

**AMOBILISASI ENZIM SELULASE DARI JAMUR *Aspergillus niger* L-51
MENGUNAKAN ZEOLIT**

(Skripsi)

Oleh

SINTA DEWI OKTARIANI



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG**

2017

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF CELLULASE ENZYME FROM *Aspergillus niger* L-51 FUNGUS USING ZEOLITE

By

Sinta Dewi Oktariani

Cellulase is a complex enzyme that cuts gradually the cellulose chain into glucose. In many biotechnology applications, cellulase is used in the process of saccharification of cellulosic materials, detergents, food industry, and paper waste mill processing. The use of enzymes in industrial processes must satisfy certain conditions i.e enzymes must be stable at high temperatures and resistant in extreme pH conditions. Whereas, in general enzyme is only able to work on physiological conditions and not resistant to extreme conditions. The purpose of this study was to produce and isolate the cellulase enzyme from *Aspergillus niger* L-51 fungi which is then purified by fractionation and dialysis stage, then enhanced its stability through immobilization using zeolite. The specific activity of the purified cellulase enzyme increased 7 times higher than the crude extract enzyme. The crude extract enzyme has a specific activity of 5.3944 U/mg and the purified enzyme has a specific activity of 38.0292 U/mg. The optimum temperature of the purified enzyme was 50°C while the optimum temperature of the immobilized enzyme was at 75°C. The residual activity resulted in thermal stability test at temperature 50°C for 100 min against purification enzyme was 5% while the immobilization enzyme of was 23%. The kinetics data of the purified enzyme were $V_{\max} = 4.7400 \mu\text{mol/ mL/ min}$, $K_M = 1.9400 \text{ mg / mL}$, $k_i = 0,024 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 28.87 \text{ min}^{-1}$ and $\Delta G_i = 100.345 \text{ kJ/mol}$, while the immobilization enzyme were $V_{\max} = 1.4000 \mu\text{mol/mL/min}$, $K_M = 0.9900 \text{ mg/mL}$, $k_i = 0.013 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 53.30 \text{ min}^{-1}$, and $\Delta G_i = 102.175 \text{ kJ/mol}$. Based on the results of this study, it was concluded that the amobilization enzyme of using zeolite had an increase in half-life of 1.84 times compared to the purification enzyme.

Key Word : Cellulase, *Aspergillus niger* L-51, Immobilization, zeolite.

ABSTRAK

AMOBILISASI ENZIM SELULASE DARI *Aspergillus niger* L-51 MENGUNAKAN ZEOLIT

Oleh

Sinta Dewi Oktariani

Selulase adalah enzim kompleks yang memotong secara bertahap rantai selulosa menjadi glukosa. Dalam banyak aplikasi bioteknologi, selulase digunakan dalam proses sakarifikasi bahan berselulosa, deterjen, industri makanan, dan pengolahan limbah pabrik kertas. Penggunaan enzim dalam proses industri harus memenuhi syarat-syarat tertentu yaitu enzim harus stabil pada suhu tinggi dan tahan terhadap keadaan pH ekstrim. Sedangkan, pada umumnya enzim hanya mampu bekerja pada kondisi fisiologis dan tidak tahan terhadap kondisi ekstrim. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi dan mengisolasi enzim selulase dari jamur *Aspergillus niger* L-51 yang kemudian dimurnikan dengan tahap fraksinasi dan dialisis, lalu ditingkatkan stabilitasnya melalui amobilisasi menggunakan zeolit. Aktivitas spesifik enzim selulase hasil pemurnian meningkat 7 kali lipat dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim memiliki aktivitas spesifik sebesar 5,3944 U/mg dan enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas spesifik sebesar 38,0292 U/mg. Suhu optimum enzim hasil pemurnian pada suhu 50°C sedangkan suhu optimum enzim hasil amobilisasi pada suhu 75°C. Aktivitas sisa yang dihasilkan pada uji stabilitas termal pada suhu 50°C selama 100 menit terhadap enzim hasil pemurnian adalah sebesar 5% sedangkan terhadap enzim hasil amobilisasi sebesar 23%. Data kinetika enzim hasil pemurnian yaitu $V_{maks} = 4,7400 \mu\text{mol/mL/menit}$, $K_M = 1,9400 \text{ mg/mL}$, $k_i = 0,024 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 28,87 \text{ menit}^{-1}$ dan $\Delta G_i = 100,345 \text{ kJ/mol}$. Sedangkan untuk enzim hasil amobilisasi memiliki data kinetika enzim yaitu $V_{maks} = 1,4000 \mu\text{mol/mL/menit}$, $K_M = 0,9900 \text{ mg/mL}$, $k_i = 0,013 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 53,30 \text{ menit}^{-1}$, dan $\Delta G_i = 102,175 \text{ kJ/mol}$. Berdasarkan hasil penelitian ini, disimpulkan bahwa enzim hasil amobilisasi menggunakan zeolit mengalami peningkatan waktu paruh sebesar 1,84 kali dibandingkan enzim hasil pemurnian.

Kata Kunci : selulase, *Aspergillus niger* L-51, Amobilisasi, zeolit.

**AMOBILISASI ENZIM SELULASE DARI JAMUR *Aspergillus niger* L-51
MENGUNAKAN ZEOLIT**

Oleh

Sinta Dewi Oktariani

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2017**

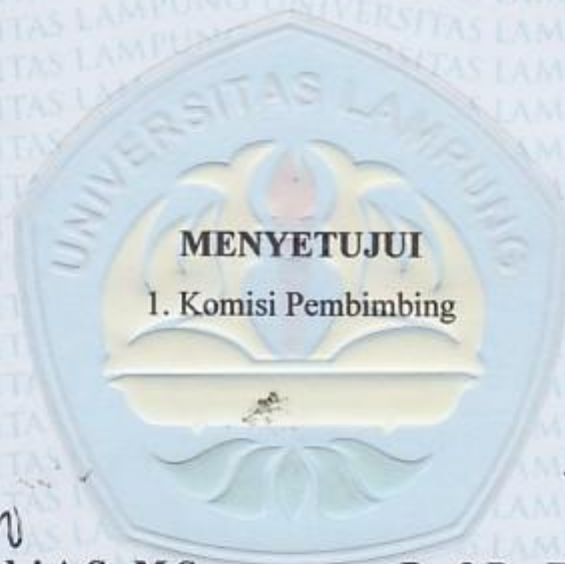
Judul Skripsi : **AMOBILISASI ENZIM SELULASE DARI
JAMUR *Aspergillus niger* L-51
MENGUNAKAN ZEOLIT**

Nama Mahasiswa : **Sinta Dewi Oktariani**

No. Pokok Mahasiswa : 1317011067

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.
NIP 19560905 199203 1 001

Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.
NIP 19540510 198803 2 001

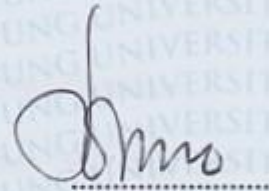
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T.
NIP 19740705 200003 1 001

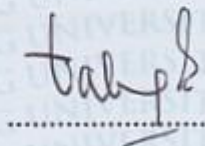
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**



Sekretaris : **Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.**



Penguji

Bukan Pembimbing : **Dr. Nurhasanah, M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D.

NIP. 19710212 199512 1 001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 27 Desember 2017

RIWAYAT HIDUP



Penulis dengan nama lengkap Sinta Dewi Oktariani, dilahirkan di Pagaram pada 22 Agustus 1995. Putri ke-4 dari 4 bersaudara ini merupakan buah hati dari pasangan Bapak Parjan dan Ibu Sumitri.

Penulis menyelesaikan Pendidikan Sekolah Dasar di SDN 13 Karang Dalo, Pagaram pada tahun 2007 dan melanjutkan Pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMPN 4 Pagaram hingga lulus pada tahun 2010, kemudian melanjutkan Pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMAN 4 Pagaram dan lulus pada tahun 2013. Pada tahun yang sama Penulis diterima di Perguruan Tinggi Negeri Universitas Lampung Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, melalui Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa di Universitas Lampung, Penulis pernah mendapatkan beasiswa BBP-PPA pada tahun 2014 dan 2015. Penulis juga aktif sebagai Asisten Praktikum Kimia Dasar Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian pada tahun 2015. Pada tahun 2016 Penulis menjadi Asisten Praktikum Biokimia Jurusan Kimia pada semester ganjil dan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian pada semester genap.

Penulis juga aktif di beberapa organisasi kampus. Pada tahun 2014 penulis menjadi Anggota Biro Akademik ROIS (Rohani Islam) FMIPA Unila dan Anggota Biro Usaha Mandiri HIMAKI (Himpunan Mahasiswa Kimia) FMIPA Unila. Pada tahun 2015-2016 Penulis menjabat sebagai Sekretaris Biro Akademik ROIS FMIPA Unila dan Anggota Biro Penerbitan HIMAKI FMIPA Unila. Pada tahun 2016 Penulis menjabat sebagai Wakil Bendahara Kabinet Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) Universitas Lampung Kabinet Kolaborasi Hebat.

Penulis melakukan Praktek Kerja Lapangan (PKL) pada tahun 2016 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengatahuan Alam Universitas Lampung. Ditempat yang sama Penulis melakukan dan menyelesaikan Penelitian pada tahun 2017.

MOTO HIDUP

“Sesungguhnya, setelah kesusahan itu ada kemudahan”

(Al-Insyrah : 6)

“Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu. Dan boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu, padahal ia amat buruk bagimu. Allah mengetahui, sedangkan kamu tidak mengetahui.”

(Al-baqarah : 216)

“Do what you love and love what you do”

(Sydney Sheldon)

“Sabar, Syukur, Sunggh-sungguh”

(Sinta Dewi O)

PERSEMBAHAN

Segala puji bagi Alla SWT yang telah memberikan segala nikmat yang takkan pernah dapat dihitng. Termasuk nikmat waktu dan kesempatan kepada penulis untuk dapat menyelesaikan study di Almamater tercinta Universitas Lampung. Shalawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada teladan terbaik sepanjang masa, Rasulullah Muhammad SAW beserta sahabat dan keluarga.

Kupersembahkan Karya kecilku ini kepada :

Orang Tuaku

Untuk kalian yang takkan pernah bisa tergantikan oleh siapapun, hanya untuk melihat senyum indah kalianlah semangat dan tekadku tak pernah surut. Terimakasih untuk peluh keringat kalian demi menyekolahkanku. Terimakasih untuk do'a disetiap waktu demi keberhasilanku. Terimakasih untuk kesabaran kalian dalam menjaga dan mendidiku. Terimakasih telah menjadi Umak dan Bak-ku.

Keluargaku

Untuk kalian yang selalu ada. Tanpa dukungan dan semangat dari kalian, aku takkan sampai sejauh ini. Terimakasih untuk do'a dan nasihat yang selalu mengingatkanku dikala lalai. Menjadi tempat mengadu ketika jenuh, dan menjadi tempat cerita ketika lelah.

Dosen dan Guruku

Darimana aku belajar huruf demi huruf, angka demi angka, dan ilmu demi ilmu kalau bukan dari kalian, dan kepada siapa terima kasihku terucap kalau bukan kepada kalian. Untukmu para guruku, Terima Kasih karena telah mendidiku.

Almamater Tercinta

Universitas Lampung

SANWACANA

Assalamu'alaikum wr. wb..

Alhamdulillah Rabbil'alamin, segala puji hanya milik Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat-Nya yang tak terhingga, hanya karena izin serta Rahmat-Nyalah Penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul :

AMOBILISASI ENZIM SELULASE DARI JAMUR *Aspergillus niger* L-51 MENGUNAKAN ZEOLIT

Shalawat serta Salam tak lupa selalu tercurahkan kepada Baginda Rasulullah Muhammad saw beserta keluarga dan sahabatnya, dan semoga kita semua mendapatkan syafaat dari beliau di hari akhir kelak. Aamiin Allahumma Ammiin.

Dalam menyelesaikan skripsi ini Penulis tidak luput dari bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, dalam kesempatan ini Penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada :

1. Prof. Dr. Ir. H. Yandri A. S., M. S., selaku Dosen Pembimbing Akademik sekaligus Pembimbing Utama penelitian yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, gagasan, arahan, bimbingan, bantuan, dukungan serta kritik dan saran sehingga Penulis dapat melakukan perencanaan dan pelaksanaan serta penulisan skripsi ini dengan baik.

2. Prof. Dr. Tati Suhartati, M. S., selaku Pembimbing II yang telah banyak memberikan semangat, arahan, bimbingan, serta kritik dan saran sehingga Penulis dapat melakukan penulisan skripsi ini dengan baik dan sesuai dengan tatanan kepenulisan.
3. Dr. Nurhasanah, M. Si., selaku Pembahas atas kesediaan memberikan arahan, koreksi, kritik dan saran sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
4. Bapak Prof. Warsito, S. Si., DEA., Ph. D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
5. Bapak Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M. T., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
6. Pak Jon Isman beserta Ibu Jon selaku Laboran Biokimia, serta semua laboran yang terlibat di Jurusan Kimia Fakultas matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Lampung.
7. Seluruh jajaran Staf Pengajar dan karyawan Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Kedua orang tuaku tercinta, Ayahanda **Parjan** dan Ibunda **Sumitri** yang selalu mencurahkan segala kasih sayangnya padaku. Terimakasih telah menjaga dan mendidikku hingga sekarang, atas segala pengorbanan dan cinta yang kalian berikan, atas nasihat dan do'a yang selalu mengiringi langkah kaki yang kupijakkan, dan segala hal yang telah kalian serahkan untukku. Terimakasih telah menjadi orang tuaku, tanpa kalian aku tak akan pernah berada disini.

9. Kakak dan Ayukku tersayang. Sarupini, Agus Setianto, Edi Irawan, Siti Mustika, Leni Susanti dan Ahmad Santoso yang tak lelah memberikan dukungan, semangat serta do'a untuk keberhasilanku.
10. Keponakan-keponakanku tersayang. Elpida, Tanzih, Bayu, Zulva, Aulia, Alfath, Syfa, Raisa dan cucu tercinta Zahra. Yang selalu menjadi pengobat penat hanya dengan mendengar suara atau memandang foto mereka.
11. Keluarga besarku yang tak dapat kusebutkan satu persatu, terimakasih atas semua dukungan baik moral maupun finansial serta do'a dan nasihat yang telah kalian berikan untukku.
12. Rekan-rekan *Yandri's Research* Ezra Riensky Tiarsa, Fathaniah Sejati, Maya Retna Sari, Khomsatun Hasanah, Fika Putri Aulia, Mia Permatasari, Sri Wahyuni, Mbak Putt, Mbak Tyraa, Mbak Fifi, Teh Didi, Bu Arrum Widyasmara, dan Mbak Surtini. Tempat bertukar pikiran, berbagi susah dan senang, siang ataupun malam. Berbagi kisah di Lab Biokimia bersama kalian itu hal yang takkan terlupa.
13. Rekan seperjuangan di Lab Biokima Monica Dhamayanti, Prasetyaningtyas Chakti (Aluna), Vynna Ayu RS, Melia Tri Anggraini, Ryan Wahyudi, Shelta Mei Inorisa, Mbak Aim, Mbak Meta, Kak Rizal, Kak Aziz, dan adik-adik angkatan 2014.
14. Keluarga besar Chemistry Thirteen (Chetir) yang jumlahnya hanya satu apapun yang terjadi. Terimakasih untuk kebersamaannya berbagi sepotong kisah senasib seterjerumus ke Jurusan Kimia bersama. See U on Top.

15. Sahabat sekaligus Saudari-saudariku. Fathaniah, Lindawati, dan Iness.

Terimakasih telah menerimaku disini kalian, mengajarku banyak hal, memberiku banyak canda dan tawa, selalu mengabaikan kekesalan kalian terhadapku, tak pernah lelah menyemangatiku, dan semua hal yang telah kalian berikan padaku. Maaf dan Terima kasih untuk kalian.

16. Keluarga kecil di tanah rantauku. Si Tante Imawati, Si dokter Dessy Nurlita, dan Si bungsu bawel Diah Yusika. Terimakasih telah jadi teman pertama dirantau, jadi saudara seperjuangan melawan ironi kosan, menemukanmu bagaikan hujan, apalah aku tanpa kalian.

17. Keluarga Home sweet home berbagai periode. Tante Imawati, Mbak Chacha, Mbak Desi, Yelly, Mbak Ismi, Mbak Murni, Urfina, Twin Nurul, Ayu Kts, Ririk, Nuriss Uyiss, Mami Shelta dan Mbak Hanum.

18. Seluruh Punggawa ROIS FMIPA Unila, terkhusus Leaders 2015-2016.

Jazakumullah khoyran katsir, dari sini aku lahir dan berkembang. Semoga Allah izinkan kita berjumpa di Jannah-Nya.

19. Keluarga besar BEM U KBM Unila Kabinet Kolaborasi Hebat. Terkhusus Kak Press (Ahmad Nur) dan Bu Wapress (Salma), Mbak Dii Sholihah, Bunda Lindul dan Teh Ika, Kak Anwer dan Mbak Ekap, Kak Donn-Kak Salam dan Mbak Taq, Kak Risiko Aljabungi dan Mbak Arraii, Kak Bay dan Citrul, Mbak Nintut dan *My Partner* Cille, Mbak Mae' dan Desro, Hapes dan Dina, Rahboy dan Gusboy. Terimakasih atas pengalaman yang luar biasa HEBAT, sampai jumpa di momen yang lebih HEBAT.

20. Tim Julit KKN Margo Mulyo. Kak Panca Tirta Yasa, Kak Ridwan PP, Kak Khairur Ichsan, Mbak Rahajeng Minanti, dan Rizki Arif Kesuma. Terkhusus untuk Pakde Suratno dan Bude Ngatini. Terimakasih sudah menularkan kejulitan kalian, semoga nanti kita dipertemukan lagi.

21. Keluarga besar SOHI13-ers. Terimakasih telah menjadi keluarga yang tak henti-hentinya saling mengingatkan dalam kebaikan, memberikan pelajaran-pelajaran yang tak akan kudapat dari tempat lain. Semoga Allah selalu menjaga ukhuwah kita sampai Jannah-Nya.

Dan semua pihak yang terlibat yang tak dapat disebutkan satu persatu, semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang telah mereka berikan untuk penulis, baik secara nyata ataupun dalam bentuk do'a. Penulis menyadari bahwa skripsi yang Penulis buat masih jauh dari kesempurnaan, namun semoga karya sederhana ini dapat memberikan kebermanfaatan bagi pembaca. Aamiin..

Bandar Lampung, Desember 2017
Penulis,

Sinta Dewi Oktariani

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian	4
C. Manfaat Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Enzim	6
1. Klasifikasi enzim	7
2. Sifat katalitik enzim.....	9
3. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim	9
4. Teori pembentukan enzim substrat	15
B. <i>Aspergillus niger</i>	16
C. Enzim selulase	19
D. Selulosa	23
E. Isolasi dan pemurnian enzim selulase	24
a. Sentrifugasi	25
b. Fraksinasi menggunakan ammonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	26
c. Dialisis	27
F. Pengujian aktivitas selulase dengan metode Mandels.....	28
G. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry	28
H. Kinetika reaksi enzim	29

I. Stabilitas enzim	30
1. Stabilitas termal enzim	31
2. Stabilitas pH enzim	32
J. Zeolit	33
K. Amobilisasi	35
1. Metode penjebakan	36
2. Metode pengikatan (adsorpsi) pada bahan pendukung	37
3. Metode ikatan silang	38
III. METODE PENELITIAN	39
A. Waktu dan tempat penelitian	39
B. Alat dan bahan	39
C. Prosedur Penelitian	40
1. Pembuatan media inokulum	40
2. Pembuatan media fermentasi	40
3. Isolasi enzim selulase	41
4. Pemurnian enzim selulase	41
5. Uji aktivitas enzim selulase metode <i>Mandels</i>	43
6. Penentuan kadar protein metode <i>Lowry</i>	44
7. Amobilisasi enzim selulase menggunakan zeolit	45
8. Karakterisasi enzim selulase	46
9. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivitas (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i)	47
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	50
A. Produksi dan Isolasi Enzim Selulase	50
B. Pemurnian Enzim Selulase	51
1. Fraksinasi bertingkat menggunakan ammonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	51
2. Dialisis	53
C. Penentuan pH Optimum Pengikatan Amobilisasi Enzim Selulase Menggunakan Zeolit	56
D. Karakterisasi Enzim Selulase dari <i>Aspergillus niger</i> L-51 Hasil Pemurnian dan Amobilisasi Menggunakan Zeolit	57

1. Penentuan suhu optimum enzim selulase hasil pemurnian dan enzim selulase hasil amobilisasi.....	57
2. Penentuan stabilitas termal enzim selulase hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	58
3. Penentuan K_M dan V_{maks} enzim selulase hasil pemurnian dan enzim selulase hasil amobilisasi	59
4. Pemakaian berulang enzim selulase.....	61
 E. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Amobilisasi	63
1. Waktu paruh ($t_{1/2}$) dan konstanta laju inaktivasi termal (k_i)	63
2. Perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i)	64
 V. KESIMPULAN DAN SARAN	65
A. Kesimpulan	65
B. Saran.....	66
 DAFTAR PUSTAKA	67

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Beberapa enzim yang dihasilkan mikroba dan aplikasinya	14
2. Sumber-sumber penghasil enzim selulase	22
3. Aktivitas dan kemurnian enzim selulase hasil isolasi dan hasil pemurnian dari jamur <i>Aspergillus niger</i> L-51	55
4. Nilai konstanta laju inaktivasi termal (k_i), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	63
5. Hubungan antara berbagai tingkat konsentrasi ammonium sulfat dengan aktivitas unit enzim selulase	73
6. Hubungan antara tingkat konsentrasi ammonium sulfat fraksi (0-10)% dan (10-90)% dengan aktivitas unit enzim selulase	73
7. Aktivitas Enzim Selulase pada berbagai pH pengikatan	73
8. Hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim selulase hasil pemurnian dan enzim selulase hasil amobilisasi	74
9. Hubungan antara aktivitas unit enzim selulase hasil pemurnian dan enzim selulase hasil amobilisasi selama inaktivasi termal 50°C	74
10. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim selulase hasil pemurnian berdasarkan persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	75
11. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim selulase hasil amobilisasi berdasarkan persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	75
12. Pemakaian berulang enzim selulase	75

13. Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi pada suhu 50°C	76
14. Absorbansi <i>bovine serum albumin</i> pada berbagai konsentrasi	79
15. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi	80

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu	10
2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH	10
3. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim	11
4. Teori kunci gembok dan teori induksi	16
5. <i>Aspergillus niger</i>	18
6. Mekanisme hidrolisis selulosa	20
7. Struktur selulosa	24
8. Diagram <i>Lineweaver - Burk</i>	30
9. Struktur umum zeolit	34
10. Skema proses fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat	42
11. Diagram alir penelitian	49
12. Hubungan antara berbagai tingkat konsentrasi ammonium sulfat dengan aktivitas unit enzim selulase	52
13. Hubungan antara tingkat konsentrasi ammonium sulfat fraksi (0-10)% dan (10-90)% dengan aktivitas unit enzim selulase	54
14. Aktivitas Enzim Selulase pada berbagai pH pengikatan	56
15. Suhu Optimum enzim selulase hasil pemurnian dan hasil amobilisasi	57
16. Hubungan antara stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi terhadap waktu	58

17. Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> enzim selulase hasil pemurnian dan hasil amobilisasi	61
18. Pemakaian berulang enzim selulase	62
19. Grafik $\ln (E_i/E_0)$ enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi	76
20. Kurva Standar BSA	79
21. Kurva Standar Glukosa	80

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Hubungan aktivitas enzim selulase dengan hasil pemurnian dan karakterisasi	73
Lampiran 2. Perhitungan ΔG_i dan $t_{1/2}$	77
Lampiran 3. Kurva Standar	79
Lampiran 4. Persamaan-persamaan	81

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Protein yang diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi kimia dengan tingkat spesifikasi dan peningkatan laju reaksi yang tinggi disebut dengan enzim (Richana, 2002; Beilen *and* Li, 2002). Kelebihan enzim dibandingkan katalis biasa adalah enzim bersifat spesifik dibandingkan dengan katalis anorganik, bekerja pada pH yang relatif netral dan suhu yang relatif rendah, aman, mudah dikontrol, dapat menggantikan bahan kimia yang berbahaya, serta dapat didegradasi secara biologis (Page, 1997). Hingga kini lebih dari 2000 enzim telah diisolasi, namun hanya 14 enzim yang telah diproduksi secara komersial. Kebanyakan dari enzim yang telah diproduksi secara komersial adalah enzim hidrolase seperti amilase, protease, pektinase, dan selulase. Saat ini, dari berbagai jenis enzim hidrolase yang telah diproduksi secara komersial, enzim selulase menempati 20% dari pasar enzim dunia (Bhat, 2000).

Dalam banyak aplikasi bioteknologi, selulase digunakan dalam proses sakarifikasi bahan berselulosa, deterjen, industri makanan, dan pengolahan limbah pabrik kertas (Busto *et al.*, 1995; Akiba *et al.*, 1995). Selulosa

merupakan karbohidrat yang banyak terdapat di alam terutama di dalam dinding sel pelindung tanaman. Bahan ini menjadi sasaran utama bagi banyak jenis bakteri dan jamur di dalam tanah dengan mengeluarkan enzim selulase untuk menguraikan selulosa menjadi glukosa. Enzim selulase mampu menguraikan selulosa dengan cara memutus ikatan β -1,4-glikosidik menghasilkan oligosakarida turunan selulosa untuk diubah menjadi glukosa (Umbreit, 1967; Kanti, 2005).

Mikroorganisme yang terlibat dalam penguraian selulosa beragam antara lain jamur, bakteri dan *actinomyces* (Indrawati dan Djajasupena, 2005).

Kemampuan jamur sebagai mikroba pendegradasi selulosa dan hemiselulosa lebih efektif dibandingkan bakteri. Selain itu, lingkungan Indonesia yang beriklim tropis merupakan tempat yang cocok untuk pertumbuhan jamur. Dari penelitian yang berkesinambungan ada beberapa jamur yang menghasilkan enzim selulase di antaranya adalah *Fusarium soloni*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Penicillium sp* dan *Trichoderma sp* (Dwidjoseputro, 1984; Suriawiria, 1986; Sudaryati dan Sastraatmadja, 1993). *A. niger* merupakan salah satu jenis jamur yang memiliki kemampuan tinggi dalam menghasilkan berbagai enzim yang berperan penting dalam bidang pangan ataupun bidang industri pertanian seperti selulase, amilase dan amiloglukosidase. Selain itu, *A. niger* memiliki kelebihan dibandingkan jenis jamur lainnya yaitu mampu menghasilkan enzim selulase dengan komponen β -glukosidase dalam jumlah tinggi.

A. niger adalah salah satu spesies dari genus *Aspergillus* yang biomasanya sering digunakan sebagai adsorben. *A. niger* dapat dibiakkan dengan baik

dalam media agar, ramah lingkungan, dan bernilai ekonomis. *A. niger* adalah salah satu jenis mikroorganisme yang berkemampuan baik dalam menghasilkan enzim. Beberapa jenis enzim yang penting penerapannya dalam bidang industri pertanian yang dapat dihasilkan oleh *A. niger* adalah amilase, selulase dan amiloglukosidase (Frazier *and* Westhoff, 1981).

Enzim merupakan biokatalis yang banyak digunakan dalam industri, karena enzim mempunyai tenaga katalitik yang luar biasa dan umumnya jauh lebih besar dibandingkan dengan katalisator sintetik. Penggunaan enzim dalam proses industri harus memenuhi syarat-syarat tertentu yaitu enzim harus stabil pada suhu tinggi yaitu di atas kondisi fisiologis dengan suhu $>50^{\circ}\text{C}$ (Gaman dan Sherrington, 1994) dan tahan terhadap keadaan pH ekstrim ($< \text{pH } 4,5$ dan $> \text{pH } 8$) (Williamson *and* Fieser, 1992). Sedangkan, pada umumnya enzim hanya mampu bekerja pada kondisi fisiologis dan tidak tahan terhadap kondisi ekstrim (Goddette *et al.*, 1993). Untuk mendapatkan enzim yang stabil dapat dilakukan dengan cara mengisolasi enzim dari mikroba yang hidup pada kondisi ekstrimofilik (Wagen, 1984) atau dengan melakukan amobilisasi, mutagenesis dan modifikasi kimia (Mozhaev *and* Martinek, 1984).

Amobilisasi enzim adalah proses menahan pergerakan molekul enzim pada tempat tertentu dalam suatu ruang reaksi kimia yang dikatalisisnya. Enzim amobil adalah suatu enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak (Winarno, 1986), penggunaan enzim amobil dalam industri memiliki beberapa kelebihan yaitu dapat digunakan berulang, dapat mengurangi biaya, produk tidak dipengaruhi oleh enzim, memudahkan pengendalian enzim, tahan

pada kondisi ekstrim, dapat digunakan untuk uji analisis, meningkatkan daya guna, dan memungkinkan proses sinambung (Payne *et al.*, 1992)

Pemanfaatan zeolit sebagai media pendukung amobilisasi sebelumnya telah dilakukan yaitu untuk amobilisasi enzim protease (Hasanah, 2016) dan terbukti dapat meningkatkan stabilitas enzim. Zeolit merupakan mineral alumina silikat terhidrat yang dapat mengikat molekul air secara reversibel. Penggunaan zeolit berkaitan dengan tiga sifat penting yang dimilikinya, yaitu: kemampuannya dalam melakukan pertukaran ion, daya serap dan daya saring molekuler, serta daya katalis. Pada penelitian ini dilakukan amobilisasi enzim selulase yang diisolasi dari jamur *A. niger* L-51 menggunakan zeolit sebagai media pendukung. Amobilisasi diharapkan dapat meningkatkan stabilitas enzim. Zeolit digunakan untuk mengikat enzim karena zeolit mempunyai pori-pori atau situs aktif yang memiliki kemampuan dalam mengadsorpsi (Sutarti dan Rachmawati, 1994).

B. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengisolasi ekstrak kasar enzim selulase dari jamur *Aspergillus niger* L-51 pada kondisi optimum sehingga diperoleh enzim yang memiliki aktivitas unit terbaik.
2. Memurnikan enzim selulase dari *Aspergillus niger* L-51 dengan metode fraksinasi dan dialisis.

3. Memperoleh enzim selulase dengan stabilitas tinggi melalui amobilisasi menggunakan zeolit.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi dan pengetahuan mengenai cara mengisolasi dan memurnikan enzim selulase dari jamur *Aspergillus niger* L-51.
2. Memberikan informasi dan pengetahuan mengenai cara untuk meningkatkan stabilitas enzim selulase dengan amobilisasi menggunakan zeolit, sehingga diperoleh aktivitas terbaik.
3. Meningkatkan keterampilan mahasiswa dalam bekerja di laboratorium yang melibatkan enzim.
4. Enzim selulase hasil amobilisasi dengan stabilitas yang tinggi dapat digunakan untuk berbagai keperluan, khususnya dalam bidang industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim merupakan katalisator protein yang mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologik (Suhartono dkk., 1992). Suatu enzim dapat mempercepat laju reaksi kira-kira 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang tidak dikatalisis (Poedjiadi, 1994). Molekul enzim biasanya berbentuk bulat (globular), sebagian terdiri atas satu rantai polipeptida dan sebagian lain terdiri dari lebih dari satu polipeptida (Wirahadikusumah, 1997) dan umumnya mempunyai berat molekul yang beraneka ragam berkisar 10^4 – 10^7 kDa (Dryer, 1993).

Enzim bekerja sangat spesifik dalam kerja katalitiknya, sehingga enzim dikatakan mempunyai sifat sangat khas karena hanya bekerja pada substrat tertentu dan bentuk reaksi tertentu. Kespesifikan ini disebabkan oleh bentuknya yang unik dan adanya gugus-gugus polar atau nonpolar dalam struktur enzim (Fessenden *and* Fessenden, 1992). Salah satu fungsi yang paling menonjol dari protein adalah aktivitas enzim. Enzim mempunyai fungsi khusus antara lain yaitu : (1) menurunkan energi aktivasi, (2) mempercepat reaksi pada suhu dan tekanan tetap tanpa mengubah besarnya tetapan seimbangnya, dan (3) mengendalikan reaksi (Page, 1997).

Kelebihan enzim dibandingkan katalis biasa adalah enzim bersifat spesifik dibandingkan dengan katalis anorganik, bekerja pada pH yang relatif netral dan suhu yang relatif rendah, aman, mudah dikontrol, dapat menggantikan bahan kimia yang berbahaya, serta dapat didegradasi secara biologis (Page, 1997). Enzim telah banyak digunakan dalam bidang industri pangan, farmasi dan industri kimia lainnya. Dalam bidang pangan misalnya amilase, glukosa-isomerase, papain dan bromelin. Sedangkan dalam bidang kesehatan contohnya amilase, lipase dan protease. Dalam banyak aplikasi bioteknologi, selulase digunakan dalam proses sakarifikasi bahan berselulosa, deterjen, industri makanan, dan pengolahan limbah pabrik kertas (Busto *et al.*, 1995; Akiba *et al.*, 1995). Enzim dapat diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Namun, secara umum enzim diisolasi dari mikroorganisme karena pertumbuhan mikroorganisme relatif lebih cepat sehingga enzim yang dihasilkan lebih banyak.

1. Klasifikasi enzim

Klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut :

- a. Menurut Wirahadikusumah (1997), berdasarkan fungsinya enzim dapat dibedakan menjadi enam kelas dan tiap kelas mempunyai beberapa subkelas. Dalam tiap subkelas, nama resmi dan nomor klasifikasi dari tiap enzim melukiskan reaksi yang dikatalisis berdasarkan IUPAC yaitu:
 1. Oksidoreduktase, mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi. Contoh :
NAD oksido reduktase (CEIUB); Alkohol dehidrogenase (Trivial)

2. Transferase, mengkatalisis perpindahan gugus molekul dari suatu molekul ke molekul yang lain, seperti gugus amino, karbonil, metal, asil, glikosil atau fosforil. Contoh : Glukosa-6-transferase (CEIUB); Glukokinase (trivial)
 3. Hidrolase, berperan dalam reaksi hidrolisis. Contoh : α -1-4-glukan-4- glukanohidrolase (CEIUB); α -amilase (trivial)
 4. Liase, mengkatalisis reaksi adisi atau pemecahan ikatan rangkap dua. Contoh: 2-Asam oksalokarboksi-liase (CEIUB); piruvat dekarboksilase (trivial)
 5. Isomerase, mengkatalisis reaksi isomerisasi. Contoh: Alanina rasemase (CEIUB); alanina rasemase (trivial)
 6. Ligase, mengkatalisis pembentukan ikatan dengan bantuan pemecahan ikatan dalam ATP. Contoh: Karbondioksida ligase (CEIUB); piruvat karboksilase (trivial)
- b. Menurut Lehninger (1982), klasifikasi enzim berdasarkan cara terbentuknya dibedakan menjadi dua, yaitu:
1. Enzim konstitutif, yaitu enzim yang jumlahnya dipengaruhi kadar substratnya, misalnya enzim amilase.
 2. Enzim adaptif, yaitu enzim yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat, contohnya enzim β -galaktosidase yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung laktosa.

c. Berdasarkan tempat bekerjanya enzim dibedakan menjadi dua, yaitu:

1. Endoenzim, disebut juga enzim intraseluler, yaitu enzim yang bekerja di dalam sel.
2. Eksoenzim, disebut juga enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang bekerja di luar sel.

2. Sifat Katalitik Enzim (Page, 1997)

Sifat-sifat katalitik dari enzim sebagai berikut :

- a. Enzim mampu meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu dan pH.
- b. Enzim berfungsi dengan selektivitas tinggi terhadap substrat (substansi yang mengalami perubahan kimia setelah bercampur dengan enzim) dan jenis reaksi yang dikatalisis.
- c. Enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang tinggi dibanding dengan katalis biasa.

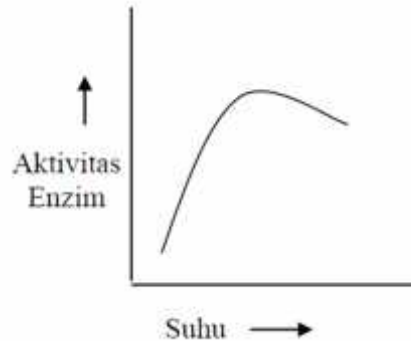
3. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim sebagai berikut :

a. Suhu

Enzim mempercepat terjadinya reaksi kimia pada suatu sel hidup. Dalam batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan naik bila suhunya naik. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell, 1987). Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan enzim terdenaturasi (Poedjiadi, 1994). Pada suhu 0°C enzim tidak aktif (tidak rusak) dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay dan Sugyo,

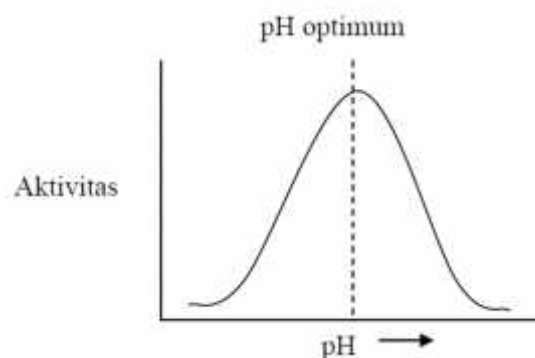
1992). Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu (Poedjiadi, 1994).

b. pH

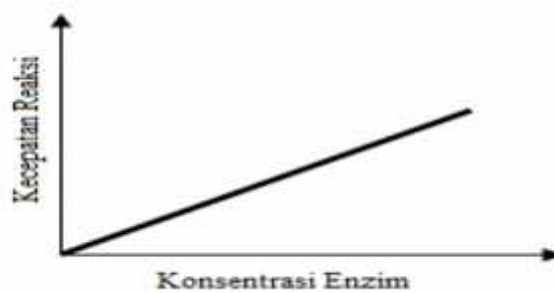
Enzim pada umumnya bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya, diperkirakan perubahan kereaktifan enzim akibat perubahan pH lingkungan (Winarno, 1986). Hubungan kecepatan reaksi dengan pH ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Page, 1997).

c. Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik dimana laju reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994). Laju reaksi tersebut meningkat secara linier selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada konsentrasi substrat. Hal ini biasanya terjadi pada kondisi fisiologis (Page, 1997). Hubungan antara laju reaksi enzim dengan konsentrasi enzim ditunjukkan dalam Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan antara laju reaksi dengan konsentrasi enzim (Page, 1997).

d. Konsentrasi substrat

Kecepatan reaksi enzimatik pada umumnya tergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat. Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi (Lehninger, 1982).

e. Aktivator dan inhibitor

Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi

enzimatis. Komponen kimia yang membentuk enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu atau Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 1984).

Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi atau kerja enzim dinamakan inhibitor. Hambatan yang dilakukan oleh inhibitor dapat berupa hambatan tidak reversibel atau hambatan reversibel. Hambatan tidak reversibel pada umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih yang terdapat pada molekul enzim. Enzim selulase sangat dihambat aktivitasnya oleh glukonolakton. Hambatan ini lebih besar dengan penggunaan selobiosa dan oligosakarida yang lebih rendah daripada dengan selulosa. Akibatnya, pemutusan awal selulosa lebih sedikit dipengaruhi daripada pemecahan secara lengkap menjadi glukosa.

Faktor lain yang mempengaruhi aktivitas selulase yaitu berupa ion logam. Beberapa ion logam dapat menghambat aktivitas enzim selulase (inhibitor) dan dapat meningkatkan aktivitas selulase (aktivator). Fowler M.W (1988) melaporkan bahwa adanya ion logam seperti Hg^{2+} , Fe^{2+} , dan Cu^{2+} akan menurunkan aktivitas enzim selulase sedangkan dengan adanya ion logam seperti Co^{2+} dan Ca^{2+} pada konsentrasi ≤ 1 mM dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase dari *Trichoderma harzianum*. Senyawa penghambat tersebut dapat menekan seluruh kecepatan hidrolisis dengan menghambat aksi sinergis eksoselulase dan endoselulase yang bekerja pada permukaan selulosa. Enzim digunakan dalam sebagian besar sektor industri, terutama industri makanan.

Selain itu, enzim juga digunakan dalam industri deterjen, farmasi, dan tekstil. Lebih dari 2000 enzim telah diisolasi, tetapi hanya 14 enzim yang diproduksi secara komersial. Kebanyakan dari enzim ini adalah hidrolase, misalnya amilase, protease, pektinase, dan selulase. Enzim penting lainnya adalah glukosa isomerase dan glukosa oksidase. Alasan digunakannya enzim dalam bidang perindustrian adalah enzim mempunyai kelebihan antara lain:

- Kemampuan katalitik yang tinggi, mencapai 10^9 - 10^{12} kali laju reaksi non-aktivitas enzim.
- Spesifikasi substrat yang tinggi.
- Reaksi dapat dilakukan pada kondisi yang lunak, yaitu pada tekanan dan temperatur rendah (Fowler, 1988).

Ada tiga sumber enzim, yaitu dari hewan, tumbuhan, dan sel mikroba. Dahulu hewan dan tumbuhan merupakan sumber enzim tradisional, namun dengan berkembangnya ilmu bioteknologi, masa depan terletak pada sistem mikrobial. Tak dapat dipungkiri bahwa sebagian besar sumber enzim dalam skala industri adalah mikroorganisme. Beberapa alasan digunakan mikroba adalah :

- Sistem produksi mikrobial dapat diperoleh di bawah kontrol tertutup.
- Level/tingkat enzim, sehingga produktivitas enzim dapat dimanipulasi secara lingkungan dan genetika.
- Metode pengayakan untuk sistem mikrobial cukup sederhana

Enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroba dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Beberapa enzim yang dihasilkan mikroba dan aplikasinya

Enzim	Sumber	Aplikasi
Amylase	<i>Bacillus subtilis</i>	Tekstil, pelarutan pati, produksi glukosa
	<i>Aspergillus oryzae</i>	
	<i>Penicillium roqueforti</i>	
	<i>Aspergillus niger</i>	
Penicillinase	<i>Bacillus subtilis</i>	Degradasi penisilin
Invertase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Pengurang viskositas, membantu sistem pencernaan
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Pektinase	<i>Aspergillus niger</i>	Klarifikasi wine dan jus buah
Protease	<i>Clostridium sp.</i>	Pelunak, membantu sistem pencernaan

Sumber : Fowler (1988)

Kebanyakan enzim mikroba yang digunakan secara komersial adalah ekstraseluler, enzim ini diproduksi dalam sel kemudian dikeluarkan atau berdifusi keluar sehingga memungkinkan untuk direcovery. Seleksi organisme produser adalah kunci dalam pengembangan proses sistem mikrobial. Berikut ini hal-hal yang perlu diperhatikan dalam memilih mikroorganisme :

- Sumber organisme stabil.
- Mudah tumbuh dan berkembang sehingga biaya produksi rendah.
- Produktivitas enzim tinggi.
- Tidak mengeluarkan racun

Dari semua hal tersebut, yang paling penting adalah stabilitas strain dan produktivitas enzim yang tinggi (Fowler, 1988).

4. Teori pembentukan enzim substrat

Menurut Shahib (2005) ada dua teori pembentukan kompleks enzim substrat yaitu teori *lock and key* dan teori *induced-fit* yang dapat diilustrasikan pada Gambar 4.

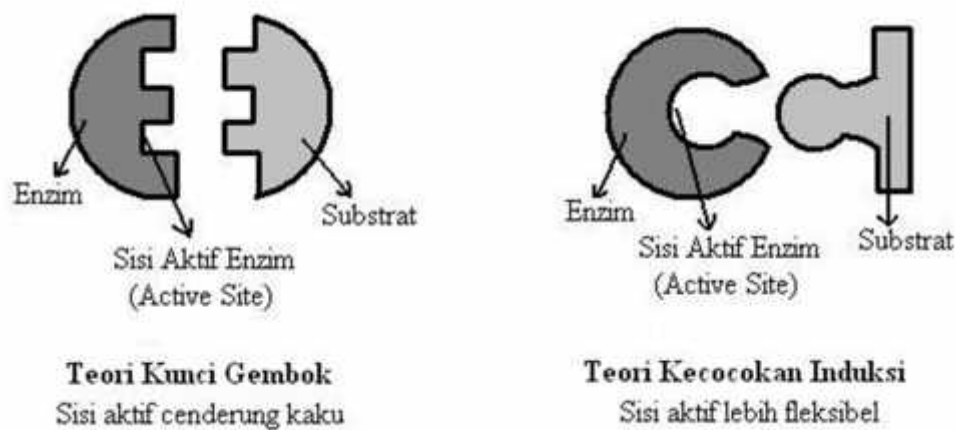
a. Teori *lock and key* (gembok dan kunci)

Substrat yang spesifik akan terikat pada daerah spesifik di molekul enzim yang disebut sisi aktif. Substrat mempunyai daerah polar dan non polar pada sisi aktif yang baik bentuk maupun muatannya merupakan pasangan substrat. Hal ini terjadi karena adanya rantai peptida yang mengandung rantai residu yang menuntun substrat untuk berinteraksi dengan residu katalitik. Ketika katalisis berlangsung, produk masih terikat pada molekul enzim. Kemudian produk akan bebas dari sisi aktif dengan terbebasnya enzim.

b. Teori *induced-fit* (ketepatan induksi)

Menurut Shahib (2005), teori ini menerangkan bahwa enzim bersifat fleksibel. Sebelumnya bentuk sisi aktif enzim tidak sesuai dengan bentuk substrat, tetapi setelah substrat menempel pada sisi aktif, maka enzim akan terinduksi dan menyesuaikan dengan bentuk substrat.

Teori *lock and key* dan teori *induced-fit* dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Teori kunci gembok dan teori induksi (Shahib, 2005).

B. *Aspergillus niger*

Kapang *Aspergillus niger* adalah mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim selulase. *A. niger* telah dikenal sebagai salah satu mikroorganisme yang memiliki kemampuan yang tinggi untuk menghasilkan berbagai enzim yang penting penerapannya dalam industri pangan seperti enzim selulase, amilase, dan amiloglukosidase. Kehidupan mikroskopik dalam tanah meliputi yeast, fungi, alga, diatom, dan protozoa. Jamur yang mendiami tanah terutama jamur tingkat rendah yaitu kapang. *A. niger* merupakan fungi dari *ascomycota* yang berfilamen, mempunyai hifa, bercabang-cabang dan bersekat, dan ditemukan melimpah di alam. Fungi diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan, dan udara di dalam ruangan. *A. niger* tumbuh optimum pada suhu 35-37°C, dengan suhu minimum 6-8°C dan suhu maksimum 45-47°C.

Proses pertumbuhan fungi ini adalah aerobik. *A. niger* memiliki warna dasar putih atau kuning dengan lapisan konidiospora yang tebal, berwarna coklat gelap. Selain itu, dalam proses pertumbuhannya fungi ini memerlukan

oksigen yang cukup (aerobik). Dalam metabolismenya *A. niger* banyak digunakan sebagai model fermentasi karena fungi ini tidak menghasilkan mikotoksin sehingga tidak membahayakan. *A. niger* dapat tumbuh dengan cepat, oleh karena itu banyak digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat, dan pembuatan enzim selulase (Dwidjoseputro, 1984).

Berikut ini adalah klasifikasi ilmiah *A. niger* (Dwidjoseputro, 1984)

- Domain : *Eukaryota*
- Kingdom : *Fungy*
- Filum : *Ascomycota*
- Kelas : *Eurotiomycetes*
- Ordo : *Eurotiales*
- Family : *Trichocomaceae*
- Genus : *Aspergillus*
- Spesies : *Aspergillus niger*

Koloninya berwarna putih pada agar dekstrosa kentang (PDA) 25°C dan berubah menjadi hitam ketika konidia dibentuk. Kepala konidia dari *A. niger* berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar seiring dengan bertambahnya umur (Rao, 1994). Gambar *A. niger* dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. *Aspergillus niger* (Dwidjoseputro, 1984).

Ciri-ciri umum dari *A. niger* antara lain (Indrawati, 2006):

- a. Warna konidia hitam kelam atau hitam kecoklatan dan berbentuk bulat.
- b. Bersifat termofilik, tidak terganggu pertumbuhannya karena adanya peningkatan suhu.
- c. Dapat hidup dalam kelembaban nisbi 80.
- d. Dapat menguraikan benzoat dengan hidroksilasi menggunakan enzim benzoat-4 hidroksilase menjadi 4-hidroksibenzoat.
- e. Memiliki enzim 4-hidroksibenzoat hidroksilase yang dapat menghidrolisa 4-hidroksibenzoat menjadi 3,4-dihidroksi benzoat.
- f. Natrium & formalin dapat menghambat pertumbuhan *A. niger*.
- g. Dapat hidup dalam spons (*spons Hyrtios Proteus*)
- h. Dapat merusak bahan pangan yang dikeringkan atau bahan makanan yang memiliki kadar garam tinggi.
- i. Dapat mengakumulasi asam sitrat.

C. Enzim Selulase

Selulase adalah enzim kompleks yang memotong secara bertahap rantai selulosa menjadi glukosa. Enzim selulase terbagi menjadi tiga tipe yakni (Ulhaq *et al.*, 2005):

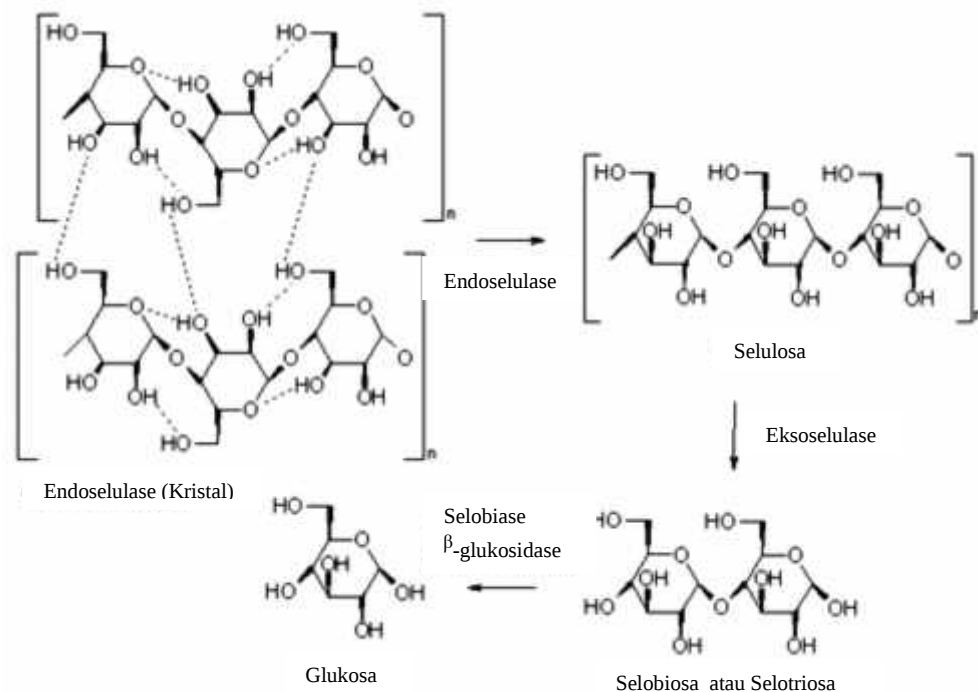
1. *Endo-1,4-5-D-glucanase (carboxymethyl cellulase/ EC.3.2.1.4)*, yang mengurai ikatan β secara random pada bagian selulosa yang amorph.
2. *Exo-1,4- β -D-glucanase (cellobiohydrolase/ EC.3.2.1.91)*, yang menghidrolisa *cellobiose* dari ujung pereduksi maupun non pereduksi dari bagian kristal selulosa.
3. *β -glucosidase (cellobiase/ EC.3.2.1.21)*, yang melepaskan *glukose* dari *cellobiose* dan *cellooligosakaride* rantai pendek.

Endo-1,4,5-glucanase, 1,4- β -D-glucan glucanohydrolase, CMCase, Cx: “random” memutus rantai pada selulosa dan menghasilkan glukosa dan oligosakarida. *Exo- β - glucanase, 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase, avicelase, C1* akan menghidrolisis selulosa dari sisi non reduksi, menghasilkan selobiosa sedangkan *β -glucosidase, cellobiase* akan menghidrolisis cellobiosa menjadi glukosa (Crueger *and* Crueger, 1984).

Ketiga enzim ini bekerja secara sinergis mendegradasi selulosa dan melepaskan gula reduksi (selobiosa dan glukosa) sebagai produk akhirnya. Enzim selulase akan memutuskan ikatan glikosidik α - 1,4 di dalam selulosa yang memiliki ikatan α -1,4 glikosidik pada polimer glukosanya sehingga menjadi gula sederhana turunannya.

Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase dapat dilihat dalam

Gambar 6 berikut :



Gambar 6. Mekanisme hidrolisis selulosa (Lee and Koo, 2001)

Selulase digunakan secara luas dalam industri tekstil, deterjen, pulp dan kertas. Selulase juga digunakan dalam pengolahan kopi dan kadang-kadang digunakan dalam industri farmasi sebagai zat untuk membantu sistem pencernaan. Selulase juga dimanfaatkan dalam proses fermentasi dari biomassa menjadi biofuel, seperti bioethanol. Saat ini, enzim selulase juga digunakan sebagai pengganti bahan kimia pada proses pembuatan alkohol dari bahan yang mengandung selulosa (Frazier and Westhoff, 1981).

Bioteknologi selulase dimulai pada awal 1980-an, dimulai selulase digunakan dalam industri pakan ternak dan kemudian diikuti penggunaannya dalam industri makanan. Secara bertahap, selanjutnya selulase digunakan dalam

industri tekstil, *laundry*, pulp dan kertas. Dalam industri tekstil, enzim selulase merupakan alat bagi pabrik untuk menghasilkan produk yang bernilai lebih tinggi, selulase digunakan untuk memperhalus permukaan kain dengan mencegah terbentuknya butiran-butiran dipermukaan kain. Dalam industri denim, selulase digunakan untuk proses biostoning. Industri detergent menggunakan selulase untuk membersihkan dan mempercerah kain katun. Industri pakan ternak menggunakan selulase bersama dengan enzim hidrolase yang lain untuk mendegradasi polisakarida nonpati guna meningkatkan laju konversi pakan. Industri makanan menggunakan selulase bersama dengan enzim pendegradasi dinding sel yang lain dalam proses pengolahan buah dan sayuran. Dalam industri pulp dan kertas, selulase digunakan dalam proses deinking (Oinonen, 2004; Sukumaran *et al.*, 2005; Ali dan Saad 2008; Wirawan dkk., 2008). Selain berbagai area aplikasi enzim selulase tersebut, area aplikasi enzim selulase yang kini mendapat perhatian besar adalah aplikasi enzim selulase dalam proses hidrolisa selulosa untuk produksi etanol.

Sumber-sumber enzim selulase

Selulase dapat diproduksi oleh fungi, bakteri, dan ruminansia. Produksi enzim secara komersial biasanya menggunakan fungi atau bakteri. Fungi yang bisa menghasilkan selulase antara lain dari genus *Tricoderma*, *Aspergillus*, dan *Penicillium*, sementara bakteri penghasil selulase antara lain *Acidothermus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* dan *Rhodothermus* (Tabel 2) (Sukumaran *et al.*, 2005).

Tabel 2. Sumber-sumber penghasil enzim selulase

Kelompok	Mikroorganisme	
	Genus	Spesies
Fungi	Aspergillus	<i>A. niger</i>
		<i>A. nidulans</i>
		<i>A. oryzae</i>
	Fusarium	<i>F. solani</i>
		<i>F. oxysporum</i>
	Humicola	<i>H. insolens</i>
		<i>H. grisea</i>
	Penicillium	<i>P. brasilianum</i>
		<i>P. occitanis</i>
		<i>P. decumbans</i>
	Trichodema	<i>T. reesei</i>
		<i>T. longibrachiatum</i>
		<i>T. harzianum</i>
Bakteri	Achidothermus	<i>A. cellulolyticus</i>
	Bacillus	<i>Bacillus sp</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>
	Clostridium	<i>C. acetobutylicum</i>
		<i>C. thermocellum</i>
	Pseudomonas	<i>P. cellulose</i>
		<i>P. marinus</i>
Actinomycetes	Cellulomonas	<i>C. fimi</i>
		<i>C. bioazoeta</i>
		<i>C. uda</i>
	Streptomyces	<i>S. drozdowiczii</i>
		<i>S. lividans</i>
	Thermonospora	<i>T. fusca</i>
		<i>T. curvata</i>

Sumber : Sukumaran et al. (2005)

D. Selulosa

Selulosa merupakan senyawa organik yang paling melimpah di bumi, diperkirakan sekitar 10^{11} ton selulosa dibiosintesis per tahun (Fessenden *and* Fessenden, 1992). Selulosa merupakan polisakarida yang terdiri atas satuan-satuan glukosa yang terikat dengan ikatan β -1,4-glikosidik. Molekul selulosa merupakan mikrofibril dari glukosa yang terikat satu dengan lainnya membentuk rantai polimer yang sangat panjang (Fan *et al.*, 1982).

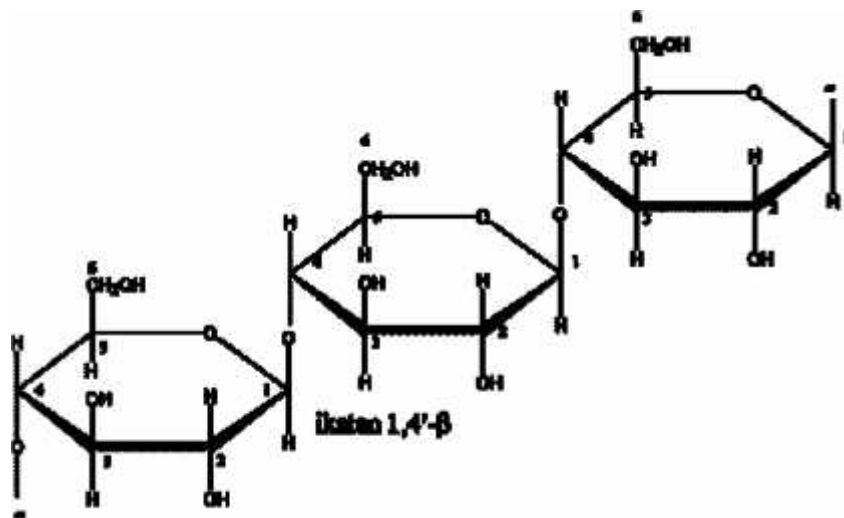
Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan asam atau enzim. Hidrolisis menggunakan asam biasanya dilakukan pada temperatur tinggi. Proses ini relatif mahal karena kebutuhan energi yang cukup tinggi. Pada tahun 1980-an, mulai dikembangkan hidrolisis selulosa dengan menggunakan enzim selulase (Gokhan *et al.*, 2002).

Mikroorganisme pendegradasi selulosa antara lain jamur (aerobik) dan bakteri (anaerobik). Jamur adalah mikroorganisme utama yang dapat memproduksi enzim selulase, meskipun beberapa bakteri dan *actinomycetes* juga dapat menghasilkan aktivitas selulase. Berbagai jenis jamur aerobik seperti *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Neurospora crassa* dan *Phanerochaet chrysosporium* mampu mendegradasi selulosa dengan memproduksi enzim selulase (Damerco *et al.*, 2003).

Berdasarkan strukturnya, selulosa dapat saja diharapkan mempunyai kelarutan yang tinggi dalam air, akan tetapi dalam kenyataannya selulosa tidak larut dalam air, bahkan pelarut lainnya. Hal ini disebabkan oleh

tingginya rigiditas rantai dan gaya rantai akibat ikatan hidrogen antara gugus $-OH$ pada rantai berdekatan. Faktor ini dipandang sebagai penyebab tingginya kekristalan dari serat selulosa (Cowd, 1991).

Adapun struktur selulosa dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur selulosa (Fessenden *and* Fessenden, 1992).

E. Isolasi dan Pemurnian Enzim Selulase

Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh mikroba selulolitik. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang diproduksi di dalam sel namun bekerja di luar sel, sehingga mudah diisolasi dan dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar *and* Chan, 1986). Berikut metode-metode pemurnian enzim :

a. Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan metode yang dapat digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan enzim terlarut dalam bentuk filtrat yang jernih dan sisa-sisa sel lain serta pengotor dalam bentuk endapan yang terikat kuat pada dasar tabung. Sel-sel mikroba biasanya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit (Scopes, 1982; Walsh *and* Headon, 1994).

Prinsip sentrifugasi berdasarkan pada kenyataan bahwa setiap partikel yang berputar pada laju sudut yang konstan akan memperoleh gaya keluar (F). Besar gaya ini bergantung pada laju sudut ω (radian/detik) dan radius pertukarannya (sentimeter).

$$F = \omega^2 r$$

Gaya F dipengaruhi oleh gaya gravitasi bumi, karena itu dinyatakan sebagai gaya sentrifugal relatif (RCF dengan satuan g (gravitasi)).

$$RCF = \frac{F}{980}$$

Dalam praktiknya, alat sentrifugasi dioperasikan dengan laju rpm. Oleh sebab itu, harga rpm dikonversikan kedalam bentuk radian menggunakan persamaan :

$$\omega = \frac{\pi(rpm)}{30}$$

$$RCF = (\pi rpm)^2 r \times \frac{980}{30.30}$$

$$RCF = (1.119 \times 10^{-5})(rpm)^2 r \quad (\text{Cooper, 1997}).$$

b. Fraksinasi menggunakan ammonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

Fraksinasi merupakan proses pengendapan protein atau enzim dengan penambahan senyawa elektrolit seperti garam ammonium sulfat, natrium klorida atau natrium sulfat. Menurut Suhartono dkk. (1992), penambahan senyawa elektrolit ke dalam larutan yang mengandung protein dapat menyebabkan terjadinya proses pengendapan protein. Proses pengendapan protein tersebut dipengaruhi oleh kekuatan ion dalam larutan. Dengan meningkatnya kekuatan ion, kelarutan enzim akan semakin besar atau disebut dengan peristiwa *salting in*, setelah mencapai suatu titik tertentu, kandungan garam yang semakin tinggi akan menyebabkan kelarutan protein semakin menurun dan terjadi proses pengendapan protein. Peristiwa pengendapan protein ini disebut *salting out* (Wirahadikusumah, 1997). Pada kekuatan ion rendah, protein akan terionisasi sehingga interaksi antar protein akan menurun dan kelarutan akan meningkat. Peningkatan kekuatan ion ini meningkatkan kadar air yang terikat pada ion, dan jika interaksi antar ion kuat, kelarutannya menurun akibatnya interaksi antar protein lebih kuat dan kelarutannya menurun.

Senyawa elektrolit yang sering digunakan untuk mengendapkan protein ialah ammonium sulfat. Kelebihan ammonium sulfat dengan dibandingkan dengan senyawa-senyawa elektrolit lain ialah memiliki kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai daya pengendap yang efektif, efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, dapat digunakan pada berbagai pH dan harganya murah (Scopes, 1982).

c. Dialisis

Dialisis merupakan metode yang digunakan untuk memurnikan larutan protein atau enzim yang mengandung garam setelah proses fraksinasi berdasarkan pada sifat semipermeabel membran. Proses dialisis dilakukan dengan memasukkan larutan enzim ke dalam kantung dialisis yang terbuat dari membran semipermeabel (selofan). Selanjutnya, kantung yang berisi larutan protein atau enzim dimasukkan ke dalam larutan *buffer* sambil diputar-putar. Selama proses tersebut, molekul kecil yang ada di dalam larutan protein atau enzim seperti garam anorganik akan keluar melewati pori-pori membran, sedangkan molekul protein atau enzim yang berukuran besar tetap tertahan dalam kantung dialisis. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantung dialisis tidak seimbang.

Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan *buffer* dengan konsentrasi rendah di luar kantung dialisis (Lehninger, 1982). Setelah tercapai keseimbangan, larutan di luar kantung dialisis diganti dengan larutan yang baru agar konsentrasi ion-ion di dalam kantung dialisis dapat dikurangi. Proses ini dapat dilakukan secara terus menerus sampai ion-ion di dalam kantung dialisis dapat diabaikan (Boyer, 1993). Difusi zat terlarut bergantung pada suhu dan viskositas larutan. Meskipun suhu tinggi dapat meningkatkan laju difusi, namun sebagian besar protein dan enzim stabil pada suhu 4-8°C sehingga dialisis harus dilakukan di dalam ruang dingin (Pohl, 1990).

F. Pengujian Aktivitas Selulase dengan Metode Mandels

Pengujian aktivitas selulase dilakukan dengan metode Mandels (Mandels *et al.*, 1976), yaitu berdasarkan pembentukan glukosa dari substrat *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) oleh enzim selulase yang dideteksi dengan penambahan pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*) ke dalam larutan uji serta proses pemanasan, sehingga akan dihasilkan larutan berwarna kuning hingga merah pekat. Semakin pekat warna larutan sampel dibandingkan larutan kontrol, maka semakin tinggi aktivitasnya .

G. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada setiap fraksi pemurnian (tidak hilang dalam proses pemurnian) dengan aktivitas yang baik. Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Metode ini bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) yang akan membentuk kompleks dengan protein. Ketika reagen *folin-ciocelteau* ditambahkan, maka reagen akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen *folin* menjadi heteromolibdenum dan mengubah warna kuning menjadi biru.

Pada metode ini, pengujian kadar protein didasarkan pada pembentukan kompleks Cu^{2+} dengan ikatan peptida yang akan tereduksi menjadi Cu^{+} pada kondisi basa. Cu^{+} dan rantai samping tirosin, triptofan, dan sistein akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocelteau*. Reagen ini bereaksi menghasilkan produk yang tidak stabil yang tereduksi secara lambat menjadi molybdenum

atau *tungsteen blue*. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya.

Metode ini relatif sederhana dan dapat diandalkan serta biayanya relatif murah. Namun, kekurangan dari metode ini adalah sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk mengatasi hal tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan volume sampel dalam jumlah kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).

H. Kinetika Reaksi Enzim

Parameter dalam kinetika reaksi enzim adalah konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}). Berdasarkan postulat Michaelis dan Menten pada suatu reaksi enzimatik terdiri dari beberapa fase yaitu pembentukan kompleks enzim substrat (ES), dengan E adalah enzim dan S adalah substrat, modifikasi dari substrat membentuk produk (P) yang masih terikat dengan enzim (EP), dan pelepasan produk dari molekul enzim (Shahib, 2005).

Setiap enzim memiliki sifat dan karakteristik yang spesifik seperti yang ditunjukkan pada sifat spesifisitas interaksi enzim terhadap substrat yang dinyatakan dengan nilai tetapan Michaelis-Menten (K_M). Nilai K_M didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah kecepatan maksimum. Setiap enzim memiliki nilai K_M dan V_{maks} yang khas dengan substrat spesifik pada suhu dan pH tertentu (Kamelia dkk., 2005). Nilai K_M yang kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim-substrat sangat mantap dengan afinitas tinggi terhadap substrat,

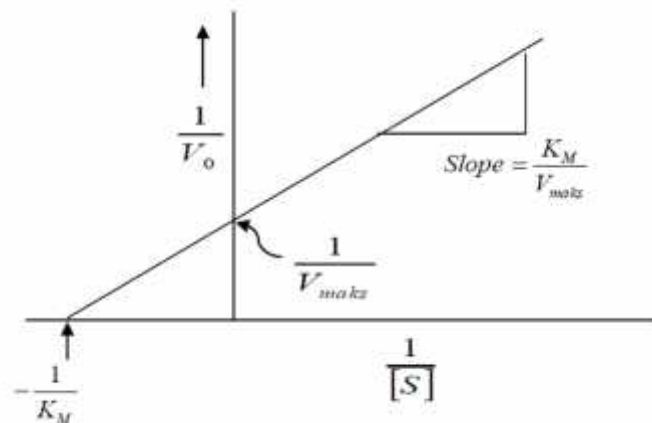
sedangkan jika nilai K_M suatu enzim besar maka enzim tersebut memiliki afinitas rendah terhadap substrat (Page, 1997).

Nilai K_M suatu enzim dapat dihitung dengan persamaan *Lineweaver-Burk* yang diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten yang kemudian dihasilkan suatu diagram *Lineweaver-Burk* yang ditunjukkan Gambar 8 (Page, 1997).

$$V_o = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]} \longrightarrow \text{Persamaan Michaelis-Menten}$$

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M + [S]}{V_{maks} [S]}$$

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \longrightarrow \text{Persamaan Lineweaver-Burk}$$



Gambar 8. Diagram *Lineweaver-Burk* (Suhartono, 1992).

I. Stabilitas Enzim

Menurut Kazan *et al.* (1997), stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti

pelarut tertentu (asam atau basa), oleh pengaruh suhu dan kondisi – kondisi nonfisiologis lainnya. Terdapat dua cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami tidak atau kurang stabil, salah satunya adalah dengan cara memodifikasi enzim menggunakan zat kimia tertentu.

1. Stabilitas Termal Enzim

Pada suhu yang terlalu rendah stabilitas enzim tinggi, namun aktivitasnya rendah, sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kestabilannya rendah. Kenaikan suhu akan mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzim, namun hanya sampai batas tertentu dan selanjutnya akan terjadi proses denaturasi protein. Daerah suhu saat stabilitas dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum untuk enzim tersebut (Wirahadikusumah, 1997).

Dalam industri, umumnya reaksi-reaksi dilakukan pada suhu tinggi hal ini bertujuan untuk mengurangi tingkat kontaminasi dan masalah-masalah viskositas serta meningkatkan laju reaksi. Namun, suhu yang tinggi ini merupakan masalah utama dalam stabilitas enzim, karena enzim umumnya tidak stabil pada suhu tinggi.

Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi berlangsung dalam dua tahap, yaitu (Ahern *and* Klibanov, 1987):

- a. Adanya pembukaan partial (*partial unfolding*) struktur skunder, tersier, atau kuartener molekul enzim.

- b. Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino - asam amino tertentu oleh panas.

Air memegang peranan penting pada kedua tahap di atas. Oleh karena itu, dengan menggunakan air seperti pada kondisi mikroakuos, reaksi inaktivasi oleh panas dapat diperlambat dan stabilitas termal enzim akan meningkat.

Stabilitas termal enzim akan jauh lebih tinggi dalam kondisi kering dibandingkan dalam kondisi basah. Adanya air sebagai pelumas membuat konformasi suatu molekul enzim menjadi sangat fleksibel, sehingga bila air dihilangkan molekul enzim akan menjadi lebih kaku (Virdianingsih, 2002).

2. Stabilitas pH Enzim

Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor dan kehadiran surfaktan (Eijsink *et al.*, 2005). Dari faktor-faktor tersebut pH memegang peranan penting. Diperkirakan perubahan keaktifan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim-substrat. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum enzim dengan stabilitas yang tinggi (Winarno, 1986).

Pada reaksi enzimatik, sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversible* pada pH yang jauh dari rentang pH optimum untuk reaksi enzimatik. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding*

molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatik dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

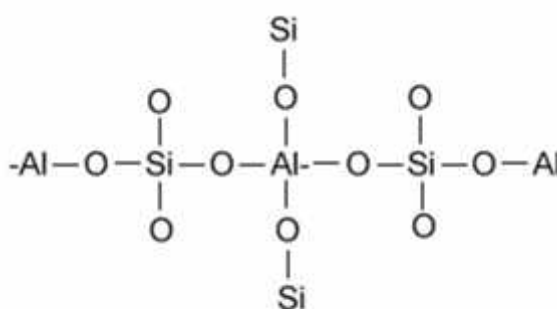
J. Zeolit

Mineral zeolit banyak ditemukan di alam sebagai batuan sedimen vulkano. Penyusunan utama zeolit adalah mordenit dan klipnotilonit dalam berbagai variasi komposisi. Nama zeolit berasal dari dua kata dalam bahasa Yunani yaitu *zein* yang berarti mendidih dan *lithos* yang berarti batuan. Disebut demikian karena mineral ini mempunyai sifat mendidih atau mengembang apabila dipanaskan. Air dalam rongga-rongga zeolit akan mendidih bila dipanaskan pada suhu 100°C (Sutarti dan Rachmawati, 1994).

Zeolit menurut proses pembentukannya dibagi 2, yaitu : zeolit alam (*natural zeolit*) dan zeolit sintetis (*synthetic zeolit*). Zeolit alam biasanya mengandung kation-kation K^+ , Na^+ , Ca^{2+} atau Mg^{2+} sedangkan zeolit sintetis biasanya hanya mengandung kation-kation K^+ atau Na^+ . Pada zeolit alam, adanya molekul air dalam pori dan oksida bebas di permukaan seperti Al_2O_3 , SiO_2 , CaO , MgO , Na_2O , K_2O dapat menutupi pori-pori atau situs aktif dari zeolit sehingga dapat menurunkan kapasitas adsorpsi maupun sifat katalisis dari zeolit tersebut. Inilah alasan mengapa zeolit alam perlu diaktivasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Aktivasi zeolit alam dapat dilakukan secara fisika maupun kimia. Secara fisika, aktivasi dapat dilakukan dengan pemanasan pada suhu 300- 400°C dengan udara panas atau dengan sistem vakum untuk melepaskan molekul air. Sedangkan aktivasi secara kimia dilakukan melalui pencucian zeolit dengan larutan Na_2EDTA atau asam-asam anorganik seperti

HF, HCl dan H₂SO₄ untuk menghilangkan oksida-oksida pengotor yang menutupi permukaan pori (Sutarti dan Rachmawati, 1994).

Zeolit mempunyai kerangka terbuka, sehingga memungkinkan untuk melakukan adsorpsi Ca bertukar dengan (Na,K). Morfologi dan struktur kristal yang terdiri dari rongga-rongga yang berhubungan ke segala arah menyebabkan permukaan zeolit menjadi luas. Morfologi ini terbentuk dari unit dasar pembangunan dasar primer yang membentuk unit dasar pembangunan sekunder dan begitu seterusnya. Struktur umum zeolit dapat dilihat pada Gambar 9



Gambar 9. Struktur umum zeolit.

Proses pengolahan zeolit

Proses komersial yang pertama dilakukan berdasar atas sintesis laboratorium yang asli menggunakan hidrogel yang amorf. Pengolahan zeolit secara garis besar dapat dibagi dalam dua tahap, yaitu preparasi dan aktivasi: Tahapan preparasi zeolit diperlakukan sedemikian rupa agar mendapatkan zeolit yang siap olah. Tahap ini berupa pengecilan ukuran dan pengayakan. Tahapan ini dapat menggunakan mesin secara keseluruhan atau dengan cara sedikit

konvensional. Aktivasi zeolit dapat dilakukan dengan dua cara yaitu secara fisis dan kimiawi sebagai berikut:

- a. Aktivasi secara fisis berupa pemanasan zeolit dengan tujuan untuk menguapkan air yang terperangkap dalam pori-pori kristal zeolit sehingga luas permukaan pori-pori bertambah. Pemanasan dilakukan dalam oven biasa pada suhu 300-400⁰C (untuk skala laboratorium) atau menggunakan tungku putar dengan pemanasan selama 5-6 jam (skala besar).
- b. Aktivasi secara kimia dilakukan dengan larutan asam H₂SO₄ atau basa NaOH dengan tujuan untuk membersihkan permukaan pori, membuang senyawa pengotor dan mengatur kembali letak atom yang dipertukarkan. Pereaksi kimia ditambahkan pada zeolit yang telah disusun dalam tangki dan diaduk dalam jangka waktu tertentu. Zeolit kemudian dicuci dengan air sampai netral dan selanjutnya dikeringkan (Sutarti dan Rachmawati, 1994).

Secara umum enzim larut dalam air sehingga banyak enzim yang tidak ekonomis untuk digunakan pada pengoperasian dalam skala besar karena hanya dapat digunakan satu kali proses dengan biaya yang cukup mahal. Zeolit dapat mengatasi masalah ini dengan menjebak enzim ke dalamnya. Selain tidak larut dalam air, zeolit juga dapat dipisahkan dengan mudah dibandingkan dengan matriks penjembutan yang lain.

K. Amobilisasi

Amobilisasi enzim adalah proses pergerakan molekul enzim yang ditahan pada tempat tertentu dalam suatu ruang reaksi kimia yang dikatalisisnya.

Enzim amobil adalah suatu enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak, sehingga dapat dilakukan atau diatur kapan enzim harus bereaksi dengan substrat (Winarno, 1986). Keunggulan penggunaan enzim amobil dalam industri menurut Payne *et al.* (1992) antara lain:

- 1) Dapat digunakan berulang
- 2) Dapat mengurangi biaya
- 3) Produk tidak dipengaruhi oleh enzim
- 4) Memudahkan pengendalian enzim
- 5) Tahan kondisi ekstrim
- 6) Dapat digunakan untuk uji analisis
- 7) Meningkatkan daya guna
- 8) Memungkinkan proses sinambung

Metode amobilisasi fisik (penjebakan) adalah metode adsorpsi dengan menggunakan permukaan padat atau menempelkan enzim pada permukaan adsorben (Suklha *et al.*, 2003). Metode amobilisasi secara fisik (penjebakan) memiliki kelebihan yaitu aktivitas dari enzim tetap tinggi (tidak terjadi perubahan konformasi enzim) dan media dapat diregenerasi (Susanto dkk., 2003). Menurut Chibata (1978), metode untuk amobilisasi enzim dapat dikelompokkan dalam tiga kategori, yaitu:

1. Metode penjebakan

Teknik penjebakan enzim berdasarkan pada penempatan enzim dalam kisi-kisi matriks polimer atau membran. Penjebakan enzim dapat dilakukan dalam gel atau serat polimer. Matriks gel yang dapat digunakan antara lain, adalah poliakrilamida, K-karagen, dan pati. Sedangkan serat yang

dipakai antara lain, adalah selulosa asetat. Cara penjebakan memberi keuntungan karena secara relatif struktur alami enzim tidak mengalami gangguan fisik. Hal itu disebabkan oleh enzim yang tidak berikatan dengan bahan pendukung, sehingga tidak terjadi perubahan konformasi enzim atau inaktivasi enzim. Akan tetapi untuk membentuk kompleks antara enzim dengan substrat sangat kecil kemungkinannya, karena enzim tidak berada pada permukaan bahan pendukung.

Teknik penjebakan enzim dalam mikro kapsul yang berupa membran polimer semipermeabel mempunyai keuntungan, yaitu daerah permukaan reaksi antara substrat cukup luas. Tetapi kerugian dalam pemakaian cara ini, adalah : (1) terjadinya inaktivasi enzim selama pembentukan mikro kapsul, (2) dibutuhkan konsentrasi enzim yang besar, (3) adanya kemungkinan enzim bergabung dengan dinding membran.

2. Metode pengikatan (adsorpsi) pada bahan pendukung

Amobilisasi enzim dengan teknik adsorpsi dapat dilakukan dengan bahan pendukung seperti bentonit, silika gel, zeolit, dan alumina. Ikatan kimia yang dapat terbentuk adalah ikatan hidrogen ikatan hidrofobik, dan gaya *van der waals* yang bersifat lemah sehingga kemungkinan untuk merubahnya konformasi enzim secara fisik dapat diabaikan. Disamping itu cara ini mempunyai keuntungan yaitu, dapat membentuk enzim amobil yang lebih banyak dari pada hasil amobilisasi dengan cara lain, karena pada cara ini enzim akan berada langsung pada permukaan bahan pendukung yang kemungkinan bertemunya enzim dengan substrat lebih besar dan akan terbentuk kompleks enzim substrat yang lebih banyak pula.

3. Metode ikatan silang

Amobilisasi enzim dengan cara ikatan silang dapat terbentuk antara molekul enzim yang berikatan kovalen satu sama lain oleh zat berikatan silang seperti glutaraldehida, yang membentuk struktur tiga dimensi yang tidak larut dalam air.

Reagen pengikat silang harus memiliki dua atau lebih gugus fungsi.

Reagen pembentuk ikatan silang yang sering digunakan adalah glutaraldehida, turunan isosianat, bisdiazobenzidina, N,N-etilen bismaleimida, dan N,N-polimetilen bisoodoaseomida. Kerugian dalam pemakaian cara ini adalah dapat terjadinya inaktivasi enzim akibat pembentukan ikatan antara pusat aktif enzim dengan zat pengikat silang (Wiseman, 1985).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei - September 2017 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, jarum ose, mikropipet *Eppendroff*, neraca analitik, lemari pendingin, pembakar spirtus, sentrifuga, *magnetik stirer*, autoclave model S-90N, oven, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, *waterbatch shaker incubator* HAAKE, pH meter, penangas air, *waterbath incubator*, ayakan 120 mesh dan spektrofotometer *UV-VIS Cary-100 UV-VIS Agilent Technologies*.

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , urea, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , pepton, NaOH, glukosa, *Carboxymethyl Cellulase* (CMC), akuades, Na(K)-Tartarat, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , *reagen folin-ciocalteu*, pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*), fenol, Na_2SO_3 , HCl, Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, *Bovine Serum Albumin* (BSA), akuades, kantong selofan, dan zeolit. Adapun

mikroorganisme yang digunakan adalah jamur *Aspergillus niger* L-51 penghasil enzim selulase yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung.

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan media inokulum

Media inokulum digunakan sebagai media adaptasi awal pertumbuhan dan media perkembangbiakan spora jamur pada media cair. Media inokulum dibuat dengan cara menimbang bahan-bahan yang terdiri dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,14 g; KH_2PO_4 0,2 g; urea 0,03 g; CaCl_2 0,03 g; MgSO_4 0,03 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0005 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,00014 g; CoCl_2 0,0002 g; pepton 0,075 g; CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) 0,75 g yang dilarutkan dalam *buffer* fosfat 0,2 M pH 5 sebanyak 100 mL dalam labu Erlenmeyer 250 mL dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit (Meriyanti, 2014). Setelah dingin, jamur *A. niger* diinokulasikan sebanyak 5 ose ke dalam media inokulum yang telah siap. Selanjutnya media inokulum dikocok dalam *waterbath shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 35°C selama 24 jam.

2. Pembuatan media fermentasi

Media fermentasi yang digunakan (g L^{-1}) terdiri dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g; KH_2PO_4 2,0 g; urea 0,3 g; CaCl_2 0,3 g; MgSO_4 0,3 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0014 g; CoCl_2 0,002 g; pepton 0,75 g; CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) 7,5 g yang dilarutkan dalam *buffer* fosfat 0,2 M pH 5 sebanyak 1000 mL dalam labu Erlenmeyer 2000 mL dan media

fermentasi tersebut disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya dimasukkan larutan media inokulum sebanyak 2% total volume media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptis lalu dikocok dalam *waterbath shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 35°C selama 72 jam. Lalu diuji aktivitas enzim selulase dengan metode *Mandels* (Meriyanti, 2014).

3. Isolasi enzim selulase

Isolasi enzim selulase dilakukan menggunakan metode sentrifugasi. Prinsip sentrifugasi berdasarkan kecepatan sedimentasi dengan cara pemusingan. Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (di bawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono dkk., 1992). Untuk memisahkan enzim dari komponen sel lainnya digunakan metode sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim selulase dengan metode *Mandels*.

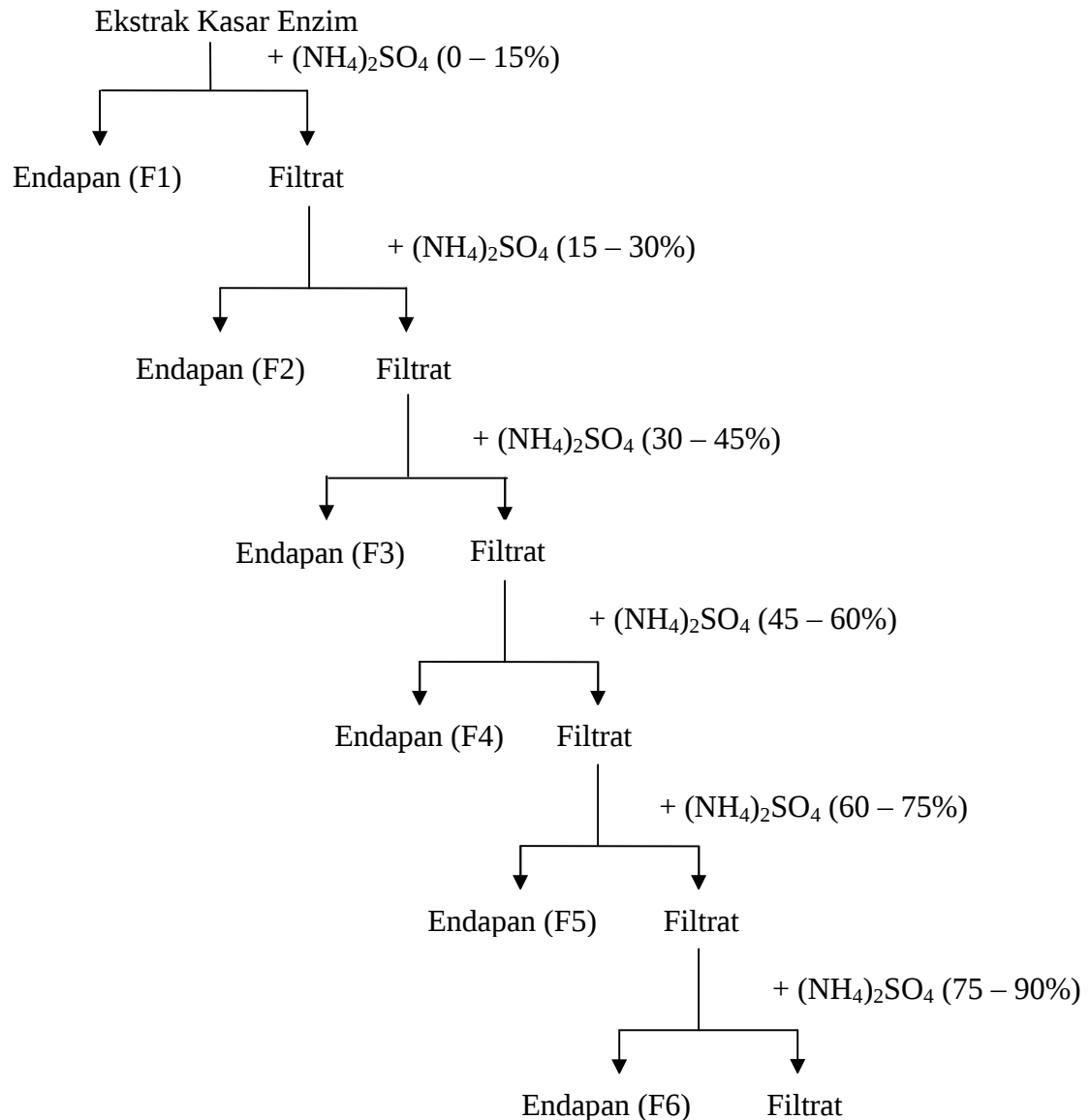
4. Pemurnian enzim selulase

Setelah enzim selulase diisolasi, selanjutnya enzim tersebut dimurnikan menggunakan metode fraksinasi dengan menggunakan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan dialisis.

a) Fraksinasi

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh selanjutnya diendapkan dengan menggunakan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada berbagai konsentrasi

yaitu 0-15%; 15-30%; 30-45%; 45-60%; 60-75%; dan 75-90%. Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Skema proses fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat.

Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi konsentrasi ammonium sulfat, dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan atau dicuci dengan *buffer* fosfat 0,1 M pH 6,0.

b) Dialisis

Endapan enzim dari tiap fraksi hasil fraksinasi kemudian dimurnikan dengan cara dialisis menggunakan membran semipermeabel (kantong selofan). Endapan tersebut dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis menggunakan *buffer* fosfat 0,01 M pH 5 selama 24 jam pada suhu dingin (Pohl, 1990). Selama dialisis, dilakukan pergantian *buffer* selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi.

Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantong, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 . Bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode *Mandels* dan diukur kade proteinnya dengan metode *Lowry*.

5. Uji aktivitas enzim selulase metode *Mandels*

- a) Pembuatan pereaksi untuk pengukuran aktivitas enzim selulase metode *Mandels* (Mandels *et al.*, 1976)

Ke dalam labu takar 100 mL, dimasukkan 1 g DNS (*Dinitrosalisilic Acid*) yang sebelumnya telah dilarutkan dengan 10 mL akuades, selanjutnya ditambahkan 1 g NaOH lalu dikocok hingga larut, lalu ditambahkan 0,2 g fenol; 0,05 g Na_2SO_3 ; 0,4 g Na(K)-tartarat kemudian dilarutkan dengan 90 mL aquades hingga tanda batas.

b) Uji aktivitas enzim selulase metode *Mandels* (Mandels *et al.*, 1976)

Metode ini didasarkan pada glukosa yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1976). Dengan membandingkan antara sampel [0,25 mL enzim ditambah 0,25 mL (larutan CMC 0,5% dalam *buffer* fosfat pH 5,0)] dan kontrol (0,25 mL enzim), yang masing-masing diinkubasi selama 60 menit dalam *waterbath incubator* pada suhu 50°C. Kemudian kontrol ditambahkan dengan 0,25 mL substrat (larutan CMC 0,5% dalam *buffer* fosfat pH 5,0) dan selanjutnya sampel dan kontrol ditambahkan 1 mL pereaksi DNS dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air. Kemudian masing-masing ditambahkan 1,5 mL akuades lalu didinginkan. Setelah dingin, serapannya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-VIS* pada λ 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa.

6. Penentuan kadar protein metode Lowry

a) Pembuatan pereaksi untuk penentuan kadar protein enzim selulase metode *Lowry* (Lowry *et al.*, 1951)

1. Pereaksi A : 2 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N
2. Pereaksi B : 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K) tartarat 1%
3. Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A
4. Pereaksi D : reagen *folin ciocelteau* diencerkan dengan akuades 1:1.
5. Larutan standar : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

b) Penentuan kadar protein

Penentuan kadar protein ini bertujuan untuk mengukur aktivitas spesifik dari protein enzim selulase. Sebanyak 0,1 mL enzim selulase ditambahkan 0,9 mL akuades lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan diaduk rata. Kemudian dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Untuk kontrol, 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades, selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

7. Amobilisasi enzim selulase menggunakan zeolit

a) Preparasi matriks zeolit

Serbuk zeolit diayak menggunakan ayakan berukuran 120 mesh. Aktivasi zeolit alam dilakukan dengan cara mencampurkan 30 gram zeolit alam dan 100 mL HCl 3 M. Campuran dipanaskan sambil diaduk pada suhu 90°C selama 2 jam, kemudian didinginkan, disaring dan dicuci dengan aquades sampai zeolit tidak berwarna kekuningan lagi. Lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam, dan disimpan dalam desikator (Septiani dan Lisma, 2011).

b) Penetapan pH untuk proses pengikatan enzim selulase pada zeolit

Enzim selulase diikatkan pada matriks dengan variasi pH 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 dan 8 dengan menggunakan *buffer* fosfat 0,1 M. Kemudian matriks diisi dengan 0,5 mL larutan enzim dan dielusi dengan *buffer* yang sesuai,

diaduk 5-10 menit. Campuran tersebut dibiarkan hingga matriks mengendap. Selanjutnya supernatan didekantasi dan diuji aktivitas enzim dan kadar proteinnya.

c) Amobilisasi enzim selulase

Sebanyak 0,25 mL larutan enzim selulase diamobil dengan zeolit pada pH optimum pengikatan. Enzim selulase diikatkan pada zeolit dengan cara mencampurkan 0,25 mL enzim selulase dengan 0,25 gram zeolit.

Kemudian campuran diaduk hingga rata dan simpan dalam *freezer* selama 3-5 menit.

d) Pemakaian berulang enzim amobil

Enzim amobil yang telah dipakai (direaksikan dengan substrat), dipakai kembali untuk direaksikan kembali dengan substrat dengan uji metode Mandels. Pemakaian berulang ini dilakukan hingga 4 kali.

8. Karakterisasi enzim selulase

a) Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan memvariasikan suhu yaitu 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75 dan 80 °C.

Selanjutnya aktivitas enzim diukur dengan metode *Mandels*.

b) Penentuan data kinetika enzim (K_M dan V_{maks})

Nilai Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim selulase ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat (larutan CMC) yaitu 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 dan 1,0 %. Kemudian dilakukan pengukuran dengan metode *Mandels*. Selanjutnya data aktivitas enzim dengan

konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva *Lineweaver-Burk* untuk penentuan K_M dan V_{maks} .

c) Uji stabilitas termal enzim

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan variasi waktu inkubasi. Waktu inkubasi dibutuhkan enzim untuk bereaksi dengan substrat secara optimum. Pada penelitian ini, uji stabilitas termal enzim dilakukan dengan variasi waktu inkubasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dan 100 menit. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode *Mandels*.

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas enzim } X}{\text{Aktivitas enzim tertinggi}} \times 100\%$$

(Virdianingsih, 2002).

9. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i)

Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim selulase hasil pemurnian dan hasil amobilisasi dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997) dengan persamaan:

$$\ln (E_i/E_0) = - k_i t \quad (1)$$

Sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan (Kazan *et al.*, 1997):

$$\Delta G_i = - RT \ln (k_i h/k_B T) \quad (2)$$

Keterangan :

R = konstanta gas ($8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

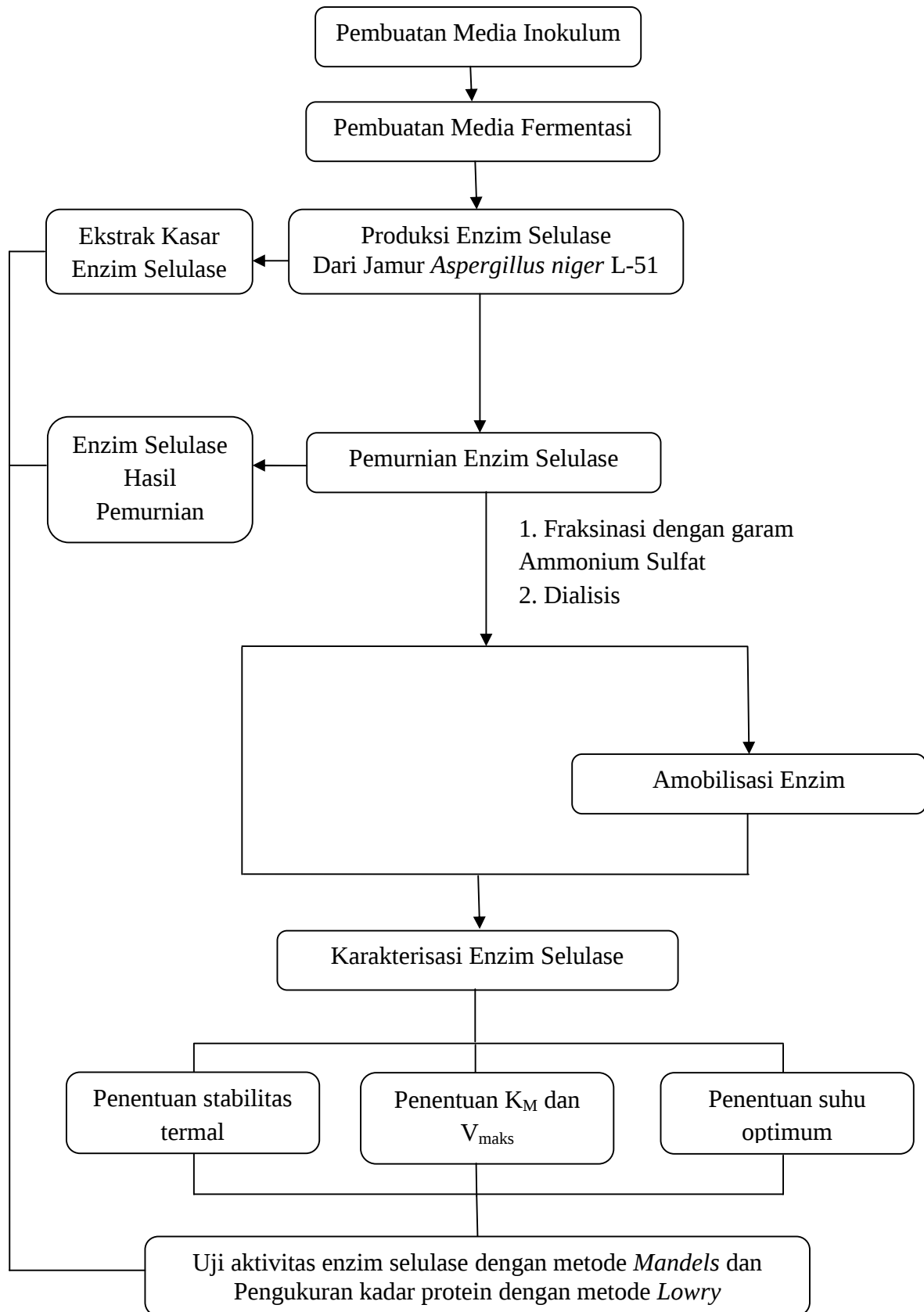
T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

h = konstanta Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J det}$)

k_B = konstanta Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$)

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan dalam Gambar 11.



Gambar 11. Diagram Alir Penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

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

1. Aktivitas spesifik enzim selulase hasil pemurnian meningkat 7 kali lipat dibandingkan dengan enzim ekstrak kasar. Enzim ekstrak kasar memiliki aktivitas spesifik sebesar 5,3944 U/mg dan enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas spesifik sebesar 38,0292 U/mg.
2. Enzim selulase hasil pemurnian optimum pada suhu 50°C. Memiliki nilai $V_{maks} = 4,7400 \mu\text{mol/mL/menit}$, nilai $K_M = 1,9400 \text{ mg/mL}$, dan uji stabilitas enzim pada suhu 50°C selama 100 menit memiliki aktivitas sisa sebesar 5%.
3. Enzim selulase hasil amobilisasi mengalami pergeseran suhu optimum yaitu 75°C. Memiliki nilai $V_{maks} = 1,4000 \mu\text{mol/mL/menit}$, nilai K_M sebesar 0,9900 mg/mL, dan uji stabilitas termal enzim pada suhu 50°C selama 100 menit memiliki aktivitas sebesar 23%.

4. Enzim selulase hasil pemurnian memiliki $k_i = 0,024 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 28,87 \text{ menit}^{-1}$ dan $\Delta G_i = 100,345 \text{ kJ/mol}$. Sedangkan enzim selulase hasil amobilisasi memiliki $k_i = 0,013 \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 53,30 \text{ menit}^{-1}$, dan $\Delta G_i = 102,175 \text{ kJ/mol}$.
5. Enzim selulase hasil amobilisasi berdasarkan nilai k_i , $t_{1/2}$, dan ΔG_i lebih stabil dibandingkan dengan enzim selulase hasil pemurnian.

B. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka saran untuk peneliti selanjutnya yaitu :

1. Penelitian lebih lanjut mengenai pemurnian enzim selulase dari jamur *Aspergillus niger* L-51 menggunakan kromatografi kolom dan kromatografi penukar ion untuk mendapatkan peningkatan aktivitas enzim dan kemurnian yang lebih baik.
2. Melakukan stabilitas termal pada suhu optimum enzim hasil pemurnian dan suhu optimum enzim hasil amobilisasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahern, T.J. and A.M. Klibanov. 1987. Why Do Enzyme Irreversibly Inactive at High Temperature. Biotec 1. *Microbial Genetic Engineering and Enzyme Technology*. Gustav Fischer. Stuttgart. New York.
- Akiba, S., Y. Kiniura, K. Yamamoto, H. Kumagai. 1995. Purification and Characterization of a Protease Resistant Cellulase from *Aspergillus niger*. *Bioengineering*. **79**. 125-130.
- Ali, U.F. dan Saad El-Dein, H.S. 2008. Production and partial purification of cellulase complex by *Aspergillus niger* and *A. nidulans* grown on water hyacinth blend. *J. Appl. Sci. Res.* **4** (7). 875-891.
- Amalia, Putri. 2016. Pengaruh Modifikasi Kimia Terhadap Stabilitas Enzim Selulase dari Bakteri Lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Menggunakan Sitratonat Anhidrida. Tesis. Universitas Lampung. Bandar Lampung. 42-43.
- Beilen, J.V. and Li, Z. 2002. Enzyme Technology: An Overview. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**. 338-344.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and Related Enzymes in. *Biotechnology Advances*. **18**. 355-383.
- Boyer, R.F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. Benjamin Cumming Publising Company. California.
- Busto, M.D., N. Ortega, M. Perez-Mateos. 1995. Induction of β -glukosidase in Fungal and Soil Bacterial Cultures. *Soil Biol. Biochem.* **27**. 949-954.
- Chibata, I. 1978. *Immobilized enzymes. Research and Development*. Halsted Press Book. New York.
- Cooper, T.G. 1997. *The Tool of Biochemistry*. John Wiley and Sons. Canada.
- Cowd, M.A. 1991. *Kimia Polimer*. Penerbit ITB. Bandung.
- Crueger, W. and A. Crueger. 1984. Biotechnology. *A Textbook of Indrustrial Microbiology*. Broch. T. D., editor Science Tech. Inc. Madison. USA. 178-180.

- Damerco, J. L., Valadares, S., M.C. S-inglis, and Felix, C. R. 2003. "Production Of Hydrolytic Enzyme By *Trichoderma* Isolation With Antagonistic Activity Against *Crinipellis Perniciosathe* Causal Agent Of Witches' Broom Of Cocoa." *Brazilian J. of Micro.* **34**. 33-38.
- Dryer, R.L. 1993. *Biokimia Jilid 1*. UGM Press. Yogyakarta. 180-181.
- Dwidjoseputro, D. 1984. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Malang.
- Eijsink, G.H., Sirgit, G., Torben, V., Bertus van de Burg. 2005. Directed Evolution of Enzyme Stability. Biomolecular Engineering. *Elsevier Science Inc.* New York. **23**. 21-30.
- Fan, L.T., Y.H. Lee, and M.M. Gharpuray. 1982. The Nature of Lignocellulosics and Their Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis. *Advances in Biochem. Eng.* **23**. 158-187.
- Fessenden, R.J. and Fessenden, J.S. 1992. *Kimia Organik Jilid II*. Erlangga. Jakarta. 353.
- Fowler, M. W. 1988. *Enzyme Technology in Biotechnology For Engineers, Biological System in Technological Processes, Edited : Scragg, A. H.* John Wiley and Sons. New York.
- Frazier, W. C. and Westhoff. 1981. *Food Microbiology*. Tata Mc Graw Hill Publ. Co. Ltd. New York.
- Gaman, P.M. dan K.B. Sherrington. 1994. *Ilmu pangan, Pengantar Ilmu pangan, Nutrisi dan Mikrobiologi*. Universitas Gadjah Mada Press. Yogyakarta.
- Goddete, D.W., C. Terri, F.L Beth, L. Maria, R.M. Jonathan, P. Christian, B.R. Robert, S.Y. Shiow, and C.R. Wilson. 1993. Strategy and Implementation of a System for Protein Engineering. *J. Biotechnology*. **28**. 41-54.
- Gokhan, Coral., Burhan A., M. Nisa U., and Hatice G. 2002. Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild-Type Strain. *Turk J. Biol.* **26**. 209-213.
- Hasanah, Uswatun. 2016. Peningkatan Kestabilan Enzim Protease Dari *Bacillus subtilis* ITBCCB 148 Dengan Amobilisasi Menggunakan Zeolit. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Indrawati, Gandjar. 2006. Xylanase Production by *Aspergillus niger* LPB 236 in Solid-State Fermentation Using Statistical Experimental Design. *J. Food Tech., Biotech.* **46** (2). 183-189.

- Indrawati, I. dan S. Djajasupena. 2005. Isolasi Jamur dari Seresah dan Uji Keefektifannya dalam Penguraian Selulosa. *Jurnal Ilmiah Biologi*. **4** (2). 18 – 21.
- Kamelia, R., Muliawati S, dan Dessy N. 2005. *Isolasi dan Karakterisasi Protease Intraseluler Termostabil dari Bakteri Bacillus stearotherophilus RP1*. Seminar Nasional MIPA. Departemen Kimia. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kanti, A. 2005. Actinomycetes Selulolitik dari Tanah Hutan Taman Nasional Bukit Duabelas, Jambi. BIODIVERSITAS. *Journal of Biological Diversity*, **6** (2). 85 – 89.
- Kazan, D., H. Ertan., A. Erarslan. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* Penicillin G Acylase againsts thermal Inactivation by Cross-linking with Dextran Dialdehyde Polymers. *Appl. Microbiol Biotechnol*. **48**. 191-197.
- Lay, B. W. dan Sugyo, H. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Pers. Jakarta. 107-112.
- Lee, S.M. and Koo, Y.M. 2001. Pilot scale Production of Cellulose Using *Trichoderma reesei* Rut C-30 in Fed-batch Mode. *J. Microbiol. Biotechnol*. **11**. 229-233.
- Lehninger, A. L. 1982. *Biochemistry*. Academic Press. New York.
- Lowry, O. H., N. J., Rosebrough, A. L., Farr, R. J. Randall. 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem*. 193-265.
- Mandels, M., A. Raymond, R. Charles. 1976. *Measurement of Saccharifying Cellulose. Biotechnology and Bioengineering*. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Martoharsono, S. 1984. *Biokimia*. UGM Press. Yogyakarta. 91.
- Meriyanti, Desi. 2014. Peningkatan Kestabilan Enzim Selulase dari Jamur *Aspergillus niger* L-51 dengan Amobilisasi Menggunakan Bentonit. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung. 33-34.
- Mozhaev, V.V. and K. Martinek. 1984. Struktur-Stability Relationship in Protein: New Approaches to Stabilizing Enzymes. *Enzyme Microb. Technol*. **1**. 50-59.
- Mulyono, H. 2001. *Kamus Kimia*. Ganesindo. Bandung.
- Oinonen, A.M. 2004. *Trichoderma reesei Strains for Production of Cellulase for The Textile Industry*. Faculty of Biosciences Department of Biological and Environmental Sciences. University of Helsinki.

- Page, D.S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Payne, G., V. Bringi., C. Prince, and M. Shuler. 1992. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Hanser Publishers. Munich-Vienna. 465 halaman.
- Pelczar, M.J. and E.C.S. Chan. 1986. Penterjemah , Ratna Siri Hadioetomo dkk. *Pembangunan Bangsa Indonesia*. PPI Universitas Sains. Malaysia.
- Poedjiadi. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI-Press. Jakarta.
- Pohl, T. 1990. *Concentration of Protein Removal of Salute dalam M.P. Deutscher, Methods of Enzymology: Guide to Protein Purification*. Academic Press. New York.
- Rao, Subba N.S. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan*. UI Press. Jakarta. 228-229.
- Richana, N. 2002. Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Perkembangan Bioindustri di Indonesia. *Bulletin Agrobio*. 5. 29-36.
- Rodwell, V.W. 1987. *Harper's Review of Biochemistry*. EGC Kedokteran. Jakarta.
- Scopes, R.K. 1982. *Protein Purification*. Springer Verlag. New York.
- Septiani, U. dan A. Lisma. 2011. Pemanfaatan Zeolit Alam Sebagai Media Pendukung Amobilisasi α -Amilase. *Skripsi*. Universitas Andalas. Padang.
- Shahib, N. 2005. *Biologi Molekular Medik I*. Unpad Press. Bandung. 164-167.
- Sudaryati, Y. dan D. Sastraatmadja. 1993. Seleksi Strain *Aspergillus spp.* untuk Menghasilkan Enzim Selulase dalam Media Dedak. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 2 (2). 30-32.
- Suhartono M.T., Suswanto A., dan Widjaja H. 1992. *Diktat Struktur dan Biokimia Protein PA*. IPB. Bogor.
- Suklha, S.S., K.L. Dorris, A. Suklha, and J.L. Margrave. 2003. Adsorption of Chromium from Aqueous Solution by Maple Sawdust. *J. Haz Mater*. 12. 1-3.
- Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R., and Pandey, A., 2005. Microbial Cellulases- Production, Application and Challenges. *J. Sci. Ind. Res*. 64 (1). 832-844.
- Suriawiria, U. 1986. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Angkasa. Bandung.

- Susanto, H., Budiyono, Sumantri, dan Aryanti. 2003. Amobilisasi Enzim dengan Menggunakan Membran Mikrofiltrasi, *Laporan Kegiatan*. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang.
- Sutarti, M., dan M. Rachmawati. 1994. *Zeolit Tinjauan Literatur*. PDII LIPI. Jakarta.
- Ulhaq, I., Javed, M.M., Khan, T.S., and Siddiq, Z. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Res J Agr Biological Sci.* **1**. 241-245.
- Umbreit, Wayne W. 1967. *Advances In Applied Microbiology*. Academic Press. New York San Fransisco London.
- Virdianingsih, R. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal dari *Bacillus pumilus* y1 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wagen, E.S. 1984. Strategies for Increasing The Stability of Enzymes, in Enzyme Engineering. *The New York Academy of Sciences, New York.* **7**. 1-19.
- Walsh, G. and D.R. Headon. 1994. *Protein Biotechnology*. John Willey and Sons. New York. 1-9.
- Williamson, K.L and L.F. Fieser. 1992. *Organic Experiment 7th Edition*. D C Health ang Company. United States of America.
- Winarno, F.G. 1986. *Enzim Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 1997. *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Wirawan, S.K., Rismijana, J., Hidayat, T. 2008. Aplikasi a Amilase dan Selulase pada Proses Deinking Kertas Bekas Campuran. *Berita Selulosa* **43**. 11-18.
- Wiseman, A.S. 1985. *Handbook of Enzymes Biotechnology, 2nd ed*. Ellies Harwood Lim Chicester.