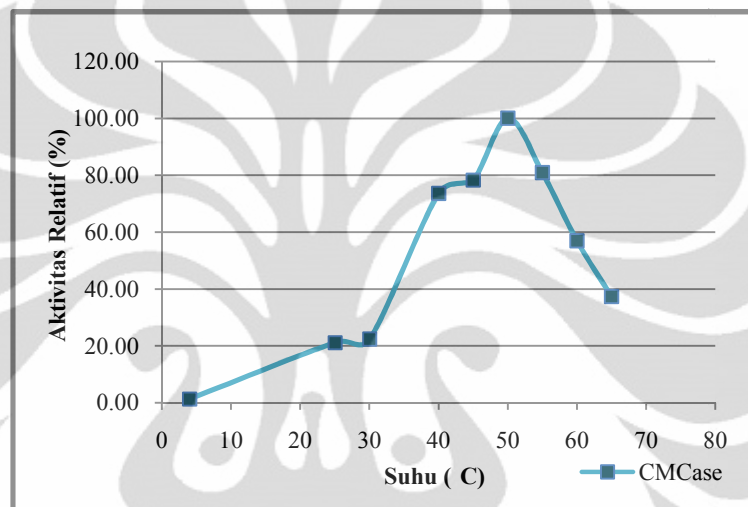


**Gambar 4.5. Grafik aktivitas CMCase terhadap variasi pH**

Seperti yang telah dilaporkan pula oleh Kavitha (2011) dalam penelitiannya terhadap aktivitas CMCase (endoglukanase) dari *Trichoderma viride* dalam media dedak padi, menunjukkan pH optimum yang sama yaitu pH 5 sampai 5,5. Enzim selulase umumnya aktif pada daerah pH 4 sampai 6. Hal itu juga terlihat dari hasil penelitian ini yang memperlihatkan perbedaan aktivitas yang tidak terlalu jauh pada daerah pH tersebut. Pada daerah basa yakni pH 8, aktivitas selulase sudah sangat menurun karena ketidakcocokan pH lingkungan terhadap karakter selulase, sehingga menyebabkan selulase mengalami inaktivasi.

#### 4.4.2. Penentuan suhu optimum

Pengaruh suhu pada reaksi enzimatik adalah hal yang penting karena berkaitan dengan spesifikasi kondisi optimum yang berbeda pada tiap reaksi enzimatik. Suhu yang digunakan oleh enzim hasil pemurnian ini dalam menghasilkan aktivitas CMC<sub>Case</sub> yang optimum adalah suhu 50°C dalam pH 5,5 (pH optimum) terlihat dengan aktivitas CMC<sub>Case</sub> yang dihasilkan sebesar 64,968 mU/mL. Pada penelitian yang telah banyak dilakukan, selulase umumnya aktif pada daerah suhu 30 sampai 55°C.



**Gambar 4.6. Grafik aktivitas CMC<sub>Case</sub> terhadap variasi suhu**

Pada **Gambar 4.6**, terlihat dalam suhu rendah (4°C), aktivitas CMC<sub>Case</sub> sangat rendah (0,888 mU/mL) dikarenakan enzim cenderung tidak aktif, dan ketika bertambahnya suhu sampai dengan suhu optimum ( $T_{\text{optimum}}$ ) terjadi kenaikan kecepatan reaksi enzim karena bertambahnya energi kinetik antara enzim dan substrat sehingga memperbesar peluang keduanya untuk bereaksi dan membentuk produk (Thenawijaya, 1989).

Pada suhu tinggi (diatas suhu optimum), protein enzim mengalami perubahan konformasi yang mungkin mengubah bentuk sisi aktifnya sehingga afinitas terhadap substratnya berkurang. Hal ini sesuai dengan hasil yang diperoleh bahwa pada suhu 65°C, enzim selulase masih terlihat aktif ditandai dengan adanya aktifitas sebesar 24,271 mU/mL, namun sudah mengalami penurunan yang disebabkan oleh protein enzim mulai terdenaturasi pada suhu lebih tinggi dari suhu optimumnya. Aktivitas enzim

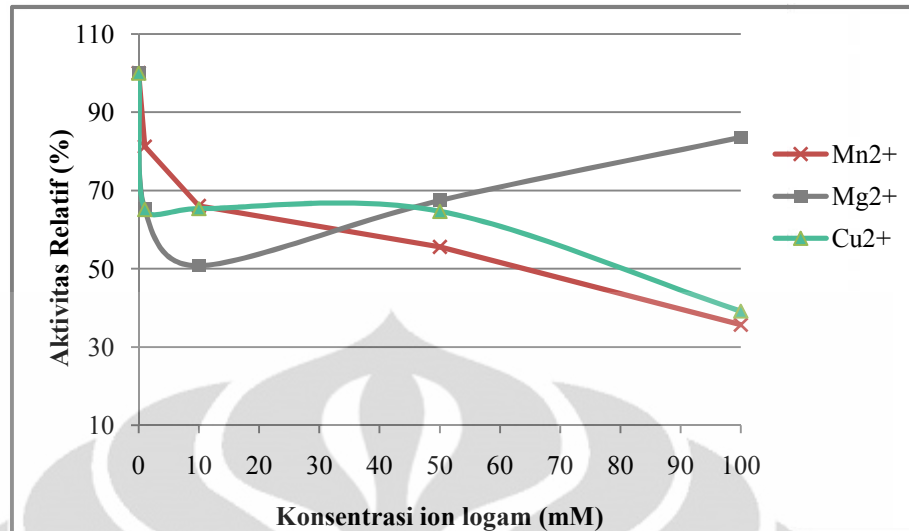
yang optimum memperlihatkan kondisi lingkungan (seperti pH dan suhu) yang tepat bagi enzim dalam bereaksi dengan substrat.

#### 4.4.3. Pengaruh ion logam terhadap aktifitas enzim

Aktivitas enzim tidak hanya dipengaruhi oleh faktor pH dan suhu lingkungannya, namun dipengaruhi pula oleh adanya senyawa yang dapat bersifat sebagai inhibitor ataupun aktivator. Secara kimiawi, inhibitor dan aktivator sulit dibedakan, namun dapat diketahui ketika berinteraksi dengan enzim. Aktivator adalah senyawa yang apabila berinteraksi dengan enzim dapat meningkatkan aktivitas enzim, sedangkan inhibitor adalah senyawa yang cenderung menurunkan aktivitas enzim. Senyawa yang dapat berperan sebagai aktivator atau inhibitor terhadap aktivitas enzim antara lain ialah ion logam.

Pada penelitian ini, digunakan beberapa ion logam divalen untuk melihat pengaruhnya terhadap aktivitas CMC<sub>ase</sub> dalam kondisi suhu dan pH optimum yang diperoleh dari percobaan sebelumnya (suhu 50°C dan pH 5,5). Ion logam tersebut adalah ion Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> (masing-masing dalam bentuk larutan MgSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>)

Dari penelitian ini diperoleh hasil seperti terlihat pada **Gambar 4.7**, adanya penambahan ion logam Mg<sup>2+</sup> pada konsentrasi 1-10 mM ke dalam campuran enzim-substrat, menunjukkan penurunan aktivitas CMC<sub>ase</sub>, sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi (50-100 mM) menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas CMC<sub>ase</sub>. Hal ini karena ion logam Mg<sup>2+</sup> (pada konsentrasi lebih tinggi) dimungkinkan dapat menstabilkan konformasi molekul protein enzim sehingga membantu molekul substrat menjadi lebih terorientasi terhadap sisi aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim-substrat untuk menghasilkan produk.



**Gambar 4.7. Grafik pengaruh ion logam terhadap aktivitas CMCase**

Seperti halnya yang telah dilaporkan Sami (1989) dalam penelitiannya terhadap CMCase hasil pemurnian, menyatakan bahwa ion  $Mg^{2+}$  dan  $Ca^{2+}$  menghambat aktivitas CMCase pada konsentrasi 2-5 mM, dan mengaktifkan pada konsentrasi lebih tinggi (10-15 mM). Sedangkan, penelitian yang telah dilaporkan Okada (1975), menyatakan bahwa ion  $Mg^{2+}$  tidak memberikan efek terhadap aktivitas katalitik CMCase (endoglukanase) yang diisolasi dari *Trichoderma viride*. Dari hasil studi penelitian yang telah dilaporkan ini, dapat diasumsikan bahwa ion  $Mg^{2+}$  atau beberapa ion logam golongan alkali seperti  $Ca^{2+}$  memberikan pengaruh yang kecil atau tidak signifikan terhadap aktivitas CMCase (endoglukanase). Hasil penelitian di atas sejalan dengan hasil yang diperoleh pada penelitian ini yaitu adanya penambahan ion  $Mg^{2+}$  pada konsentrasi 100 mM terhadap aktivitas CMCase menghasilkan persen inhibisi yang relatif rendah sebesar 16,4%.

Untuk logam-logam transisi seperti yang diperoleh dari hasil penelitian ini, yaitu logam  $Mn^{2+}$  dan  $Cu^{2+}$  menunjukkan adanya penurunan aktivitas CMCase seiring dengan peningkatan konsentrasi ion logamnya (**Gambar 4.7**). Penghambatan terhadap aktivitas enzim ini dimungkinkan karena adanya interaksi antara ion logam transisi dengan molekul protein enzim yang menyebabkan terjadinya pemutusan ikatan disulfida dalam struktur tertier protein enzim tersebut. Adanya perubahan konformasi

struktur protein enzim ini dapat mengakibatkan berubahnya bentuk sisi aktif enzim sehingga menurunkan aktivitas katalitik enzim terhadap substrat.

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ion-ion logam transisi yaitu  $Mn^{2+}$  dan  $Cu^{2+}$  menghambat aktivitas CMCase pada konsentrasi ion logam 100 mM, dengan persen inhibisi berturut-turut adalah 64,2 %, dan 60,2 %.





## BAB 5 PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

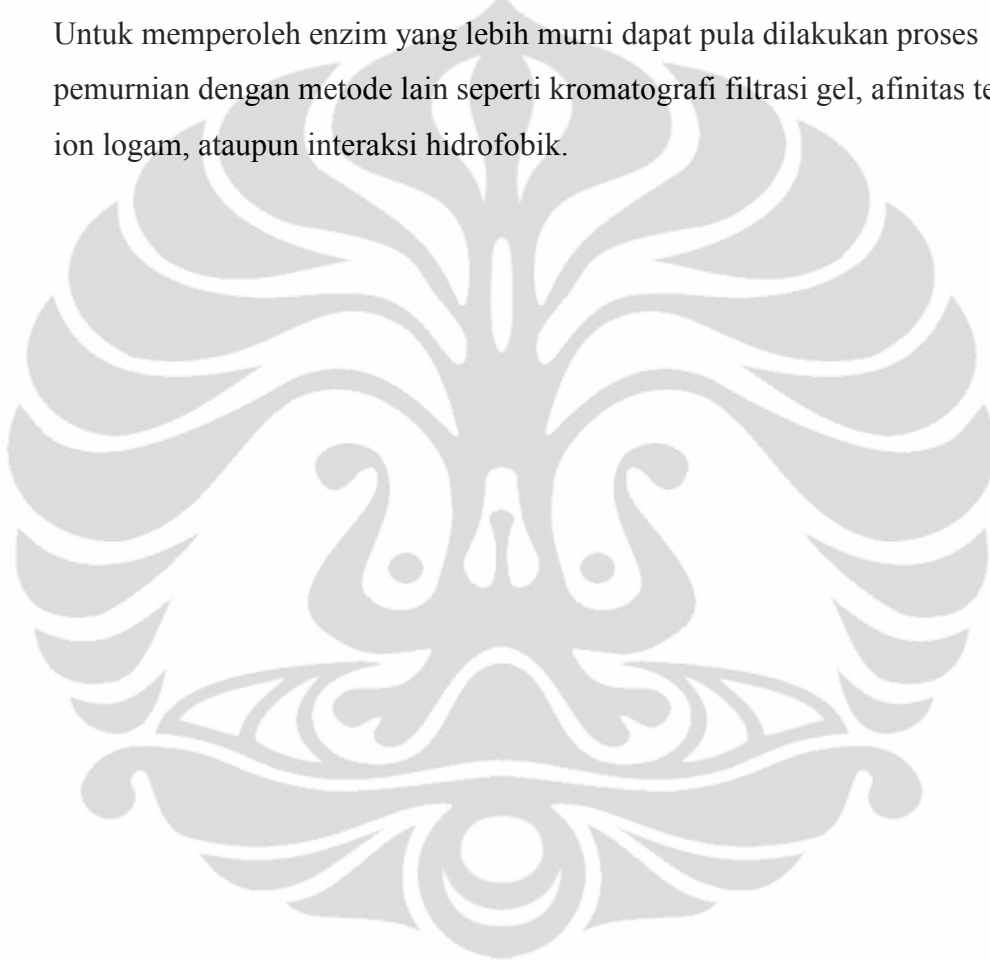
Pemurnian parsial yang dilakukan terhadap ekstrak kasar enzim selulase hasil fermentasi padat jamur *Trichoderma viride* (strain T051) dalam media dedak padi menghasilkan peningkatan kemurnian dimulai dari tahap fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat, dialisis, dan kromatografi kolom dengan peningkatan berturut-turut adalah 5,3 kali; 7,1 kali; 39,1 kali terhadap ekstrak kasar.

Pada fraksinasi bertingkat dengan garam ammonium sulfat diperoleh fraksi dengan aktivitas spesifik tertinggi (11,4530 mU/mg) yaitu pada kejenuhan 20-50%, dan setelah didialisis aktivitas spesifiknya menjadi 15,4033 mU/mg. Pemurnian lebih lanjut dengan kromatografi kolom penukar anion (DEAE-Streamline) menggunakan eluen buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,2 dan NaCl *stepwise* 0,25; 0,5; 1 M, menghasilkan 6 puncak fraksi dengan aktivitas selulase (P1, P2, P3, P4, P5, dan P6), dan aktivitas spesifik tertinggi dihasilkan pada fraksi pertama (P1), dengan aktivitas spesifik (dalam aktivitas CMC<sub>Case</sub>) sebesar 85,6703 mU/mg.

Hasil karakterisasi enzim selulase hasil pemurnian (P1) pH optimum 5,5 dan suhu inkubasi 50°C dalam aktivitas CMC<sub>Case</sub>. Sedangkan, dalam pengaruhnya terhadap ion logam dapat dilaporkan bahwa ion Mn<sup>2+</sup> dan Cu<sup>2+</sup> menghambat aktivitas CMC<sub>Case</sub> seiring dengan peningkatan konsentrasi ion logamnya (1-100 mM), dengan persen inhibisi berturut-turut adalah 64,2 % dan 60,8 % (dihitung pada konsentrasi ion logam 100 mM). Sedangkan, ion logam Mg<sup>2+</sup> cenderung memberikan pengaruh yang relatif kecil terhadap aktivitas CMC<sub>Case</sub> (endoglukanase), ditandai dengan persen inhibisi sebesar 16,4 % dalam konsentrasi ion logam 100 mM.

## 5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan karakterisasi enzim selulase berdasarkan faktor konsentrasi substrat, waktu inkubasi, penentuan berat molekul, atau parameter kinetiknya. Selain itu, dari enzim selulase ini perlu ditentukan aktivitas selulase dari komponen selulase yang lain seperti aviselase (menggunakan substrat avisel), dan  $\beta$ -glukosidase (menggunakan substrat pNPG). Untuk memperoleh enzim yang lebih murni dapat pula dilakukan proses pemurnian dengan metode lain seperti kromatografi filtrasi gel, afinitas terhadap ion logam, ataupun interaksi hidrofobik.



## DAFTAR REFERENSI

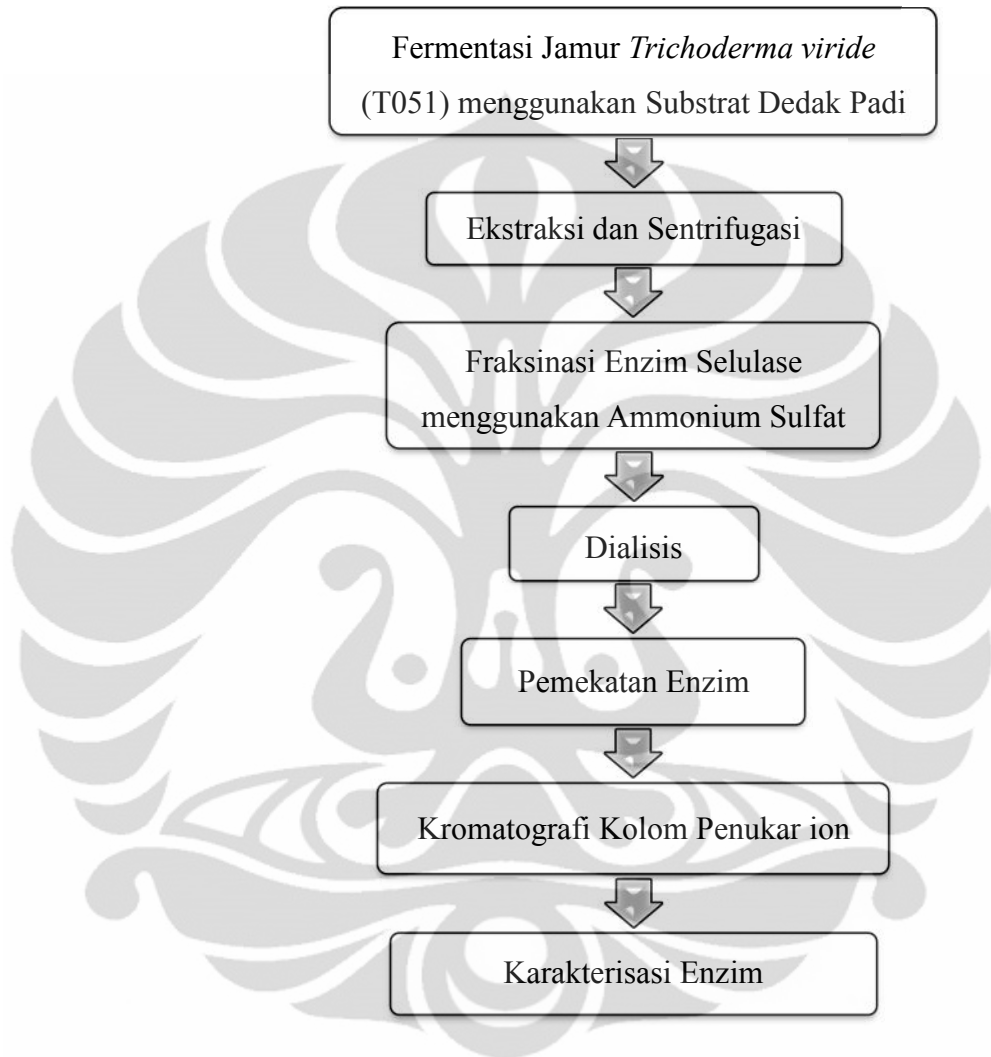
- Agustina, Ika. 2011. *Studi Awal Produksi Enzim Selulase oleh Trichoderma sp Strain T004 dan T051 Menggunakan Substrat Pelepah Sawit*. Depok: Universitas Indonesia.
- Boyer, Rodney F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. Redwood City, CA: Benjamin-Cummings Publishing.
- Badan Pusat Statistik. 2010. *Produksi Padi, Jagung, dan Kedelai (Angka Tetap Tahun 2009 dan Angka Ramalan II Tahun 2010)*. Jakarta: BPS.
- Chaplin, Martin. 2011. *Carboxymethylcellulose (CMC)*. <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycmc.html>, (20 Nov. 2011).
- Choi, W. Y., K.D. Haggett, dan N.W. Dunn. 1978. *Isolation of Cotton Wool Degrading Strain of Cellulomonas: Mutants with Altered Ability to Degrade Cotton Wool*. Aust. J. Biol. Sci. 31, 553-564.
- Deutscher, Murray P. 1990. *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology*. Vol. 182. California: Academic Press, Inc.
- Food and Agriculture Organization of United Nations. 2011. *Food and Agricultural Commodities Production, Top Production – Rice, Paddy – 2009*. FAOSTAT. <http://www.fao.org/corp/statistics/en/>, (20 Jul. 2011).
- Hudiyono PWS, Sumi. 1998. *Teori Dasar Enzim*. Depok: Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Indonesia.
- Hurst, Paul L., et al. 1977. *Purification and Properties of a Cellulase Aspergillus niger*. J. Biochem. 165, 33-41.
- Jessica. 2008. *Dialysis*. <http://ehumanbiofield.wikispaces.com/dialysis>, (2 Nov. 2011)
- Kavitha, S., et al. 2011. *Fermentative Production of Endoglucanase - Kinetics And Modeling*. International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST). 3(3), 1894-1898.
- Lee, See Young, dan Tae Lin Huh. 1981. *Cellulases of Trichoderma viride*. Korean Biochem. J. 1(1), 55-71.
- Lehninger, A. L. 1982. *Principles of Biochemistry*. (Diterjemahkan oleh Dr. Ir. Maggy, T., Dasar-dasar Biokimia. Jilid 1). Jakarta: Erlangga.

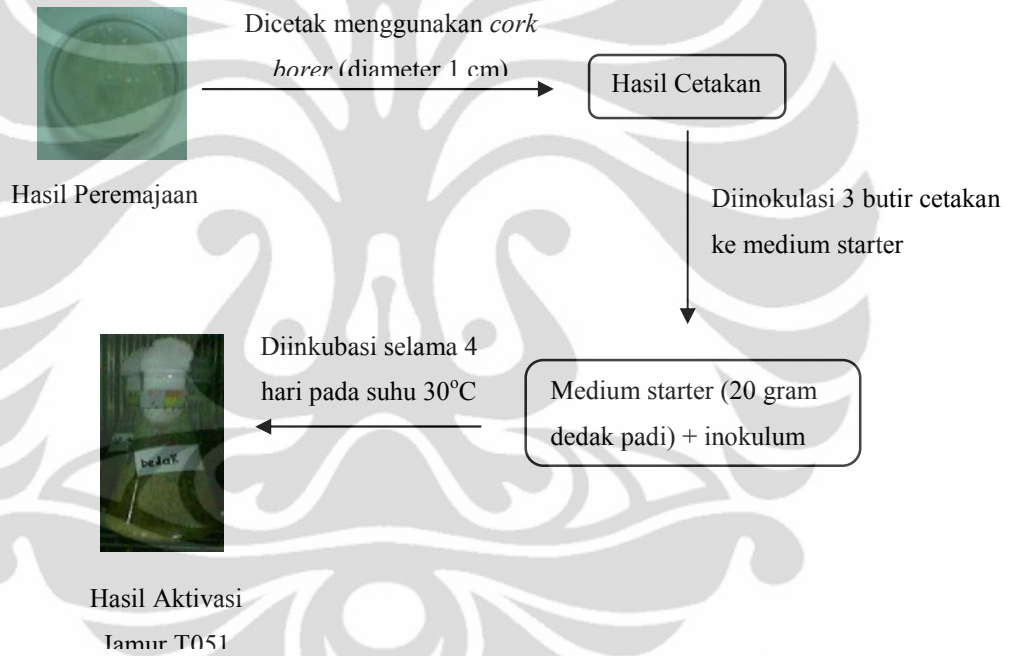
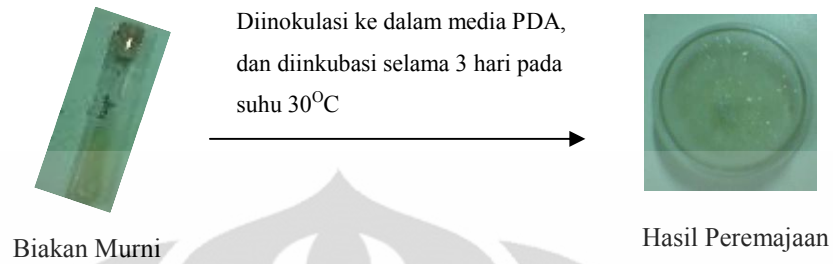
- Malherb, S., dan T.E. Cloete. 2002. *Lignocellulose Biodegradation: Fundamentals and Applications*. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 1(2), 105-114.
- Malik, Buddhadeb, *et al.* 2008. *Overview of Chromatography*.  
<http://www.currentprotocols.com/protocol>, (23 November 2011).
- Meriyandini, Anja, *et al.* 2009. *Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakteristik Enzimnya*. Makara Sains IPB. 13(1), 133-38.
- Milala, M.A., *et al.* 2005. *Studies on the Use of Agricultural Wastes for Cellulase Enzyme Production by *Aspegillus niger**. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 1(4), 325-328.
- Monica, Athitya D. N. 2007. *Studi Aktivitas Spesifik Selulase dari *Lactobacillus collinoides* yang Dimurnikan dengan Pengendapan Bertingkat Amonium Sulfat*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Mulyani, Hani, *et al.* 2011. *Karakterisasi Enzim Selulase *Trichoderma viride* T004 dari Filtrat Fermentasi Padat*. Prosiding Seminar Nasional Kimia Terapan Indonesia. Serpong: P2K LIPI. ISSN : 2008-9828.
- Nadia, H. Abd El-Nasser, *et al.* 2010. *Purification and Partial Characterization of Extracellular Cellulase Free Xylanase from *Streptomyces rochei**. Journal of Applied Sciences Research, 6(9), 1373-1378.
- National Agriculture Library, USDA, 2010. *Nutrient Value for Rice Bran*.  
<http://www.nal.usda.gov>, (3 Okt. 2011).
- Okada, G. 1975. *Enzymatic Studies on a Cellulase System of *Trichoderma viride* II. Purification and Properties of Two Cellulases*. J. Biochem. 77, 33-42.
- Ophardt, Charles E. 2003. *Cellulose*. Virtual ChemBook Elmhurst College.  
<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/547cellulose.html>, (5 Jul. 2011).
- Permatasari, Eka Kristi. 2010. *Jamur Kapang (*Trichoderma viride*) sebagai Bahan Pembuatan Bioetanol Alami (Studi Eksplorasi Sumber Daya Alam)*.  
<http://chrieztiey.blogspot.com/2010/06/jamur-kapang-trichoderma-viride-sebagai.html>, (27 Nov. 2011).
- Purwadaria, Tresnawati M.B., 1999. *Penggunaan Kromatograf. Tukar Ion DEAE-Sepharose CL-6B dalam Purifikasi Komponen Selulase Cellulomonas CSI-17*. Jurnal Mikrobiologi Indonesia. 4(1), 30-33.

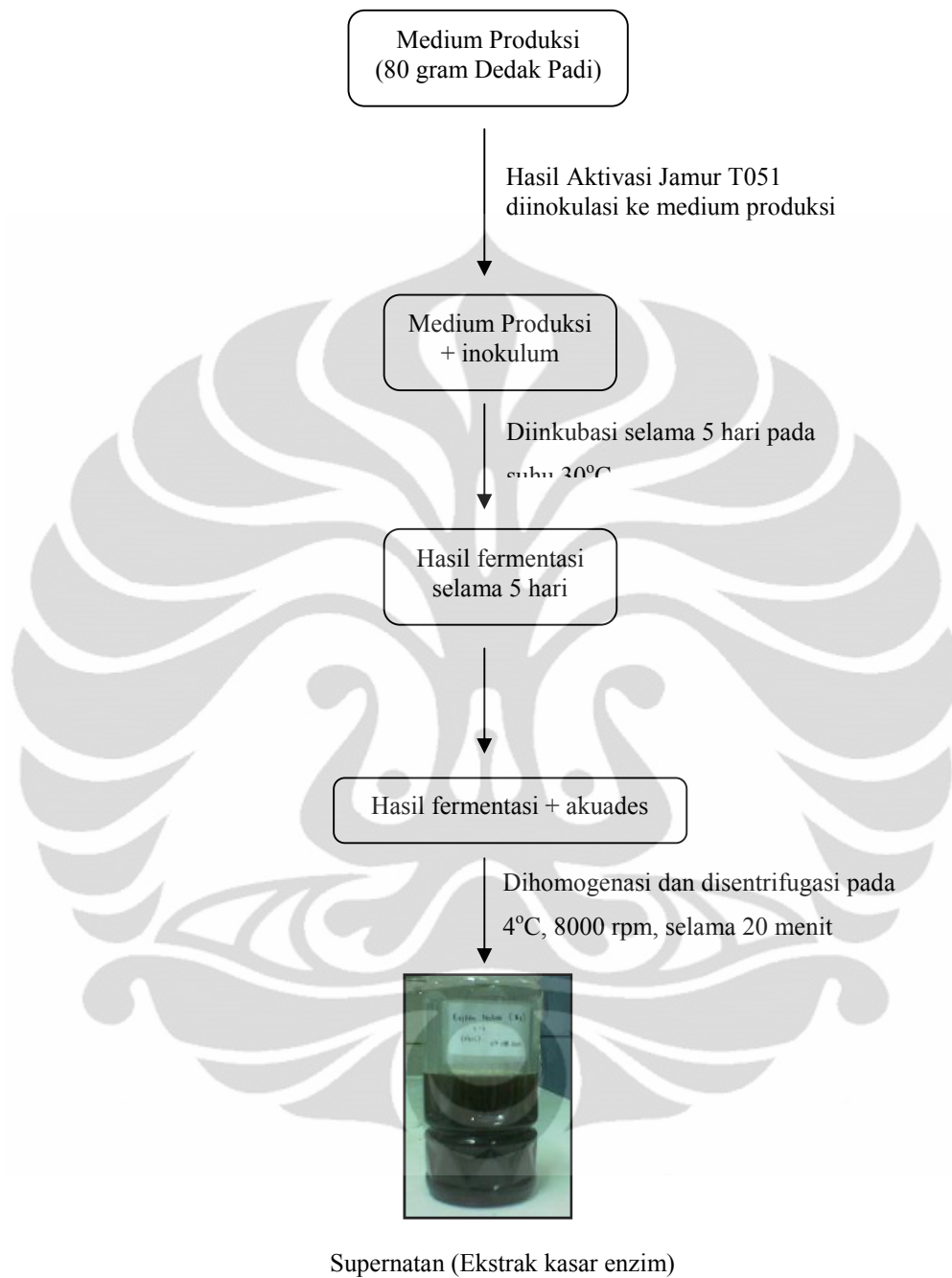
- Purwani, E.Y., D.S. Damardjati, dan R. Sarini. 1997. *Komposisi Serat Makanan Beberapa Fraksi Sosoh Beras*. Agritech. 17(3), 21-27.
- Rosita. 2008. *Produksi Etanol dari Onggok Menggunakan Ekstrak Kasar Enzim Alfa amilase, Glukoamilase dan Saccharomyces cerevisiae*. Tesis. Bandung: Program Studi Magister Bioteknologi SITH-ITB.
- Rubin, Edward M. 2008. *Genomics of Cellulosic Biofuels*. Nature. 454, 841-845. <http://www.nature.com/nature/journal.html>, (1 Des. 2011).
- Sami, Amtul Jamil. 1989. *Purification and Characterization of Microbial Cellulolytic Enzymes*. Thesis. Pakistan: Institute of Chemistry, University of The Punjab.
- Thenawijaya, Maggy. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan IPB.
- Wikipedia. 2011. *Cellulase*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cellulase>, (25 Okt. 2011).
- Wikipedia. 2011. *Trichoderma*. <http://id.wikipedia.org/wiki/Trichoderma>, (21 Okt. 2011).
- Wulani, Asri Martini. 2007. *Isolasi Enzim Selulase dari Fungi Trichoderma viride menggunakan Substrat Limbah Kulit Buah Jagung*. Depok: Universitas Indonesia.
- Wood, T.M. 1985. *Properties of Cellulolytic Enzyme Systems*. Biochem. Soc. Trans. 13, 407-410.
- Yamamoto, S., K. Nakanishi, dan R. Matsuno. 1988. *Ion Exchange Chromatography of Proteins*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Yanti. 2003. *Pemurnian dan Uji Fibrinolitik Fraksi Protease Murni dari Cacing Tanah Lumbricus rubellus Strain Lokal*. Tesis. Bogor: IPB.

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan Alur Kerja Penelitian

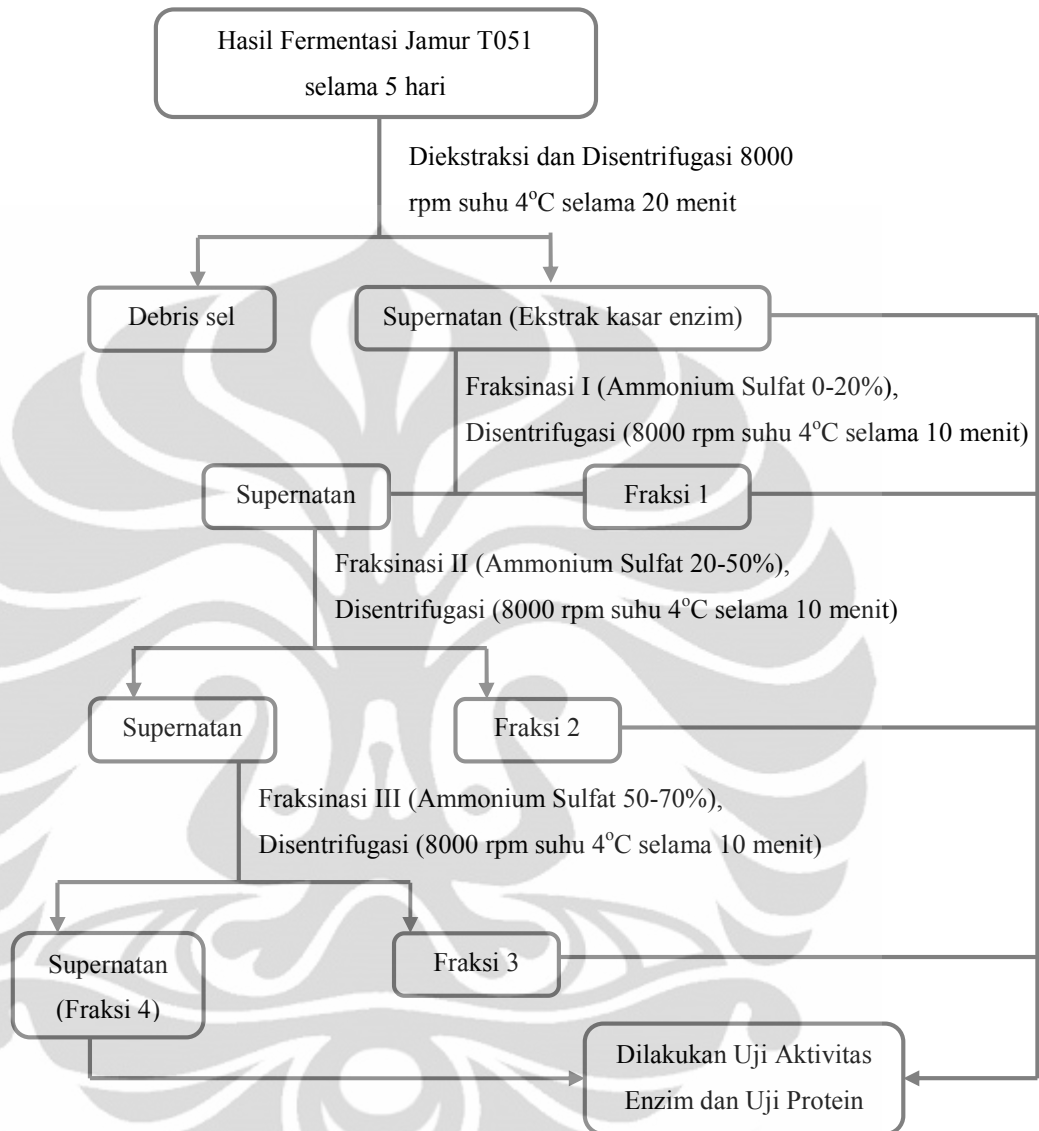








## Lampiran 3. Bagan Fraksinasi Enzim Menggunakan Ammonium Sulfat



#### Lampiran 4. Pembuatan Buffer

##### I. Pembuatan Buffer Asetat 0,2 M

A : Larutan asam asetat 0,2 M (11,5 mL larutan asam asetat glasial dalam 1000 mL)

B : Larutan Na-asetat 0,2 M (27,2 gram  $\text{CH}_3\text{COO-Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  dalam 1000 mL)

Mencampurkan larutan A dan B sesuai komposisi dengan pH yang diinginkan , dan dilarutkan hingga volume 100 mL (ditunjukkan pada **Tabel L.1**)

**Tabel L.1 Komposisi larutan A dan B pada pembuatan buffer asetat**

pH	A (mL)	B (mL)
3	48,9	1,1
4	41,0	9,0
4,5	29,5	20,5
5	14,8	35,2
5,5	6,3	43,7

[Sumber : Deutscher, 1990]

##### II. Pembuatan Buffer Fosfat 0,2 M

A : Larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M (27,8 gram  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dalam 1000 mL)

B : Larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M (53,65 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dalam 1000 mL)

Mencampurkan larutan A dan B sesuai komposisi dengan pH yang diinginkan , dan dilarutkan hingga volume 100 mL (ditunjukkan pada **Tabel L.2**)

**Tabel L.2 Komposisi larutan A dan B pada pembuatan buffer fosfat**

pH	A (mL)	B (mL)
6	43,8	6,2
6,5	34,2	6,5
7	19,5	30,5
8	2,7	47,3

[Sumber : Deutscher, 1990]

### III. Pembuatan Buffer Tris-HCl 0,05 M

A : Larutan Tris-(*hydroxymethyl*)-*aminomethane* 0,05 M (6,06 gram Tris-(*hydroxymethyl*)-*aminomethane* dalam 1000 mL)

B : Larutan HCl 0,05 M

50 mL larutan A + x mL larutan B (sesuai komposisi dengan pH yang diinginkan , dan dilarutkan hingga volume 200 mL, ditunjukkan pada **Tabel L.3**)

**Tabel L.3 Komposisi larutan B pada pembuatan buffer Tris-HCl**

pH	x (mL)
7,2	44,2
8,0	26,8
8,8	8,1
9,0	5,0

[Sumber : Deutscher, 1990]

## Lampiran 5. Data Kandungan Dedak Padi

**Tabel L.4 Data Kandungan Dedak Padi (per 100 gram)**

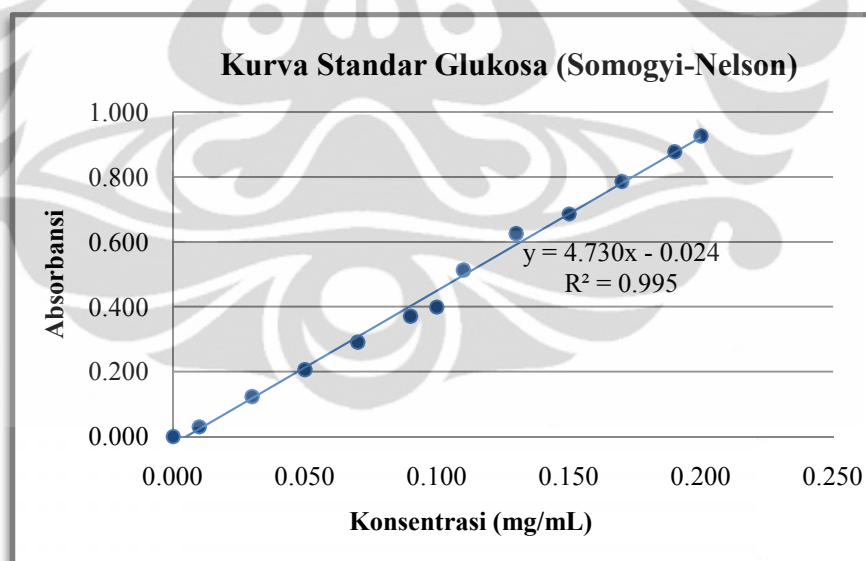
<b>Nutrien</b>	<b>Unit</b>	<b>Nilai per 100 gram</b>
<b>Umum</b>		
Air	g	6.13
Energi	kcal	316
Protein	g	13.35
Total Lipid	g	20.85
Karbohidrat	g	49.69
Abu	g	9.98
<b>Mineral</b>		
<i>Calcium, Ca</i>	mg	57
<i>Iron, Fe</i>	mg	18.54
<i>Magnesium, Mg</i>	mg	781
<i>Phosphorus, P</i>	mg	1677
<i>Potassium, K</i>	mg	1485
<i>Sodium, Na</i>	mg	5
<i>Zinc, Zn</i>	mg	6.04
<i>Copper, Cu</i>	mg	0.728
<i>Manganese, Mn</i>	mg	14.210
<i>Selenium, Se</i>	mcg	15.6
<b>Vitamin</b>		
Thiamin	mg	2.753
Riboflavin	mg	0.284
Niacin	mg	33.995
Pantothenic acid	mg	7.390
Vitamin B-6	mg	4.070
Vitamin E (alpha-tocopherol)	mg	4.92
Vitamin K (phylloquinone)	mcg	1.9
<b>Asam amino</b>		
Tryptophan	g	0.108
Threonine	g	0.555
Isoleucine	g	0.568
Leucine	g	1.022
Lysine	g	0.650
Methionine	g	0.306
Cystine	g	0.317
Phenylalanine	g	0.635
Tyrosine	g	0.411
Valine	g	0.881
Arginine	g	1.058
Histidine	g	0.355
Alanine	g	0.970
Aspartic acid	g	1.308
Glutamic acid	g	1.854
Glycine	g	0.875
Proline	g	0.668
Serine	g	0.662

[Sumber : *National Agriculture Library*, USDA, 2010]

## Lampiran 6. Data Standar Glukosa (Somogyi-Nelson)

Tabel L.5 Konsentrasi Standar Glukosa

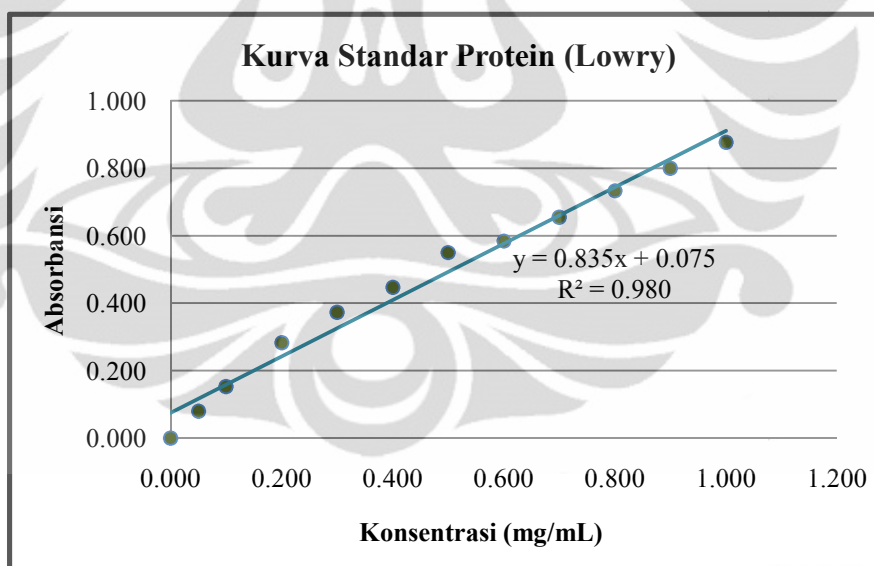
Konsentrasi Glukosa (mg/mL)	Absorbansi ( $\lambda_{520\text{nm}}$ )
0.000	0.000
0.010	0.031
0.030	0.123
0.050	0.206
0.070	0.291
0.090	0.371
0.100	0.400
0.110	0.513
0.130	0.625
0.150	0.687
0.170	0.786
0.190	0.878
0.200	0.926



## Lampiran 7. Data Standar Protein (Lowry)

**Tabel L.6 Konsentrasi Standar Protein BSA**

Konsentrasi BSA (mg/mL)	Absorbansi ( $\lambda_{650\text{nm}}$ )
0.000	0.000
0.050	0.080
0.100	0.153
0.200	0.283
0.300	0.373
0.400	0.447
0.500	0.551
0.600	0.585
0.700	0.655
0.800	0.734
0.900	0.800
1.000	0.877



## Lampiran 8. Data Aktivitas CMCCase pada Karakterisasi Enzim

**Tabel L.7 Aktivitas CMCCase (mU/mL) dalam variasi pH buffer**

Nilai	pH								
	3	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	8
<b>Aktivitas CMCCase (mU/mL)</b>	28.266	36.258	46.173	48.837	<b>50.909</b>	47.653	39.810	32.114	5.624

[Keterangan : Uji aktivitas dilakukan dalam variasi buffer : buffer asetat 0,2 M pH 3-5,5; dan buffer fosfat 0,2 M pH 6-8, Suhu inkubasi 45°C]

**Tabel L.8 Aktivitas CMCCase (mU/mL) dalam variasi suhu**

Nilai	Suhu (°C)								
	4	25	30	40	45	50	55	60	65
<b>Aktivitas CMCCase (mU/mL)</b>	0.888	13.763	14.503	47.801	50.909	<b>64.968</b>	52.537	36.998	24.271

[Keterangan : Uji aktivitas dilakukan dalam buffer asetat 0,2 M pH 5,5 (pH optimum), suhu inkubasi yang divariasikan]

**Tabel L.9 Aktivitas CMCCase (mU/mL) terhadap pengaruh ion logam**

Konsentrasi Ion Logam (mM)	Aktivitas CMCCase (mU/mL)		
	Ion Logam		
	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>
0	64,968	64,968	64,968
1	52.833	42.326	42.326
10	42.918	33.002	42.474
50	36.110	<b>43.805</b>	42.030
100	<b>23.235</b>	<b>54.313</b>	<b>25.455</b>

[Keterangan : Uji aktivitas dilakukan pada suhu inkubasi dan pH optimum (50°C dan pH 5,5)]

Lampiran 9. Data Glukosa dari Uji Aktivitas CMCase

**Tabel L.10 Glukosa dari Uji Aktivitas CMCase pada Tahap Pemurnian**

Larutan	Waktu inkubasi (menit)	Konsentrasi Glukosa (mg/mL)
Ekstrak kasar	0	0.8636
	30	0.9144
<i>Fraksinasi Enzim Dengan Ammonium Sulfat</i>		
Fraksi 1 (0-20%)	0	0.3023
	30	0.3362
Fraksi 2 (20-50%)	0	0.1718
	30	0.4355
Fraksi 3 (50-70%)	0	0.1919
	30	0.3932
Fraksi 4 (filtrat sisa)	0	0.1950
	30	0.2733
Dialisis	0	0.2082
	30	0.4905
<i>Kromatografi Kolom Penukar Anion (DEAE-Streamline)</i>		
P1	0	0.0740
	30	0.1438
P2	0	0.0626
	30	0.0668
P3	0	0.0717
	30	0.0624
P4	0	0.0490
	30	0.0433
P5	0	0.0501
	30	0.0535
P6	0	0.0338
	30	0.0444



Tabel L.11 Glukosa dari Uji Aktivitas CMC<sub>s</sub> pada Karakterisasi Enzim

Variasi Larutan	Waktu inkubasi (menit)	Konsentrasi Glukosa (mg/mL)	Variasi Larutan	Waktu inkubasi (menit)	Konsentrasi Glukosa (mg/mL)	Variasi Larutan	Waktu inkubasi (menit)	Konsentrasi Glukosa (mg/mL)	Variasi Larutan	Waktu inkubasi (menit)	Konsentrasi Glukosa (mg/mL)
Variasi pH			Variasi Suhu (°C)			Pengaruh Ion Logam			Pengaruh Ion Logam		
pH 3	0	0.0495	4	0	0.0816	MgSO <sub>4</sub> 1 mM	0	0.0607	MnCl <sub>2</sub> 50 mM	0	0.0395
	30	0.0899		30	0.0829		30	0.1211		30	0.0911
pH 4	0	0.0670	25	0	0.0835	MgSO <sub>4</sub> 10 mM	0	0.0636	MnCl <sub>2</sub> 100 mM	0	0.0421
	30	0.1188		30	0.1032		30	0.1108		30	0.0753
pH 4,5	0	0.0647	30	0	0.0822	MgSO <sub>4</sub> 50 mM	0	0.0666	CuCl <sub>2</sub> 1 mM	0	0.0882
	30	0.1307		30	0.1030		30	0.1292		30	0.1486
pH 5	0	0.0740	40	0	0.0628	MgSO <sub>4</sub> 100 mM	0	0.0501	CuCl <sub>2</sub> 10 mM	0	0.0770
	30	0.1438		30	0.1311		30	0.1277		30	0.1376
pH 5,5	0	0.0480	45	0	0.0480	MnCl <sub>2</sub> 1 mM	0	0.0763	CuCl <sub>2</sub> 50 mM	0	0.0780
	30	0.1207		30	0.1207		30	0.1518		30	0.1381
pH 6	0	0.0526	50	0	0.0474	MnCl <sub>2</sub> 10 mM	0	0.0556	CuCl <sub>2</sub> 100 mM	0	0.0886
	30	0.1207		30	0.1402		30	0.1169		30	0.1249
pH 6,5	0	0.0450	55	0	0.0448						
	30	0.1019		30	0.1199						
pH 7	0	0.0326	60	0	0.0533						
	30	0.0784		30	0.1061						
pH 8	0	0.0463	65	0	0.0385						
	30	0.0543		30	0.0732						



Ekstrak Kasar Enzim



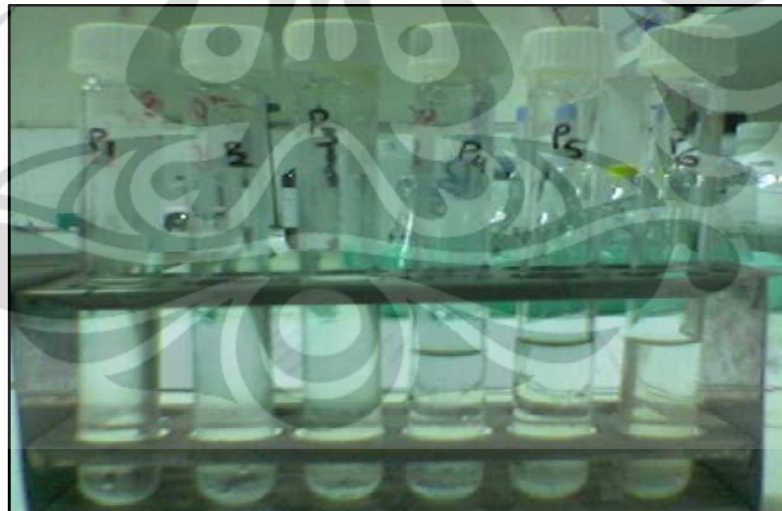
Fraksi 1  
(0-20%)

Fraksi 2  
(20-50%)

Fraksi 3  
(50-70%)

Fraksi 4  
(Filtrat Sisa)

Fraksi  
Dialisis



P1

P2

P3

P4

P5

P6



Spektrofotometer



Inkubator



Waterbath



Laminar air flow



Sistem Kromatografi Kolom Penukar Ion



Neraca analitis



Centrifuge



Autoclave



Freeze-dryer



Vortex



Hot plate



Magnetic stirrer