

**PENINGKATAN STABILITAS ENZIM SELULASE DARI BAKTERI
Bacillus subtilis ITBCCB148 DENGAN AMOBILISASI
MENGUNAKAN ZEOLIT**

(Skripsi)

Oleh

MIA PERMATASARI



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

ABSTRAK

PENINGKATAN STABILITAS ENZIM SELULASE DARI BAKTERI *Bacillus subtilis* ITBCCB148 DENGAN AMOBILISASI MENGUNAKAN ZEOLIT

Oleh

Mia Permatasari

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan stabilitas enzim selulase dari bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan amobilisasi menggunakan zeolit. Produksi, isolasi, pemurnian dan amobilisasi enzim selulase dilakukan untuk mencapai tujuan tersebut. Selanjutnya karakterisasi enzim hasil pemurnian sebelum dan sesudah amobilisasi dilakukan untuk mengetahui peningkatan stabilitas enzim. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas spesifik 21 kali lebih tinggi yaitu 10,593 U/mg dibandingkan ekstrak kasar enzim yang memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,491 U/mL. Enzim selulase hasil pemurnian mempunyai nilai pH optimum 6; suhu optimum 55°C; $K_M = 1,091$ mg/mL substrat; dan $V_{maks} = 1,200 \mu\text{mol mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$. Uji stabilitas termal enzim selulase hasil pemurnian pada suhu 55°C selama 100 menit memiliki nilai $k_i = 0,011 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 63$ menit; dan $G_i = 104,066$ kJ/mol. Enzim selulase hasil amobilisasi dengan menggunakan zeolit mempunyai nilai pH optimum yang sama dengan enzim hasil pemurnian yaitu pH 6, namun mempunyai suhu optimum yang berbeda dari enzim hasil pemurnian yaitu 60°C. Nilai K_M dan V_{maks} untuk enzim hasil amobilisasi berturut-turut adalah 4,809 mg/mL substrat dan 2,475 $\mu\text{mol mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$. Uji stabilitas termal enzim selulase hasil amobilisasi pada suhu 60°C selama 100 menit memiliki nilai $k_i = 0,005 \text{ menit}^{-1}$; $t_{1/2} = 138,6$ menit; dan $G_i = 107,877$ kJ/mol. Berdasarkan penurunan nilai k_i , peningkatan nilai waktu paruh dan nilai G_i , diketahui bahwa enzim setelah amobilisasi menggunakan zeolit dapat meningkatkan stabilitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148.

Kata kunci : *Bacillus subtilis* ITBCCB148, enzim selulase, amobilisasi, zeolit.

ABSTRACT

INCREASING STABILITY OF ENZYME CELLULOSE OF BACTERIA *Bacillus subtilis* ITBCCB148 WITH AMOBILIZATION USING ZEOLITE

By

Mia Permatasari

The objective of this research to increase the stability of cellulase enzyme from bacterium *Bacillus subtilis* ITBCCB148 by immobilization using zeolite. The production, isolation, purification and immobilization of cellulase enzymes has been conducted to achieve that objectives. Furthermore, characterization of purified enzymes before and after amobilization has been conducted to determine the increases of enzyme stability. The results show that the purified enzyme has specific activity 10,593 U/mg, 21 times higher than the crude extract of enzyme which has specifict activity 0,491 U/mg. The purified cellulase enzyme has an optimum pH value 6; optimum temperature 55°C; $K_M = 1,091$ mg/mL substrate; and $V_{max}=1,200$ $\mu\text{mol mL}^{-1}\text{minute}^{-1}$. The thermal stability test of purified cellulase enzyme at temperature 55°C for 100 minute has k_i value = $0,011$ minute^{-1} ; $t_{1/2} = 63$ minutes; and $G_i = 104,066$ kJ/mol. The immobilized cellulase enzyme using zeolite has the same pH value as the purified enzyme which is pH 6, but it has the optimum temperature different from the purified enzyme which is 60°C. The values of K_M and V_{max} for the immobilized enzyme are 4,809 mg/mL substrate and $2,475\mu\text{mol mL}^{-1}\text{minute}^{-1}$. The thermal stability test of immobilizedcellulase enzyme at 60°C for 100 min has $k_i= 0,005$ min^{-1} ; $t_{1/2} = 138,6$ minutes; and $G_i = 107,877$ kJ/mol. Based on the decreases of k_i value, the increases of half-life value and G_i value, it is known that after immobilization enzyme using zeolite can increase cellulase enzyme stability from *Bacillus subtilis* ITBCCB148.

Keywords: *Bacillus subtilis* ITBCCB148, cellulase enzyme, immobilization, zeolite.

**PENINGKATAN STABILITAS ENZIM SELULASE DARI BAKTERI
Bacillus subtilis ITBCCB148 DENGAN AMOBILISASI
MENGUNAKAN ZEOLIT**

Oleh

MIA PERMATASARI

Skripsi

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

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

Judul Skripsi : **PENINGKATAN STABILITAS ENZIM SELULASE
DARI BAKTERI *Bacillus subtilis* ITBCCB148
DENGAN AMOBILISASI MENGGUNAKAN
ZEOLIT**

Nama Mahasiswa : **Mia Permatasari**

No. Pokok Mahasiswa : 1317011045

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Ketua Jurusan Kimia

Pembimbing

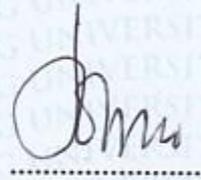
Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, M.T.
NIP 19740705 200003 1 001

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

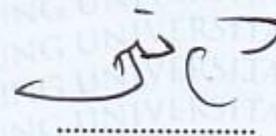
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

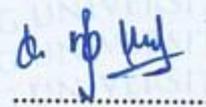
Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Mulyono, Ph.D.**

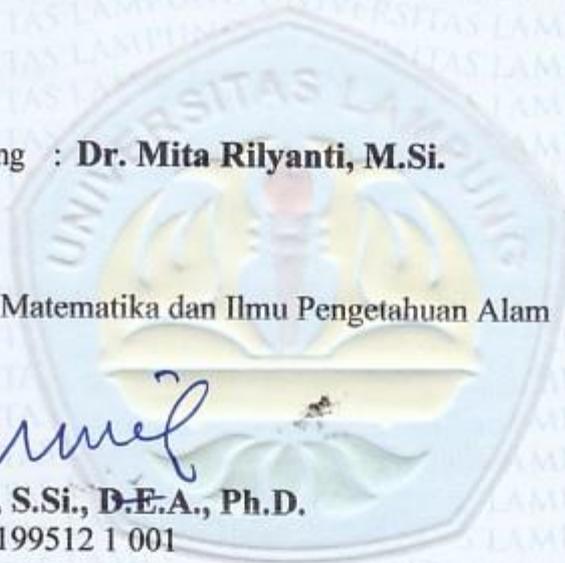
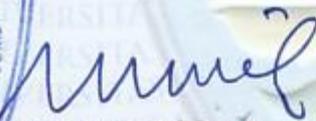


Penguji
Bukan Pembimbing : **Dr. Mita Rilyanti, M.Si.**



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 : **08 Januari 2018**

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Kecamatan Panjang, Kota Bandar Lampung, pada tanggal 09 November 1995, sebagai anak ketiga dari lima bersaudara, putri dari bapak Joko Wiyono dan ibu Sri Rahayu. Jenjang pendidikan diawali dari Taman Kanak-kanak (TK) Xaverius Panjang, Bandar Lampung, diselesaikan pada tahun 2001. Sekolah Dasar (SD) di SD Xaverius Panjang, diselesaikan pada tahun 2007. Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 30 Bandar Lampung, diselesaikan pada tahun 2010, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri Bandar Lampung, diselesaikan pada tahun 2013. Pada tahun 2013, penulis terdaftar sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Unila melalui jalur SBMPTN (Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Pada tahun 2016 Penulis melakukan Praktek Kerja Lapangan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung, Bandar Lampung. Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten praktikum Kimia Dasar jurusan Kehutanan periode 2015/2016, Kimia Dasar jurusan Teknologi Hasil Pertanian 2015/2016, Kimia Dasar jurusan Perternakan 2016/2017, Kimia Dasar jurusan Kimia 2017/2018, Biokimia jurusan Biologi 2016/2017. Penulis juga aktif di organisasi Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) FMIPA Unila

sebagai Kader Muda Himaki (KAMI) periode 2013/2014, anggota Biro Usaha Mandiri (BUM) HIMAKI periode 2014/2015 – 2015/2016. Pada Tahun 2016 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Tematik di desa Negeri Ratu, Kecamatan Pubia, Kabupaten Lampung Tengah pada bulan Juli sampai Agustus 2016.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Kupersembahkan karya sederhana ini kepada :

ALLAH S.W.T sang pemilik jiwa dan ragaku yang telah menganugerahkan hidayah-Nya, dan *Nabi Muhammad SAW* sebagai suri tauladanku.

Kedua Orang tua ku,

Ibunda tercinta Sri Rahayu dan Ayahanda tercinta Joko Wiyono yang telah menjadi sumber kekuatan dan semangat bagiku.

Sosok yang telah membesarkan ku dengan penuh cinta, kasih sayang, kesabaran, selalu memberiku semangat, dukungan, dan pelajaran berarti dalam meraih cita, serta yang terpenting tak pernah lelah menengadahkan tangan dalam setiap sujudnya untuk mendo'akan hidupku.

Keempat saudaraku:

Kakak-kakakku terkasih Mas Adi Prasetyo dan Mas Yuniar Eryas Setiawan, serta kedua adik-adikku tersayang Intan Kharisma dan Akbar Arisko

Pembimbing penelitian Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri AS., M.S.

Segenap keluarga besarku yang selalu mendo'akan keberhasilanku, Guru-guru dan Dosen-dosen yang selalu membagi ilmunya untukku, Seluruh sahabat dan teman-temanku yang senantiasa memberikan semangat dan bantuan untukku,

Serta

Alamamaterku tercinta.

Motto

*Sesungguhnya sesudah kesulitan
ada kemudahan
(Q.S Al. Insyirah;6).*

***Hidup ini seperti sepeda.
Agar tetap seimbang, kau harus terus bergerak
(Albert Einstein)***

*Waktumu terbatas. Jangan menyia-nyiakannya
Dengan menjalani hidup orang lain
(Steve Jobs)*

Live as if you were to die tomorrow.
Learn as if you were to live forever
(Mahatma Gandhi)

Selalu jadi diri sendiri tidak peduli apa yang mereka
katakan
Dan jangan pernah menjadi orang lain meskipun
mereka tampak lebih baik dari Anda
(Penulis)

SANWACANA

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah puji dan syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT, karena atas segala rahmat dan karunia-Nya skripsi ini dapat diselesaikan.

Skripsi dengan judul "**Peningkatan Stabilitas Enzim Selulase Dari Bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Dengan Amobilisasi Menggunakan Zeolit**" adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Selama pelaksanaan dan penulisan skripsi ini tidak lepas dari halangan dan rintangan, namun semua itu dapat penulis lewati berkat rahmat dan ridha Allah SWT serta doa, bantuan, dan dorongan semangat dari orang-orang yang hadir dalam kehidupan penulis. Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih setulus-tulusnya kepada:

1. Kedua orang tuaku yang sangat aku cintai dan banggakan Bapak Joko Wiyono dan Ibu Sri Rahayu, terima kasih Ayahku atas segala bentuk pengorbanan, cinta yang begitu besar dan kasih sayangmu yang tulus. Ibuku yang dengan tulus menyayangi, sabar dalam menghadapi sikap burukku, dan

senantiasa mendoakan kesuksesanku. Terima kasih dengan sangat tulus dan ikhlas ku ucapkan atas segala kebaikan, keikhlasan, kerja keras dan segala perjuangan kalian yang telah diberikan kepadaku, yang takkan pernah tergantikan dengan apapun.

2. Bapak Prof. Dr. Ir Yandri A.S., M.S. selaku Pembimbing utama yang senantiasa memberikan pembelajaran, ilmu, saran, nasihat, motivasi, serta arahan yang diberikan kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
3. Bapak Prof. Warsito, D.E.A., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
4. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila.
5. Bapak Mulyono, Ph.D dan Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si selaku Pembahas yang telah banyak memberikan ilmu, nasihat, saran, motivasi, perhatian, serta kesabaran dalam membimbing penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
6. Bapak Diky Hidayat, M.SC. selaku pembimbing akademik yang telah banyak membantu dan memotivasi serta membimbing penulis selama masa perkuliahan sehingga penulis dapat menyelesaikan perkuliahan dengan baik.
7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh ilmu yang diberikan.
8. Seluruh karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung terkhusus Pak John selaku laboran Biokimia serta Pak Gani, dan Bu Ani atas seluruh bantuan yang diberikan kepada penulis.

9. Kakak-Kakakku tersayang Adi Prasetyo dan Yuniar Eryas Setiawan serta Adik-adikku tersayang Intan Kharisma dan Akbar Arisko. Terima kasih atas kebahagiaan, motivasi, bantuan, keceriaan, canda tawa yang tercipta selama ini dan menjadi *partner* bertengkar serta selalu memberikan warna dihidupku.
10. Keluarga besar dan saudara-saudaraku yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terimakasih atas doa dan dukungannya.
11. Sahabat-sahabat terbaikku semasa perkuliahan Esti Sandra Pertiwi, S.Si, Fika Putri Aulia, S.Si, Riski Rahmadani, S.Si, dan Yunita Febrianti yang selalu mendampingiku dalam suka dan duka menjalani masa perkuliahan, Terima kasih persahabatan yang telah kalian berikan, selalu jadi Esti, Kiki, Fika, Yunita yang penulis kenal, kalian yang terbaik My Bee .
12. Sahabat-sahabat SMA dan SMP ku Diah Ayu Ratna Sari, A.Md. Kep, Andi Nurhayati, A.Md. Keb, Muhammad Adam, dan Rahma Dhamayanti atas pertemanan, persaudaraan, doa, bantuan, kebersamaan, serta motivasinya hingga saat ini.
13. *Sambalado Squad*, Esti, Kiki, Fika, Monica, Vyna, Tyas, Melia, Nabilla, Widya. Terima kasih atas canda tawa, pertemanan, dan segala motivasi serta semangat yang telah diberikan hingga saat ini.
14. Yandri's Research Group, Fika, Sinta, Nia, Khomsatun, Maya, Ezra, Yuni, Mba Putri, Mba Syatira, Mba Fifi, Teh Didi atas kebersamaan, bantuan, serta semangatnya.
15. Teman-teman Kimia angkatan 2013, Aulia, Badiatul,Dewi Rumondang,Fatimah, Fera, Fika, Hermayana, Khalimatus, Indah, Yudha, Esti, Kiki, Nova, Linda, Lulu, Anita, Dona, Megafit, Mawar, Nabilla, Renita,

Siti, Tya, Yulia, Uut, Vero, Widya, Yunitri, Della, Eky, Yuvica, Inggit, Awan, Vicka, Arief, Oci, Maya, Nora, Atun, Diki, Shela, Vyna, Bara, Padila, Wahyuni, Kurnia, Yolanda, Murnita, Nurma, Erva, Ismi, Eka Oso, Febri, Paul, Fentri, Riska, Eka, Shelta, Nia, Nurul, Ana, Nita, Anggi, Gesa, Tika, Yuni, Celli, Rian, Tyas, Anggun, Radho, Arni, Sinta, Anton, Melita, Melia, Monica, Citra, Kartika, Ezra, Ridho, Yunita, Verdi, Korina, Doddy, dan Amha.

16. Sahabat-sahabat ku “*goa dan pantai*” Guntur Hariaji W, Muhammad Iben Sardio, Muhammad Suprayogi, Rendi Pasaribu, Agus Sudarno, Riski Rahmadani, Fika Putri Aulia, Esti Sandra Pertiwi, dan Meiliza yang telah membantu dan memberikan motivasi serta canda tawa dan segala hal gila yang telah dilakukan bersama. SEE U ON TOP GUYSS.
17. Teman-teman KKN Negeri Ratu, Lampung Tengah Kak Bihikmi, Azizah, Kak Rifa, Lisa, Fauza, Gusti. Terima kasih sudah menjadi pendatang yang sangat berkesan. Semoga kita akan selalu mengingat 40 hari kebersamaan kita.
18. *Mumi Pansel*. Laila, Nelly, Mba Yana, Khoir, Kak Puput, Kak Royan, Opik, Oki, Hamam, Reza, Alvin, Riki, Amin, Kak Yuda. Alhamdulillah jaza kumullohu khoiro atas semua bantuan, kebersamaan, serta motivasinya hingga saat ini.
19. Teman-teman baruku berbeda pulau dan provinsi “Anu-Anu Lover Club”, Fatikha Jakarta, Ais Kalimantan, Meta Padang, Kak Sophia Aceh, Bianca Bali. Terima kasih atas canda tawa, *partner* curhat, kekeluargaan, kemicinan di dunia per-WWan, dan pertemanan LDR kita.

20. Tim Lampung Squad didunia WWIR , Sherina, Yudi, Supran, Dwi, Prass, Venti. Temen Micin WWIR Nad, Kabong, Katif, Pala, Kasten, Kupoh, Gigi, KakFir, KakSan, Fadil, Dino, KakTe, Mail, Izzi, Rachman dan 1700 member lainnya. Terimakasih kegabutan, kemicinan, pertengkaran, kebaperan, rasa sayang, kekeluargaan yang telah diberikan pada penulis.
21. Keluarga besar HIMAKI periode 2015/2016 atas pengalaman dan semangatnya.
22. Keluarga besar kimia angkatan 2011, 2012, 2014, dan 2015 yang telah membantu serta mendoakan.
23. Seluruh keluarga besar Jurusan Kimia.
24. Almamater tercinta, Universitas Lampung.
25. Semua pihak yang telah membantu penulis selama kuliah, penelitian, hingga penulisan skripsi ini.

Semoga Allah SWT membalas kebaikan mereka serta senantiasa menjaga mereka dalam lindungan-Nya. *Aamiin*. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan kesalahan, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi perbaikan penulisan di masa datang.

Bandar Lampung, Januari 2018
Penulis

Mia Permatasari

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	3
C. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Enzim	5
1. Klasifikasi enzim	6
2. Sifat katalitik enzim	8
3. Aktivitas enzimatik	9
4. Teori pembentukan enzim substrat	14
5. Sifat-sifat enzim	15
B. Enzim Selulase.....	18
C. Selulosa.....	20
D. <i>Bacillus subtilis</i>	21
E. Kinetika Reaksi Enzim	22
F. Stabilitas Enzim	25
1. Stabilitas termal enzim	27
2. Stabilitas pH enzim	28
G. Isolasi Enzim.....	29
H. Pemurnian Enzim.....	31

I. Aktivitas Enzim Selulase	36
J. Penentuan Aktivitas Enzim Selulase Dengan Metode Mandels	38
K. Penentuan Kadar Protein Dengan Metode Lowry	39
L. Amobilisasi Enzim.....	40
1. Carrier-binding.....	40
2. Metode pengikatan silangan (Cross-linking).....	42
3. Metode penjebakan enzim	43
M. Zeolit	43
III. METODE PENELITIAN.....	46
A. Waktu dan Tempat Penelitian	46
B. Alat dan Bahan.....	46
C. Prosedur Penelitian	47
1. Persiapan pendahuluan	47
2. Pembuatan media inokulum media fermentasi, inokulasi <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148 dan produksi enzim selulase.....	47
3. Isolasi enzim selulase	49
4. Uji aktivitas enzim selulase metode Mandels	49
5. Penentuan kadar protein metode Lowry	50
6. Pemurnian enzim selulase	51
7. Amobilisasi enzim selulase menggunakan zeolit.....	53
8. Karakterisasi enzim selulase	54
9. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi	55
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	58
A. Produksi dan Isolasi Enzim Selulase	58
B. Pemurnian Enzim Selulase	59
C. Penentuan pH Optimum Pengikatan Amobilisasi Enzim Selulase	63
D. Karakterisasi Enzim Selulase Hasil Pemurnian dan Hasil Amobilisasi	64
1. Penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi.....	64
2. Penentuan stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	66
3. Penentuan K_M dan V_{maks} enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi.....	67
4. Pemakaian enzim berulang.....	70
E. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (G_i) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Amobilisasi	71
1. Waktu paruh ($t_{1/2}$) dan konstanta laju inaktivasi termal (k_i).....	72

2. Perubahan energi akibat denaturasi (G_i).....	73
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	74
A. Kesimpulan	74
B. Saran	75
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN.....	82

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Aktivitas dan kemurnian enzim selulase hasil isolasi dan hasil pemurnian dari <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148.....	62
2. 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	71
3. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas unit enzim selulase	83
4. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat (0-15%) dan (15-90%) dengan aktivitas unit enzim	83
5. Hubungan antara suhu ($^{\circ}\text{C}$) aktivitas enzim selulase hasil pemurnian	84
6. Hubungan antara suhu ($^{\circ}\text{C}$) aktivitas enzim selulase hasil amobilisasi	84
7. Hubungan antara aktivitas unit (U/mL) enzim selulase hasil pemurnian selama inaktivasi termal 100 menit.....	85
8. Hubungan antara aktivitas unit (U/mL) enzim selulase hasil amobilisasi selama inaktivasi termal 100 menit.....	85
9. Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil pemurnian pada suhu 55°C	86
10. Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim hasil amobilisasi pada suhu 60°C	86
11. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim selulase hasil pemurnian berdasarkan persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	89
12. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim selulase hasil amobilisasi berdasarkan persamaan <i>Lineweaver-Burk</i>	89

13. Hubungan antara pengulangan enzim selulase hasil amobilisasi dengan aktivitas unit (U/mL)..... 90
14. Absorbansi glukosa pada berbagai konsentrasi untuk menentukan kurva standar glukosa..... 91
15. Absorbansi serum albumin (BSA) pada berbagai konsentrasi untuk menentukan kurva standar protein 93

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim.....	10
2. Pengaruh pH terhadap kecepatan reaksi	11
3. Hubungan laju reaksi dengan konsentrasi enzim.....	12
4. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim	13
5. Mekanisme reaksi enzim berdasarkan teori kunci gembok dan teori induksi.....	15
6. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase.....	19
7. Struktur selulosa.....	21
8. <i>Bacillus subtilis</i>	22
9. Diagram <i>Lineweaver-Burk</i>	25
10. Proses pengendapan protein	34
11. Proses pemisahan protein dengan dialisis.....	36
12. Kerangka utama zeolit	45
13. Skema proses fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat	52
14. Diagram alir penelitian.....	57
15. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas unit enzim selulase dari <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148.....	61
16. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat (0-15%) dan (15-90%) dengan aktivitas unit enzim selulase dari <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148	62

17. Aktivitas unit enzim selulase pada beberapa pH pengikatan	64
18. Suhu optimum enzim selulase hasil pemurnian dan enzim selulase hasil amobilisasi	66
19. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan amobilisasi	67
20. Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi	68
21. Pemakaian berulang enzim hasil amobilisasi.....	70
22. Hubungan $\ln (E_i/E_0)$ enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi untuk penentuan nilai k_i , waktu paruh, dan G_i	72
23. Kurva standar glukosa.....	91
24. Kurva standar serum albumin	93

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kebutuhan akan enzim semakin meningkat setiap harinya sesuai dengan kemajuan industri. Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalis untuk proses biokimia. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada tanpa menggunakan katalis (Poedjiadi, 1994). Salah satu enzim yang memiliki peranan penting adalah enzim selulase.

Selulase merupakan enzim yang mampu menguraikan selulosa menjadi senyawa yang lebih sederhana, yaitu glukosa (Schledel *and* Schmidt, 1994). Enzim selulase adalah enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik yang di dalam media hidupnya terhadap selulosa (Rahayu, 1991). Selulosa berperan sebagai inducer dalam sintesis selulase yang memiliki dua fungsi yaitu, sebagai inducer pada sintesis enzim dan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan sel (Afsahi, 2007).

Enzim selulase digunakan secara luas dalam industri tekstil, deterjen, pulp, dan kertas. Enzim selulase juga digunakan dalam pengolahan kopi (Aehle, 2004) dan terkadang digunakan dalam industri farmasi sebagai zat untuk membantu sistem pencernaan. Enzim selulase juga dimanfaatkan dalam proses fermentasi dari biomassa menjadi biofuel, seperti bioetanol. Saat ini enzim selulase juga

digunakan sebagai pengganti bahan kimia pada proses pembuatan alkohol dari bahan yang mengandung selulosa (Fan *dkk.*,1982).

Pada proses industri, sifat dan karakteristik enzim sangat diperlukan agar proses produksi lebih efisien dan dapat diperoleh produk akhir yang berkualitas.

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 *and* Sherrington, 1994) dan tahan terhadap keadaan pH ekstrim ($< \text{pH } 4,5$ dan $> \text{pH } 8$) (Williamson *and* Fieser, 1992). Pada umumnya enzim hanya mampu bekerja pada kondisi fisiologis dan tidak tahan terhadap kondisi ekstrim (Goddatte, 1993). Untuk mendapatkan enzim yang mempunyai kestabilan dan aktivitas yang tinggi, maka dapat dilakukan dengan isolasi langsung dari organisme yang terdapat di alam dan hidup pada kondisi tertentu atau dengan cara amobilisasi, mutagenesis, dan modifikasi kimia (Mozhaev *and* Martinek, 1984).

Amobilisasi enzim berarti proses pengikatan atau penjebakan enzim pada sebuah media pendukung. Amobilisasi dalam bioteknologi didefinisikan sebagai suatu cara yang digunakan untuk menempatkan secara fisika atau kimia suatu sel, organel, enzim atau protein lainnya ke dalam suatu penyangga berupa bahan padat, matriks, atau membran (Winarno, 1989). Keunggulan penggunaan enzim amobil dalam industri adalah dapat digunakan berulang, mengurangi biaya, meningkatkan daya guna, tahan terhadap kondisi ekstrim, produk tidak dipengaruhi oleh enzim dan lain-lain (Payne *et al.*, 1992).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan peningkatan kestabilan enzim protease dan α -amilase menggunakan zeolit. Amobilisasi enzim menggunakan zeolit untuk enzim protease (Uswatun, 2016) dan enzim α -amilase (Septiani dan Lisma, 2011) terbukti dapat meningkatkan stabilitas enzim. Untuk enzim α -amilase sebelum diamobil kondisi optimumnya pada suhu 35°C, pH 5,6 dan waktu inkubasi 35 menit dengan aktivitas unit sebesar 0,04845 U/ml. Sedangkan untuk enzim α -amilase setelah diamobil kondisi optimumnya pada suhu 50°C pada pH 5,6 dan waktu inkubasi 45 menit dengan aktivitas unit sebesar 0,030036 U/mL dan enzim hasil amobilisasi dapat digunakan sebanyak 3 kali pengulangan. Untuk enzim protease sebelum diamobil kondisi optimumnya pada suhu 50°C. Sedangkan setelah amobilisasi kondisi optimumnya pada suhu 55°C dan penggunaan zeolit telah berhasil meningkatkan 2,5 kali stabilitas termal enzim protease.

Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan amobilisasi enzim selulase yang diisolasi dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan zeolit sebagai media pendukung. Amobilisasi diharapkan dapat meningkatkan stabilitas enzim. Menggunakan zeolit untuk mengikat enzim karena zeolit mempunyai pori-pori atau situs aktif yang memiliki kemampuan dalam mengadsorpsi (Sutarti dan Rachmawati, 1994).

B. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 pada kondisi

optimum sehingga diperoleh aktivitas unit terbaik dan tingkat kemurnian yang tinggi

2. Memperoleh enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan kestabilan yang tinggi melalui amobilisasi menggunakan zeolit.
3. Melakukan karakterisasi enzim selulase hasil pemurnian dan hasil amobilisasi meliputi penentuan pH dan suhu optimum, penentuan nilai K_M dan V_{maks} , penentuan nilai k_i , $t_{1/2}$ dan G_i sehingga diperoleh informasi mengenai pengaruh amobilisasi menggunakan zeolit.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukannya penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi cara isolasi dan pemurnian enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148.
2. Memberikan informasi tentang cara meningkatkan kestabilan enzim selulase dengan amobilisasi.
3. Memberikan informasi tentang pengaruh zeolit terhadap stabilitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148.
4. Enzim selulase dengan stabilitas yang tinggi dapat digunakan dalam proses-proses industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim

Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran lingkungan dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi, bersifat spesifik dan tidak beracun. Enzim telah dimanfaatkan secara luas pada berbagai industri produk pertanian, kimia dan industri obat-obatan. Tiga sifat utama dari biokatalisator adalah menaikkan kecepatan reaksi, mempunyai kekhususan dalam reaksi dan produk serta kontrol kinetik (Akhdiya, 2003).

Enzim memegang peranan penting dalam proses pencernaan makanan maupun proses metabolisme zat-zat makanan dalam tubuh. Fungsi enzim adalah mengurangi energi aktivasi, yaitu energi yang diperlukan untuk mencapai status transisi (suatu bentuk dengan tingkat energi tertinggi) dalam suatu reaksi kimiawi. Suatu reaksi yang di katalisis oleh enzim mempunyai energi aktivasi yang lebih rendah, dengan demikian membutuhkan lebih sedikit energi untuk berlangsungnya reaksi tersebut. Enzim mempercepat reaksi kimiawi secara spesifik tanpa pembentukan hasil samping dan bekerja pada larutan dengan keadaan suhu dan pH tertentu. Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh beberapa

faktor, seperti konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, suhu dan pH (Pelczar dan Chan, 1986).

Enzim dapat diperoleh dari sel-sel hidup dan dapat bekerja baik untuk reaksi-reaksi yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel. Pemanfaatan enzim untuk reaksi-reaksi yang terjadi di luar sel banyak diaplikasikan dalam dunia industri seperti industri makanan, deterjen, penyamakan kulit, kosmetik, dll (Moon dan Parulekar, 1993). Pemanfaatan enzim dapat dilakukan secara langsung menggunakan enzim hasil isolasi maupun dengan cara pemanfaatan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim yang diinginkan.

Enzim dapat diperoleh dari makhluk hidup seperti hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Beberapa contoh enzim protease yang bersumber dari tumbuhan yaitu bromelin dari nanas, papain dari pepaya, lisozim dari putih telur. Meskipun banyak sumber dapat menghasilkan enzim yang berasal dari hewan dan tumbuhan, namun pemanfaatan mikroorganisme sebagai sumber enzim lebih banyak diminati, karena enzim dari mikroorganisme dapat dihasilkan dalam waktu yang sangat singkat, mudah diproduksi dalam skala besar, proses produksi bisa dikontrol, kemungkinan terkontaminasi oleh senyawa-senyawa lain lebih kecil, dan dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relatif rendah (Thomas, 1989).

1. **Klasifikasi enzim**

Klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut (Lehninger, 1993) :

a. 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.
- b. 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 (Lehninger, 1993).
- c. Berdasarkan tipe reaksi yang diketahui, enzim dibagi menjadi enam kelompok :
1. Oksidoreduktase
Enzim oksidoreduktase adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan. Dalam golongan enzim ini terdapat 2 macam enzim yang paling utama yaitu oksidase dan dehidrogenase. Oksidase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi antara substrat dengan molekul oksigen. Dehidrogenase adalah enzim yang aktif dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat.
 2. Transferase
Enzim transferase adalah enzim yang ikut serta dalam reaksi pemindahan (transfer) suatu gugus.

3. Hidrolase

Enzim hidrolase adalah kelompok enzim yang sangat penting dalam pengolahan pangan, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat dengan pertolongan molekul air. Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini diantaranya adalah amilase, invertase, selulase, dan sebagainya.

4. Liase

Enzim liase merupakan enzim yang aktif dalam pemecahan ikatan C-C dan C-O dengan tidak menggunakan molekul air.

5. Isomerase

Enzim isomerase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom substrat, sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrat atau dengan perubahan isomer posisi misalnya mengubah aldosa menjadi ketosa.

6. Ligase

Enzim ligase adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan-ikatan tertentu, misalnya pembentukan ikatan C-C, C-O, dan C-S dalam biosintesis koenzim A serta pembentukan ikatan C-N dalam sintesis glutamin (Winarno, 1989).

2. Sifat katalitik enzim

Sifat-sifat katalitik enzim adalah sebagai berikut :

- a. Enzim mampu meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu, dan pH.

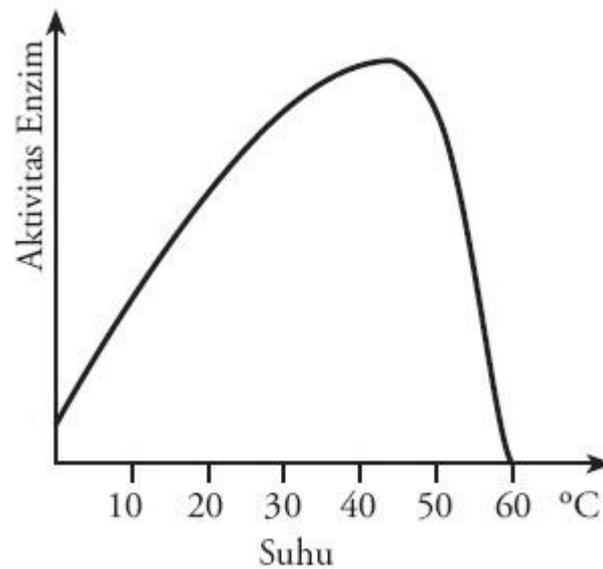
- b. Enzim mempunyai selektifitas tinggi terhadap substrat (substansi yang mengalami perubahan kimia setelah bercampur dengan enzim) dan jenis reaksi yang dikatalisis.
- c. Enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang tinggi dibanding dengan katalis biasa (Page, 1989).

3. **Aktivitas Enzimatik**

Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah sebagai berikut :

a. Pengaruh suhu

Aktivitas kerja enzim dipengaruhi oleh temperatur lingkungan dimana enzim bekerja. Sama seperti reaksi kimia biasa, suhu biasanya dapat mempercepat proses reaksi, namun demikian pada titik suhu tertentu kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim akan mulai menurun bahkan aktivitasnya tidak lagi nampak. Kondisi suhu dimana enzim dapat menghasilkan aktivitas tertinggi dinamakan suhu atau temperatur optimum. Oleh karena enzim berstruktur protein, sebagaimana diketahui bahwa protein dapat dirusak oleh panas, sehingga pada suhu tinggi tertentu aktivitas enzim mulai menurun dan bahkan aktivitasnya menghilang. Hal ini sangat dimungkinkan karena terjadinya denaturasi atau kerusakan struktur enzim yang dapat menyebabkan kerusakan enzim baik secara keseluruhan maupun sebagian terutama sisi aktifnya. Hubungan antara pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dapat digambarkan dengan kurva pada Gambar 1 berikut :



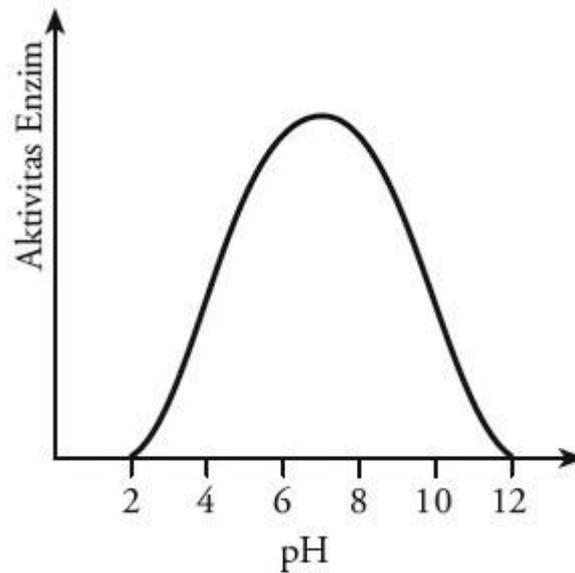
Gambar 1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim (Poedjiadi, 1994).

b. Pengaruh pH

Enzim sebagai biokatalisator berstruktur protein, dalam mekanisme kerja aktivitasnya dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, pH, suhu, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, kehadiran aktivator atau inhibitor (Poedjiadi, 1994).

Potensial Hidrogen (pH) merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan apabila bekerja dengan enzim, hal ini dikarenakan enzim hanya mampu bekerja pada kondisi pH tertentu saja. Suatu kondisi pH dimana enzim dapat bekerja dengan aktivitas tertinggi yang dapat dilakukannya dinamakan pH optimum. Sebaliknya pada pH tertentu enzim sama sekali tidak aktif atau bahkan rusak. Hal ini dapat dijelaskan karena diketahui bahwa enzim merupakan molekul protein, molekul protein kestabilannya dapat dipengaruhi oleh tingkat keasaman lingkungan, pada kondisi keasaman yang ekstrim molekul-molekul

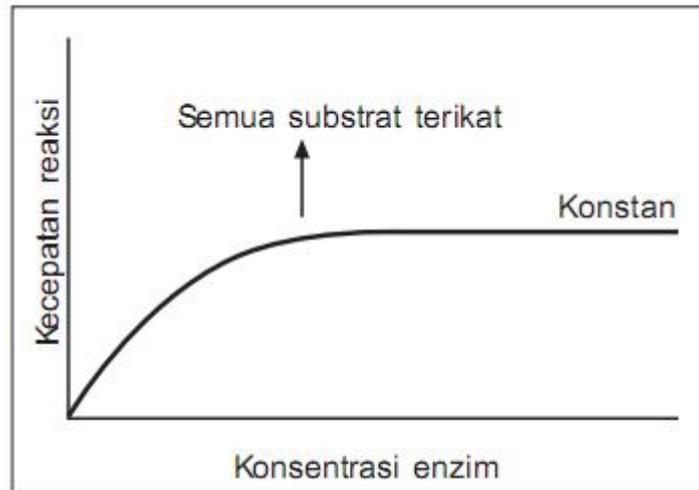
protein dari enzim akan rusak. Hubungan antara pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dapat digambarkan dengan kurva pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim (Poedjiadi, 1994).

c. Pengaruh konsentrasi enzim

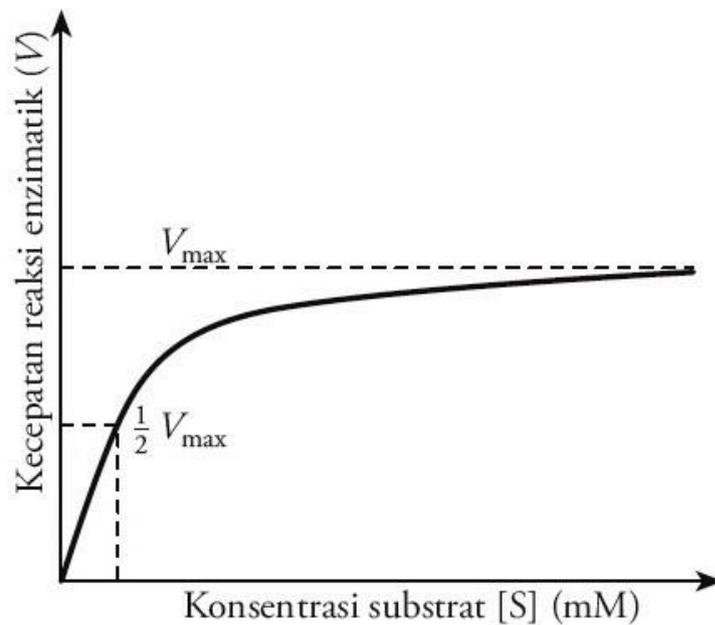
Seperti pada katalis lain, kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Hubungan antara pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim dapat digambarkan dengan kurva pada Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan laju reaksi dengan konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994).

d. Pengaruh konsentrasi substrat

Reaksi-reaksi biokimia yang dikatalisis oleh enzim dipengaruhi pula oleh jumlah substrat. Jika melakukan pengujian konsentrasi substrat dari rendah ke tinggi terhadap kecepatan reaksi enzimatik, maka pada awalnya akan diperoleh hubungan kesebandingan yang menyatakan kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, namun kemudian akan diperoleh data yang menyatakan pada konsentrasi substrat tinggi tertentu kecepatan reaksi tidak lagi bertambah. Pada kondisi ini konsentrasi substrat menjadi jenuh dan kecepatan reaksi menjadi maksimum yang sering juga disebut sebagai kecepatan maksimum (V_{max}). Hubungan antara pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim dapat digambarkan dengan kurva pada Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim (Poedjiadi,1994).

e. Aktivator dan inhibitor

Sejumlah besar enzim membutuhkan suatu komponen lain untuk dapat berfungsi sebagai katalis. Komponen ini secara umum disebut kofaktor. Kofaktor ini dapat dibagi dalam tiga kelompok, yaitu : gugus prostetik, koenzim dan aktivator. Aktivator pada umumnya ialah ion-ion logam yang dapat terikat atau mudah terlepas dari enzim. Contoh aktivator logam adalah K^+ , Mn^+ , Mg^+ , Cu^+ , atau Zn^+ (Poedjiadi, 1994).

Mekanisme enzim dalam suatu reaksi ialah melalui pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Oleh karena itu hambatan atau inhibisi pada suatu reaksi yang menggunakan enzim sebagai katalis dapat terjadi apabila penggabungan substrat pada bagian aktif enzim mengalami hambatan. Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut

dinamakan inhibitor (Poedjiadi, 1994).

4. Teori Pembentukan Enzim Substrat

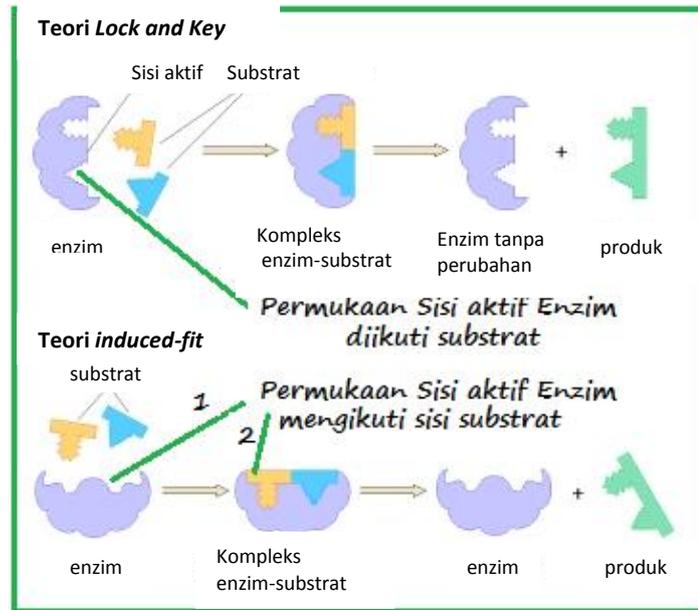
Ada 2 teori yang menerangkan pembentukan kompleks enzim-substrat, yaitu :

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

Fischer mengusulkan model *lock and key* (gembok dan kunci), substrat sebagai kunci dan situs aktif sebagai gembok. Substrat akan langsung mengikat pasangan komplementer pada situs aktif. Substrat yang terlalu besar tidak dapat menempati situs aktif dan substrat yang terlalu kecil tidak dapat menempati dengan tepat (Armstrong, 1983).

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

Daniel Koshland memodifikasi model *lock and key* dan menyarankan model tangan dan sarung tangan (kecocokan induksi), dimana situs aktif tidak kaku (kaku) atau fleksibel. Pada awalnya, bentuk situs aktif tidak sesuai dengan bentuk substrat. Ketika substrat menempel pada situs aktif, maka enzim akan terinduksi dan menyesuaikan bentuk substrat, sehingga terbentuk struktur yang komplementer seperti pada Gambar 5 (Rastogi, 1995).



Gambar 5. Mekanisme reaksi enzim berdasarkan teori kunci gembok dan teori induksi (Rastogi, 1995).

5. Sifat-sifat enzim

Spesifitas enzim sangat tinggi terhadap substratnya. Substrat adalah reaktan yang diolah pada reaksi yang dikatalisasi oleh enzim (enzimatik). Enzim memiliki sifat khas terhadap suatu substrat tertentu, kekhasan inilah yang menjadi ciri suatu enzim. Adapun sifat-sifat khas yang dimiliki suatu enzim tersebut antara lain:

a. Sebagai katalisator

Sifat-sifat enzim yang pertama ialah ia berperan sebagai katalisator. Enzim adalah katalis yang dapat mengubah laju reaksi tanpa ikut bereaksi. Tanpa kehadiran enzim, suatu reaksi itu sangat sukar terjadi, sementara dengan kehadiran enzim kecepatan reaksinya dapat meningkat $10^8 - 10^{11}$ kali.

b. Enzim bekerja secara spesifik dan selektif

Enzim bekerja secara spesifik, artinya enzim tertentu hanya dapat mengadakan perubahan pada zat tertentu pula. Dengan kata lain, enzim hanya dapat mempengaruhi satu reaksi dan tidak dapat mempengaruhi reaksi lain yang bukan bidangnya. Satu enzim khusus untuk satu substrat, misalnya enzim katalase hanya mampu menghidrolisis H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 .

c. Enzim bersifat bolak-balik

Sifat-sifat enzim selanjutnya adalah bekerja bolak-balik karena dapat ikut bereaksi tanpa mempengaruhi hasil akhir dan akan terbentuk kembali pada hasil reaksi sebagai enzim. Ketika ikut bereaksi, struktur kimia enzim berubah, tetapi pada akhir reaksi struktur kimia enzim akan terbentuk kembali seperti semula.

Misalnya enzim lipase dapat mengubah lemak menjadi asam lemak dan gliserol. Sebaliknya, lipase juga mampu menyatukan gliserol dan asam lemak menjadi lemak. Enzim tidak hanya menguraikan molekul kompleks, tetapi juga dapat membentuk molekul kompleks dari molekul-molekul sederhana penyusunnya (reaksi bolak-balik).

d. Enzim bersifat termolabil

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh suhu. Jika suhu rendah, kerja enzim akan lambat. Semakin tinggi suhu reaksi kimia yang dipengaruhi enzim semakin cepat, tetapi jika suhu terlalu tinggi, enzim akan mengalami denaturasi.

e. Seperti protein

Enzim memiliki sebagian besar sifat protein yaitu dipengaruhi oleh suhu dan pH. Pada suhu rendah protein enzim akan mengalami koagulasi dan pada suhu tinggi akan mengalami denaturasi.

f. Hanya diperlukan dalam jumlah sedikit

Oleh karena enzim berfungsi sebagai katalisator, tetapi tidak ikut bereaksi, maka jumlah yang dipakai sebagai katalis tidak perlu banyak. Satu molekul enzim dapat bekerja berkali-kali, selama molekul tersebut tidak rusak.

g. Merupakan koloid

Karena enzim tersusun atas komponen protein, maka sifat-sifat enzim tergolong koloid. Enzim memiliki permukaan antar partikel yang sangat besar sehingga bidang aktivitasnya juga besar.

h. Enzim mampu menurunkan energi aktivitas

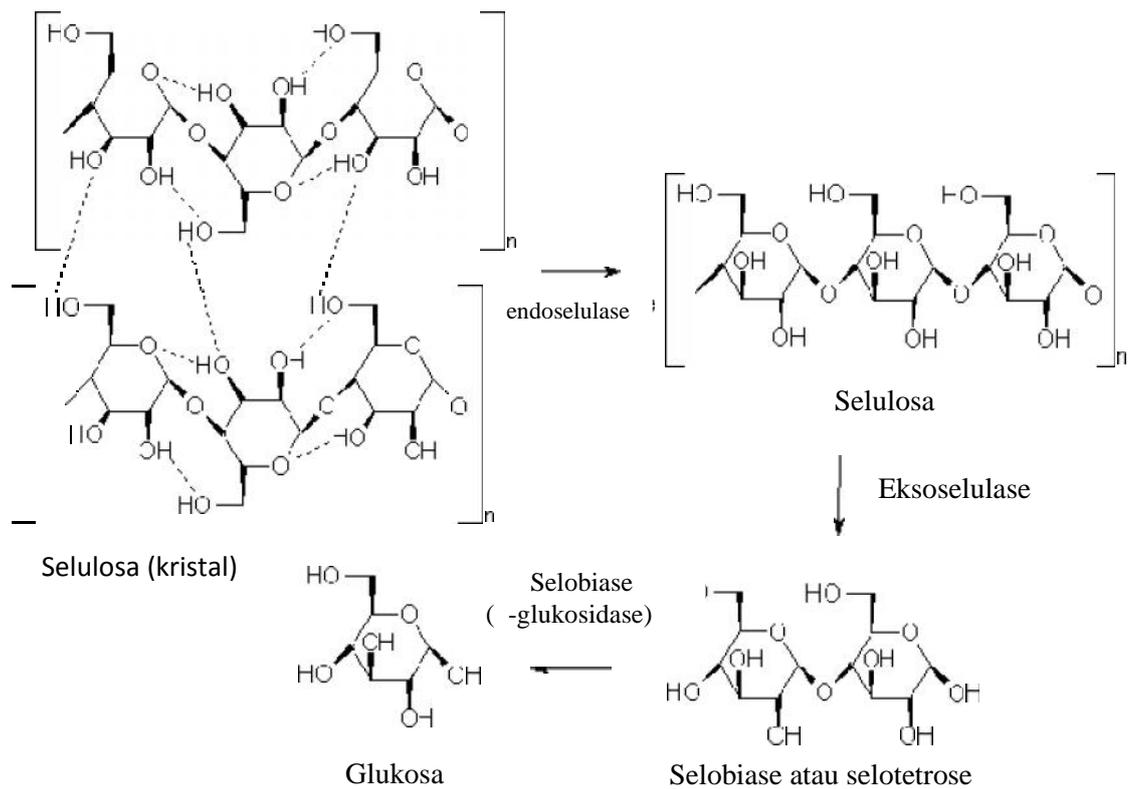
Suatu reaksi kimia dapat terjadi jika molekul yang terlibat memiliki cukup energi internal untuk membawanya ke puncak bukit energi menuju bentuk reaktif yang disebut tahap transisi. Energi aktivasi suatu reaksi adalah jumlah energi dalam kalori yang diperlukan untuk membawa semua molekul pada 1 mol senyawa pada suhu tertentu menuju tingkat transisi pada puncak batas energi. Apabila suatu reaksi kimia ditambahkan katalis yaitu enzim, maka energi aktivasi dapat diturunkan dan reaksi akan berjalan dengan lebih cepat (Shahib, 2005).

B. Enzim Selulase

Selulase merupakan salah satu enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme.

Enzim selulase memegang peranan penting dalam proses biokonversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa, protein sel tunggal, makanan ternak, etanol dan lain-lain (Chalal, 1983). Selulase adalah enzim yang dapat menghidrolisis ikatan (1-4) pada selulosa. Selulase termasuk sistem multienzim yang terdiri dari tiga komponen. Untuk menghidrolisis selulosa yang tidak larut atau selulosa kristal diperlukan kerja sinergistik dari ketiga komponen enzim tersebut. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase dapat dilihat dalam Gambar 6. Adapun ketiga komponen enzim tersebut, yaitu (Ikram dkk., 2005):

- a. Endo-1,4- β -D-glucanase (endoselulase, carboxymethylcellulase atau CMCCase) yang mengurai polimer selulosa secara random pada ikatan internal -1,4-glikosida untuk menghasilkan oligodekstrin dengan panjang rantai yang bervariasi.
- b. Exo-1,4- β -D-glucanase (cellobiohydrolase), yang mengurai selulosa dari ujung pereduksi dan non-pereduksi untuk menghasilkan selulosa dan atau glukosa.
- c. β -glucosidase (cellobiase), yang mengurai selobiosa untuk menghasilkan glukosa.



Gambar 6. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase (Ikram dkk., 2005).

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

Hidrolisis enzimatik memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis asam, antara lain: tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (suhu rendah, pH netral) dapat dilakukan pada temperatur ruang dan

tekanan atmosfer, berpotensi memberikan hasil yang tinggi, dan biaya pemeliharaan peralatan relatif rendah karena tidak ada bahan yang korosif (Muchtadi *dkk.*, 1992), efisiensi reaksi tinggi karena enzim bersifat selektif sehingga pembentukan produk samping dapat diminimalisasi. Kelemahan menggunakan enzim memang memerlukan waktu yang lebih lama daripada dengan menggunakan asam tetapi lebih ramah lingkungan. Waktu yang dibutuhkan bisa mencapai 72 jam.

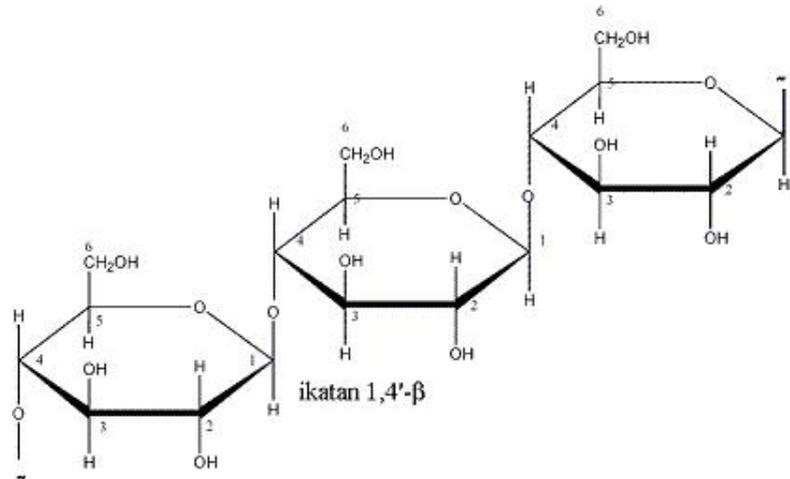
Enzim selulase memiliki aplikasi yang luas dan potensial dalam bidang makanan, pakan ternak, tekstil, bahan bakar, industri kimia, industri pulp dan kertas, pengolahan limbah, industri farmasi, produksi protoplas, dan teknik genetik (Coughlan, 1995).

C. Selulosa

Selulosa merupakan biomolekul yang paling banyak ditemukan di alam dan unsur utama penyusun kerangka tumbuhan. Diperkirakan sekitar 10^{11} ton selulosa dibiosintesis tiap tahun. Daun kering mengandung 10-20% selulosa, kayu 50% dan kapas 90% (Koolman, 2001). 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 bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa dapat dihidrolisis menjadi gula-gula sederhana dengan menggunakan katalis asam, enzim maupun mikroba selulolitik. Beberapa penelitian melaporkan bahwa proses hidrolisis secara enzimatik lebih menguntungkan daripada menggunakan asam. Selain tidak

menimbulkan masalah korosi dan berlangsung pada kondisi *mild* (pH 4,8 dan suhu 50°C), proses hidrolisis secara enzimatik juga menghasilkan *yield* lebih tinggi daripada hidrolisis yang dikatalisis asam (Duff and Murray, 1996).



Gambar 7. Struktur Selulosa (Koolman, 2001)

D. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis termasuk jenis *Bacillus*. Bakteri ini termasuk bakteri gram positif, katalase positif yang umum ditemukan di tanah. *Bacillus subtilis* mempunyai kemampuan untuk membentuk endospora yang protektif yang memberi kemampuan bakteri tersebut mentolerir keadaan yang ekstrim. Tidak seperti species lain seperti sejarah, *Bacillus subtilis* diklasifikasikan sebagai obligat anaerob walau penelitian sekarang tidak benar. *Bacillus subtilis* tidak dianggap sebagai patogen walaupun kontaminasi makanan tetapi jarang menyebabkan keracunan makanan. Sporangya dapat tahan terhadap panas tinggi yang sering digunakan pada makanan dan bertanggung jawab terhadap kerusakan pada roti (Priest, 1993).

Bacillus subtilis selnya berbentuk basil, ada yang tebal dan yang tipis. Biasanya bentuk rantai atau terpisah. Semua membentuk endospora yang berbentuk bulat dan oval. *Baccillus subtilis* merupakan jenis kelompok bakteri termofilik yang dapat tumbuh pada kisaran suhu $45^{\circ}\text{C} - 55^{\circ}\text{C}$ dan mempunyai pertumbuhan suhu optimum pada suhu $60^{\circ}\text{C} - 80^{\circ}\text{C}$ dan tumbuh pada kisaran pH 7-8 (Gupte, 1990).



Gambar 8. *Bacillus subtilis* (Gupte,1990).

E. Kinetika Reaksi Enzim

Kinetika reaksi enzimatik dapat digunakan untuk menentukan kadar enzim. Kinetika reaksi enzimatik dapat diukur dengan mengukur jumlah substrat yang diubah atau produk yang dihasilkan per satuan waktu, dan pada suatu waktu yang sangat pendek, atau pada satu titik tertentu pada grafik disebut kecepatan sesaat (*instantaneous velocity*). Kecepatan sesaat merupakan tangens dari garis singgung terhadap grafik pada suatu titik tertentu. Kecepatan sesaat pada waktu mendekati nol, yaitu saat grafik masih berupa garis lurus disebut kecepatan awal (V_0). Pada

reaksi enzimatik, jika disebut kecepatan, umumnya yang dimaksud adalah kecepatan awal. Hal ini disebabkan karena pada keadaan awal reaksi, kita dapat mengetahui kondisi atau keadaan dengan lebih tepat. Disamping kecepatan sesaat dan V_0 , juga dikenal istilah kecepatan rata-rata, yaitu perbandingan antara perubahan jumlah substrat terhadap waktu (Poedjiadi, 1994).

Kinetika enzim adalah perihal bagaimana enzim mengikat substrat dan mengubahnya menjadi produk. Pada kinetika enzim dikenal dengan kurva saturasi yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi substrat $[S]$ dan laju (V). Enzim dapat mengkatalisis reaksi hingga beberapa juta reaksi perdetik. Dalam kinetika enzim dikenal dengan keberadaan konstanta Michaelis-Menten (K_M) yang merupakan konsentrasi substrat yang diperlukan untuk enzim mencapai setengah kecepatan maksimum (V_{maks}). Setiap enzim memiliki karakteristik K_M tertentu untuk substrat tertentu juga. K_M sendiri menunjukkan seberapa ketat pengikatan substrat untuk enzim. Konstanta lain pada pembahasan kinetika enzim adalah K_{cat} yang memberikan nilai dari jumlah molekul substrat yang ditangani oleh satu situs aktif per detik. Sedangkan efisiensi dari enzim dinyatakan oleh K_{cat}/K_M (Marzuki, 2014).

Salah satu kontribusi utama Henri-Michaelis-Menten pada kinetika enzim adalah memandang reaksi enzim sebagai dua tahapan. Pada tahap pertama, substrat terikat ke enzim secara *reversible*, membentuk kompleks enzim-substrat. Kompleks ini kadang-kadang disebut sebagai kompleks Michaelis. Enzim kemudian mengkatalisis reaksi kimia dan melepaskan produk.

Reaksi enzim pada substrat berlangsung melalui pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Nilai maksimal atau V_{maks} akan tercapai jika sistem atau keadaan ES dijejihkan oleh substrat.



Dengan : E = Enzim

S = Substrat

P = Produk

Untuk persamaan Michaelis-Menten :

$$V_0 = \frac{V_{\text{maks}} [S]}{(K_M + [S])}$$

Dengan : V_0 = Laju awal

V_{maks} = Laju maksimum

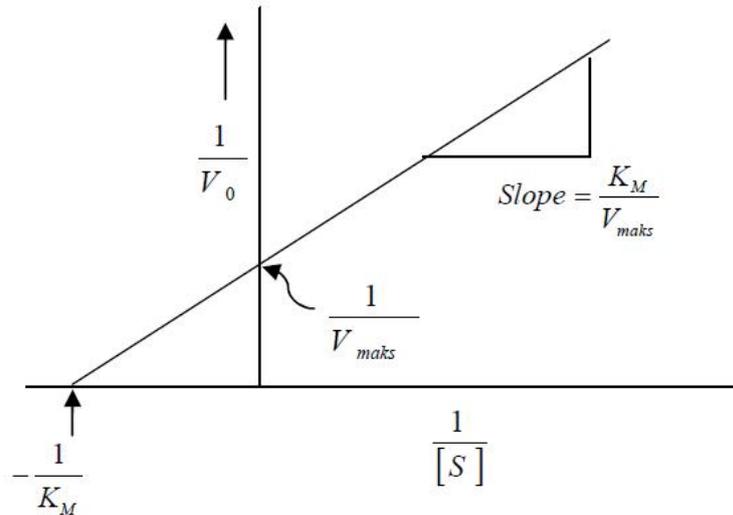
[S] = Konsentrasi substrat

K_M = Konstanta Michaelis-Menten

Penentuan nilai V_{maks} dan K_M langsung dari grafik persamaan Michaelis-Mente tidaklah selalu memuaskan karena grafiknya membentuk kurva sehingga menyulitkan untuk melakukan ekstrapolasi dengan akurat. Lineweaver-Burk (1934) menyelesaikan masalah diatas dengan menata ulang persamaan Michaelis-Menten ke dalam bentuk persamaan linear :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\text{max}}[S]} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

Nilai V_{maks} dan K_M ditentukan dengan plot Lineweaver-Burk seperti pada Gambar 9.



Gambar 9. Diagram *Lineweaver-Burk* (Suhartono dkk., 1992).

Bila nilai K_M semakin besar berarti ikatan kompleks ES semakin lemah atau afinitas enzim terhadap substrat kecil. Sebaliknya jika nilai K_M kecil berarti ikatan kompleks ES semakin kuat atau afinitas enzim terhadap substrat besar. Nilai K_M bersifat spesifik untuk setiap enzim terhadap substrat tertentu yang dipengaruhi oleh waktu inkubasi dan tingkat kemurnian enzim (Fersht, 1999).

F. Stabilitas Enzim

Enzim adalah biokatalisator yang sangat efektif. Molekul ini meningkatkan dengan nyata kecepatan reaksi kimia spesifik yang tanpa enzim akan berlangsung lambat. Pemanfaatan enzim sebagai biokatalisator dalam proses industri telah terbukti memberikan manfaat dan keuntungan bagi industri karena enzim memiliki beberapa kelebihan, yaitu: (a) mengkatalisis reaksi yang bersifat spesifik

sehingga meminimalkan reaksi samping, dan (b) bekerja pada kondisi yang ramah (*mild*). Akan tetapi terdapat kendala dalam mengaplikasikan penggunaan enzim pada proses produksi. Kendala tersebut antara lain harga enzim yang relatif mahal dan rendahnya stabilitas enzim (mudah rusak), khususnya bila digunakan dalam proses produksi yang menggunakan suhu tinggi.

Pada suhu yang tinggi, enzim akan mengalami denaturasi yang membuat enzim menjadi inaktif. Sedangkan penggunaan suhu tinggi dalam proses produksi sangat diperlukan selain untuk mengurangi kontaminasi mikroba, juga bertujuan untuk meningkatkan laju reaksi dan mengurangi masalah-masalah viskositas. Karenanya perlu dikembangkan suatu teknologi untuk mengawetkan dan menjadikan enzim lebih stabil sehingga proses-proses enzimatik dapat dilakukan secara lebih ekonomis dan mempunyai daya saing yang lebih tinggi, khususnya jika dibandingkan dengan proses-proses sejenis yang non enzimatik. Di samping itu usaha peningkatan stabilitas enzim juga dapat memperluas aplikasi enzim, khususnya pada proses-proses industri (Janecek, 1993).

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 kondisi-kondisi non fisiologis lainnya (Kazan *et al.*, 1997). Stabilitas enzim merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim sebagai biokatalis.

Banyak faktor yang mempengaruhi stabilitas enzim, seperti pH, suhu, kofaktor dan kehadiran surfaktan (Eijsink *et al.*, 2005).

Pada prinsipnya, ada dua cara yang dapat ditempuh untuk memperoleh enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu :

- a. Menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami, dan
- b. Mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami tidak atau kurang stabil.

Peningkatan stabilitas dapat ditempuh melalui beberapa cara, yaitu

(Janecek, 1993) :

- a. Amobilisasi enzim
- b. Modifikasi kimia
- c. Protein *engineerinig*

1. Stabilitas termal enzim

Salah satu masalah utama penggunaan enzim dalam industri adalah ketidakstabilannya pada suhu tinggi. Biasanya industri menginginkan penggunaan suhu reaksi yang tinggi pada proses reaksinya. Hal ini bukan hanya ditunjukkan untuk mengurangi tingkat kontaminasi, tetapi suhu tinggi juga akan mengurangi masalah-masalah viskositas dan sekaligus meningkatkan laju reaksi. Penggunaan enzim pada skala industri umumnya dilakukan pada suhu relatif rendah, misalnya pada suhu 50-65⁰C (yaitu untuk glukamilase dan glucose isomerase) atau lebih rendah. Penggunaan enzim pada suhu tinggi sampai 85-100⁰C hanya dijumpai pada proses hidrolisis pati dengan menggunakan -amilase bakterial (Ahern *and* Klibanov, 1987).

Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi dapat dijelaskan berlangsung paling tidak melalui 2 tahap, yaitu :

- a. Adanya pembentukan partial (*partial unfolding*) struktur sekunder, tersier dan atau kuartener molekul enzim.
- b. Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino asam amino tertentu oleh panas (Ahern *and* Klibanov, 1987).

Pada kedua tahap itu, air selalu mempunyai peranan penting. Adanya air sebagai pelumas menyebabkan konformasi molekul enzim menjadi sangat fleksibel. Jika dihilangkannya air dari molekul enzim, maka konformasi molekul enzim menjadi lebih kaku. Hal ini menunjukkan bahwa stabilitas termal enzim akan jauh lebih tinggi dalam kondisi kering dibandingkan dalam kondisi basah (Virdianingsih, 2002).

2. Stabilitas pH enzim

pH merupakan faktor yang memegang peranan penting dalam kestabilan enzim. Karena semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi. Perubahan pH lingkungan dapat disebabkan oleh perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat. Keadaan muatan yang berubah akan mempengaruhi afinitas enzim-substrat dan laju reaksi (Ngili, 2009). Pada reaksi enzimatik yang jauh dari rentang pH optimum menyebabkan sebagian besar enzim kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversibel*. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatis dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

G. Isolasi Enzim

Untuk memproduksi enzim dalam jumlah besar dan mempunyai aktivitas yang tinggi, perlu diperhatikan faktor-faktor penting seperti kondisi pertumbuhan, cara isolasi, serta jenis substrat yang digunakan. Kondisi pertumbuhan yang menunjang produksi enzim secara maksimal adalah pH, suhu inkubasi, waktu inkubasi, dan komposisi media pertumbuhan harus mengandung sumber energi, sumber karbon, sumber nitrogen dan mineral (Wang, 1979).

Enzim dapat diperoleh dengan mengisolasi dari sumbernya. Enzim yang telah diisolasi ini dapat dimanfaatkan lebih lanjut dalam bidang industri maupun kesehatan. Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Ekstraksi enzim secara ekstraseluler lebih mudah dibandingkan ekstraksi enzim intraseluler karena tidak memerlukan pemecahan sel dan enzim yang dikeluarkan dari sel mudah dipisahkan dari pengotor lain, serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar *and* Chan, 1986).

Selain dimanfaatkan sebagai biokatalisator, enzim banyak berperan dalam industri komersial dalam bidang pangan maupun medis dan farmakologi. Untuk mendapatkan suatu produk yang maksimal, maka dalam setiap kali reaksi biologis digunakan enzim untuk mempermudah proses maupun menghemat biaya produksi suatu proses. Enzim yang digunakanpun sebaiknya merupakan enzim yang memiliki kemurnian yang tinggi.

Enzim selulase dihasilkan oleh mikroba selulolitik secara enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang bekerja di luar sel (Duff *and* Murray, 1996).

Metode isolasi enzim yang sering digunakan adalah ekstraksi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi, dan kromatografi.

a. Ekstraksi

Metode ekstraksi enzim ditentukan oleh jenis sumbernya. Enzim yang terdapat pada tepung biji-bijian diekstraksi dengan cara mencampur pada media cair kemudian diaduk, enzim dari bagian tanaman yang bersifat lunak diekstraksi dengan dipotong kecil-kecil, dipres kemudian disaring dengan kain, sedangkan untuk mengekstrak enzim dari daun dan biji-bijian dengan cara digiling, dihomogenasi dalam media cair atau langsung diblender dalam media cair. Dalam ekstraksi enzim dari tanaman digunakan bufer untuk mempertahankan harga pH. Beberapa pH yang dapat digunakan misal: bufer tris-hidroksimetil amino metan, bufer glisin dan bufer fosfat (Deutscher, 1990).

b. Filtrasi

Dasar pemisahan adalah ukuran partikel. Efisiensinya dibatasi oleh:

- Bentuk partikel
- Kemampuan partikel menahan tekanan
- Kekentalan fasa cair

c. Sentrifugasi.

Metode sentrifugasi merupakan cara pemisahan enzim dari partikel-partikel lain yang tidak dikehendaki. Semakin kecil partikel, kecepatan sentrifugasi yang diperlukan semakin besar. Pemisahan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme

mengendap dan supernatant merupakan cairan yang berisi enzim. Dasar pemisahan secara sentrifuge yaitu:

- Perbedaan antara fasa cair dan padat
- Ukuran partikel,
- Berat jenis partikel,
- Berat jenis bahan cair/larutan,
- Jari-jari sentrifus.

Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim dari sisa-sisa dinding sel. Pada dasarnya molekul dengan berat molekul tinggi mengendap dibagian bawah tabung bila disentrifugasi dengan kecepatan tinggi, biasanya 5000 rpm selama 15 menit. Proses ini dapat menimbulkan panas, maka lebih baik dilakukan pada suhu 2-4°C (sentrifugasi dingin), sehingga terhindar dari denaturasi (Judoamidjojo, 1989). Prinsip sentrifugasi berdasarkan pada kenyataan bahwa setiap partikel yang berputar pada laju sudut yang konstan akan memperoleh gaya keluar (F). Besar gaya ini tergantung pada laju sudut (radian/detik) dan radius pertukarannya (cm) (Sariningsih, 2000).

H. Pemurnian Enzim

Enzim merupakan salah satu jenis substrat biologis yang memiliki fungsi yang sangat penting dalam kehidupan manusia. Selain dimanfaatkan sebagai biokatalisator, enzim banyak berperan dalam industri komersial dalam bidang pangan maupun medis dan farmakologi. Untuk mendapatkan suatu produk yang maksimal, maka dalam setiap kali reaksi biologis digunakan enzim untuk mempermudah proses maupun menghemat biaya produksi suatu proses.

Enzim yang digunakanpun sebaiknya merupakan enzim yang memiliki kemurnian yang tinggi.

Memperoleh enzim dengan kemurnian yang tinggi, tidaklah mudah butuh biaya serta proses yang lama untuk memperoleh enzim dengan tingkat kemurnian yang tinggi. Ada banyak faktor yang berpengaruh dalam memperoleh enzim dengan kemurnian yang tinggi. Metode – metode pemurnian enzim antara lain pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas dan filtrasi gel.

Pemurnian merupakan tahap yang penting setelah enzim diisolasi. Pemurnian enzim dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya dengan pelarut organik, gel filtrasi atau menggunakan garam (Collowick, 1995).

1. Cara pengendapan dalam garam organik (salting out) atau pelarut organik (aseton),

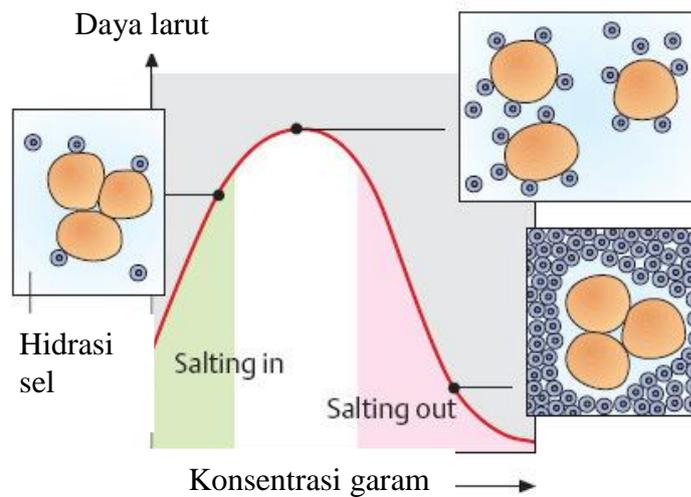
Fraksinasi dengan garam berdasarkan pada sifat-sifat garam seperti kelarutan dan keefektifannya dalam mengendapkan protein. Garam-garam yang sangat efektif adalah garam-garam yang mengandung anion yang bermuatan banyak seperti sulfat, fosfat dan sitrat. Garam yang paling sering digunakan adalah garam amonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$.

Penggunaan amonium sulfat untuk salting out memiliki keuntungan antara lain harga relative murah, kelarutannya tinggi, pH larutan tidak berubah secara ekstrem, dan tidak bersifat toksik. Kerugiannya ialah konsentrasi garam yang tertinggal dalam produk tinggi dan kurang efisien dalam

menghilangkan pencemar.

Pengendapan protein dengan pelarut organik seperti aseton akan menghasilkan produk dengan aktivitas tinggi, tetapi kondisi reaksi harus dipertahankan pada suhu rendah (-5°C) untuk mencegah denaturasi protein. Proses pemurnian menyebabkan hilangnya kofaktor yang penting sehingga menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Selain itu dapat pula terjadi denaturasi protein akibat pengaruh suhu dan pH selama pemurnian berlangsung.

Prinsip pengendapan dengan amonium sulfat berdasarkan pada kelarutan protein yang merupakan interaksi antara gugus polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Berdasarkan fenomena ini, proses kelarutan protein terbagi dua yaitu: proses *salting in* dan *salting out*. Kelarutan protein pada pH dan suhu tertentu akan meningkat saat konsentrasi garam meningkat sampai pada konsentrasi tertentu (*salting in*). Selanjutnya pada penambahan garam dengan konsentrasi tertentu, kelarutan protein akan menurun (*salting out*). Molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak sehingga terjadi penarikan air yang mengelilingi permukaan protein. Peristiwa pengendapan ini mengakibatkan protein saling berinteraksi, berdegradasi, dan mengendap (Scopes, 1987) seperti terlihat pada Gambar 10. Filtrat enzim yang telah dijenuhi dengan amonium sulfat dibiarkan satu malam pada suhu 4°C agar protein terdegradasi dan mengendap sempurna, endapan yang diperoleh adalah protein (Scrimgeour, 1977).



Gambar 10. Proses pengendapan protein (Koolman, 2001).

2. Melalui membran ultrafiltrasi.

Membran ultrafiltrasi lebih kecil pengaruhnya terhadap denaturasi protein dibandingkan presipitasi dengan polietilen glikol ataupun salting out. Selain itu pemisahan enzim skala besar lebih menguntungkan melalui membrane ultrafiltrasi dibandingkan sentrifugasi karena membutuhkan waktu dan biaya lebih rendah.

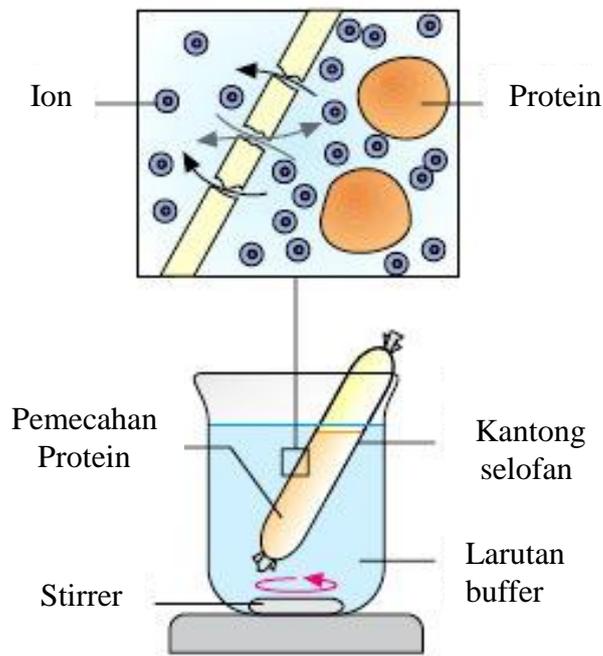
Prinsip pemisahan dengan proses ultrafiltrasi ialah memisahkan komponen berdasarkan bobot molekul. Meskipun retensi molekul merupakan fungsi dari ukuran molekul, namun terbukti bobot molekul dapat digunakan sebagai peubah yang lebih praktis, khususnya pada molekul dengan bobot molekul tinggi. Setelah proses isolasi enzim akan diperoleh supernatant. Supernatant yang diperoleh dimurnikan dengan membran ultrafiltrasi dan hanya protein yang berukuran lebih dari 30000 Dalton tertinggal di atas membran.

Pemurnian enzim melalui membran ultrafiltrasi menghasilkan enzim. Enzim hasil membran ultrafiltrasi selanjutnya diendapkan dengan aseton dingin (-20°C) dengan perbandingan 2 : 3. Pengadukan dilakukan selama 15 menit pada suhu 4°C dan selanjutnya diinkubasi semalam pada suhu 4°C . Setelah disentrifugasi, endapan yang diperoleh dicuci dengan air suling untuk menghilangkan sisa aseton. Endapan tersebut kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat sitrat pH 7,0 (Collowick, 1995).

Tujuan yang ingin dicapai dalam pemurnian enzim adalah mengisolasi enzim spesifikasi dan ekstra sel “Mentah” (*crude*) yang mengandung banyak komponen lain. Molekul-molekul kecil dapat disingkirkan lewat dialysis atau filtrasi gel, asam nukleat melalui pengendapan dengan antibiotik streptomisin, dan seterusnya. Permasalahannya adalah memisahkan enzim yang kita kehendaki dari ratusan protein yang mempunyai struktur kimia dan fisika yang serupa. Perjalanan suatu pemurnian tipikal dan enzim hati dengan pemulihan yang baik serta pemurnian keseluruhan yang besarnya mencapai 490 kali lipat.

3. Dialisis

Pemurnian enzim tidak menghendaki adanya kelebihan garam, oleh karena itu garam yang tersisa dari proses pengendapan dipisahkan dengan cara dialisis. Dialisis merupakan metode yang paling dikenal untuk menghilangkan molekul pengganggu, seperti garam atau ion-ion lain yang berukuran kecil (Gambar 11).



Gambar 11. Proses pemisahan protein dengan dialisis (Plummer, 1979)

Proses dialisis ini dapat terjadi karena konsentrasi garam lebih tinggi di dalam membran dialisis daripada di luar membran, sehingga menyebabkan larutan penyangga atau air masuk ke dalam dialisat. Hal ini terjadi pada awal proses dialisis. Selanjutnya garam akan keluar melalui membran hingga tercapai kondisi keseimbangan. Tetapi setelah proses dialisis kadang terjadi penurunan aktivitas enzim yang kemungkinan disebabkan oleh hilangnya ion penting yang dapat berfungsi mengaktifkan enzim atau disebut sebagai kofaktor (Plummer, 1979).

I. Aktivitas Enzim Selulase

Semua enzim adalah protein, dan aktivitas katalitiknya bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein. Penataan tertentu pada rantai samping asam

amino suatu enzim di sisi aktifnya menentukan tipe molekul yang dapat terikat dan bereaksi. Terdapat banyak enzim yang memiliki molekul-molekul non protein kecil yang terhubung dengan sisi aktif atau di dekatnya. Molekul-molekul ini disebut kofaktor atau koenzim. Beberapa enzim memerlukan kofaktor atau koenzim untuk aktivitas katalitiknya. Terdapat berbagai faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim, yaitu suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, dan keberadaan inhibitor (Poedjiadi, 1994).

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol gula reduksi (glukosa) setiap menit (Lehninger, 1993). Untuk menentukan aktivitas enzim selulase, dapat dilakukan dengan menggunakan substrat yang spesifik. Enzim endoglukonase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis selulosa secara acak menghasilkan selodekstrin, selobiosa, dan glukosa (Gong dan Tsao, 1979). Aktivitas enzim endoglukonase dapat ditentukan dengan menguji pada substrat CMC (*Carboxymethyl cellulose*), sehingga enzim endoglukonase disebut dengan istilah CMC-ase (Zhang *et al.*, 2006).

Penentuan aktivitas enzim selulase akan sulit apabila filtrat yang akan diukur aktivitas enzimnya merupakan campuran dari berbagai enzim selulase. Enzim-enzim ini tidak hanya dapat menghidrolisis substrat yang sama tetapi juga dapat bekerja secara sinergis memecah substrat yang sama, sehingga menyebabkan aktivitas yang diukur dipengaruhi oleh proporsi dari masing-masing enzim yang ada (Enari, 1983). Penggunaan substrat CMC sebagai media dalam penelitian ini

dimaksudkan untuk mengukur aktivitas enzim endoglukonase, dimana enzim ini merupakan enzim yang berperan dalam proses awal pemecahan selulosa murni berbentuk amorf. Enzim ini bekerja pada rantai dalam CMC menghasilkan oligosakarida atau rantai selulosa yang lebih pendek (Lynd *et al.*, 2002).

J. Penentuan Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode Mandels

Aktivitas enzim selulase dihitung berdasarkan data kadar glukosa relatif sebagai 1 mg glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL filtrat kasar selulase. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya 1 μmol glukosa yang dihasilkan dari hidrolisa media oleh 1 mL ekstrak kasar enzim selulase selama masa inkubasi. Untuk melihat besarnya satu unit aktivitas enzim tersebut digunakan rumus :

$$AU = \frac{\text{Kadar Glukosa } (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})}{\text{Mr. Glukosa} \times \text{Waktu Inkubasi (menit)} \times \text{Volume Enzim (mL)}}$$

Pengujian aktivitas selulase dengan metode Mandels berdasarkan pada pembentukan glukosa sebagai produk, karboksimetil selulase (CMC) sebagai substrat. Karena berdasarkan pembentukan produk, maka absorbansi sampel semakin meningkat dengan banyaknya glukosa yang terbentuk dan akan memberikan intensitas warna yang semakin gelap (Mandels *et al.*, 1976).

Pada penelitian menggunakan pereaksi DNS (*Dinitrosalisilic Acid*) karena penggunaan pereaksi DNS untuk mengukur gula reduksi yang diproduksi oleh mikroba memiliki tingkat ketelitian yang tinggi sehingga dapat diaplikasikan pada gula dengan kadar kecil sekalipun. Namun, reagen DNS akan mengalami ketidakstabilan apabila terjadi kontak langsung dengan cahaya. Hal ini dapat

diatasi dengan menjaga penyimpanan reagen DNS agar terhindar dari kontak langsung dengan cahaya (Kodri dkk., 2013).

K. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry

Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Metode ini bekerja pada lingkungan alkali dan ion tembaga (II) bereaksi membentuk kompleks dengan protein. Selanjutnya reagen *folinciocelteau* yang ditambahkan akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen folin menjadi *heteromolibdenum* dan merubah warna larutan dari kuning menjadi biru keunguan. 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 molibdenum atau *tungsteen blue*. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya (Alexander and Griffith, 1993).

Metode ini relatif sederhana dan dapat diterapkan 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).

L. Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim adalah pengikatan suatu enzim secara fisik atau penempatan enzim pada daerah tertentu didalam suatu media pendukung berupa padatan.

Substrat akan dilewatkan pada media tersebut dan diubah menjadi suatu produk (Winarno, 1989). Keunggulan penggunaan enzim amobil dalam industri menurut Payne *et al.* (1992) dan Wang *et al* (1979) antara lain:

1. Dapat digunakan berulang
2. Dapat mengurangi biaya produksi
3. Produk tidak dipengaruhi oleh enzim
4. Memudahkan pengendalian enzim
5. Tahan kondisi ekstrim
6. Dapat digunakan untuk uji analisis
7. Meningkatkan daya guna

Menurut Chibata (1978), metode untuk amobilisasi enzim dapat dikelompokkan dalam tiga kategori, yaitu *carrier-binding*, pengikatsilangan (*cross linking*), dan penjebakan.

1. *Carrier-binding*

Metode *carrier-binding* merupakan metode tertua dalam amobilisasi enzim.

Dengan metode ini, enzim akan diikat ke dalam suatu pembawa yang bersifat tidak dapat larut dalam air. Pada metode ini, jumlah enzim yang terikat pada pembawa dan aktivitas enzim setelah diamobilisasi bergantung pada sifat pembawanya. Pemilihan jenis pembawa akan bergantung pada karakteristik enzim

seperti: ukuran partikel, luas permukaan, perbandingan gugus hidrofob, dan komposisi kimia enzim (Chibata, 1978).

Pada umumnya, perbandingan gugus hidrofil dan konsentrasi dari enzim terikat yang tinggi akan menghasilkan aktivitas enzim teramobilisasi yang lebih tinggi. Beberapa jenis pembawa yang digunakan adalah turunan polisakarida seperti selulosa, dekstran, agarosa, dan gel poliakrilamid. Metode *Carrier-binding* dibagi menjadi tiga jenis, yaitu adsorpsi fisik, pengikatan secara ionik, dan pengikatan secara kovalen.

a. Adsorpsi fisik

Metode amobilisasi enzim dengan teknik adsorpsi fisik didasarkan pada fenomena adsorpsi enzim pada permukaan pembawa yang tidak dapat larut dalam air. Kelebihan amobilisasi enzim dengan cara ini adalah enzim tidak mengalami perubahan konformasi dan metode ini sederhana dan murah. Kekurangan metode ini adalah enzim dapat mengalami desorpsi sebagai akibat perubahan temperatur dan pH. Lepasnya enzim yang telah terikat pada matriks dapat terjadi karena lemahnya kekuatan ikatan antara enzim dengan matriks (Chibata, 1978).

b. Pengikatan secara ionik

Prinsip amobilisasi enzim dengan teknik ini adalah enzim akan terikat secara ionik pada matriks yang mengandung residu penukar ion. Polisakarida dan polimer sintesis memiliki pusat penukar ion yang dapat digunakan sebagai matriks (pembawa). Pengikatan ionik antara enzim dengan pembawa mudah

dilakukan jika dibandingkan dengan pengikatan enzim secara kovalen.

Amobilisasi enzim dengan pengikatan ionik dapat mengakibatkan terjadinya sedikit perubahan konformasi dan sisi aktif enzim (Chibata, 1978).

c. Pengikatan secara kovalen

Metode amobilisasi enzim dengan teknik ini didasarkan pada pengikatan enzim pada matriks melalui ikatan kovalen. Gugus fungsi yang sering terlibat dalam proses amobilisasi enzim dengan teknik ini adalah gugus amino, gugus hidroksil, dan gugus fenolik. Kondisi yang harus dicapai untuk proses amobilisasi enzim dengan teknik ini lebih rumit jika dibandingkan dengan teknik pengikatan secara ionik dan adsorpsi fisik. Amobilisasi enzim dengan pengikatan secara kovalen dapat menyebabkan perubahan pada konformasi enzim sehingga dapat terjadi penurunan aktivitas enzim yang cukup besar (Chibata, 1978).

2. Pengikat silangan (*cross linking*)

Amobilisasi enzim dengan teknik ini didasarkan pada pengikatsilangan antara enzim dengan matriks. Pengikatsilangan enzim ini biasanya dilakukan oleh pereaksi bifungsi atau multifungsi. Dengan teknik ini, enzim akan terikat cukup kuat pada pembawa (matriks), sehingga kemungkinan untuk terjadi desorpsi enzim sangat kecil. Walaupun demikian, teknik ini dapat menyebabkan terjadinya perubahan sisi aktif enzim secara bermakna dan aktivitas enzim setelah diamobilisasi menjadi sangat rendah (Chibata, 1978).

Pereaksi yang paling banyak digunakan untuk pengikatsilangan enzim dengan pembawa adalah glutaraldehid.

3. Penjebakan enzim

Amobilisasi enzim dengan teknik penjebakan didasarkan pada penempatan enzim didalam kisi-kisi matriks polimer atau membran. Teknik ini berbeda dengan teknik amobilisasi dengan pengikatan secara kovalen maupun secara penngikat silang, karena enzim tidak terikat pada kisi-kisi membran atau polimer. Terdapat dua jenis penjebakan enzim, yaitu penjebakan ke dalam kisi dan penjebakan ke dalam kapsul berukuran mikro (Chibata, 1978).

Penjebakan ke dalam kisi biasanya menggunakan polimer baik polimer alami ataupun polimer sintetis. Beberapa polimer sintetis yang sering digunakan adalah poliakrilamid dan polivinilalkohol, sedangkan polimer alami yang sering digunakan adalah pati. 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 inaktifasi enzim selama pembentukan mikro kapsul, (2) dibutuhkan konsentrasi enzim yang besar, (3) adanya kemungkinan enzim bergabung dengan dinding membran (Chibata, 1978).

M. 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

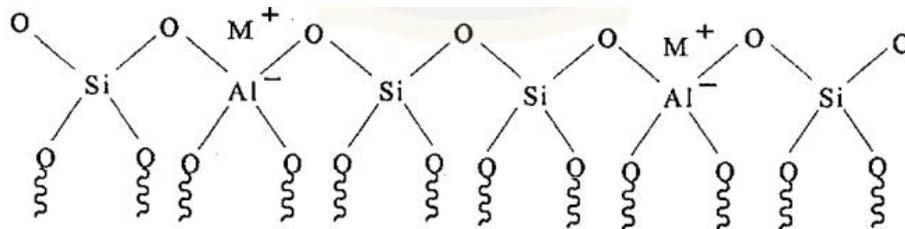
yang berarti mendidih dan lithos yang berarti batuan. Disebut demikian karena mineral ini mempunyai sifat mendidih atau mengembang apabila dipanaskan. Dimana air dalam rongga-rongga zeolit akan mendidih bila dipanaskan pada suhu 100°C (Sutarti dan Rachmawati, 1994).

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 $300\text{-}400^{\circ}\text{C}$ 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 H_2SO_4 untuk menghilangkan oksida-oksida pengotor yang menutupi permukaan pori (Sutarti dan Rachmawati, 1994).

Zeolit didefinisikan sebagai senyawa aluminosilikat yang mempunyai struktur kerangka tiga dimensi dengan rongga di dalamnya. Struktur kerangka zeolit tersusun atas unit-unit tetrahedral $(\text{AlO}_4)^{-5}$ dan $(\text{SiO}_4)^{-4}$ yang saling berikatan melalui atom oksigen membentuk pori-pori zeolit. Ion silikon bervalensi 4,

sedangkan aluminium bervalensi 3. Hal ini yang menyebabkan struktur zeolit kelebihan muatan negatif yang diseimbangkan oleh kation-kation logam alkali atau alkali tanah seperti Na^+ , K^+ , Ca^+ atau Sr^+ maupun kation-kation lainnya. Kation-kation tersebut terletak diluar tetrahedral, dapat bergerak bebas dalam rongga-rongga zeolit dan bertindak sebagai *counter* ion yang dapat dipertukarkan dengan kation-kation lainnya, sifat-sifat inilah yang mendasari zeolit sebagai penukar kation. Berdasarkan sifat fisika dan sifat kimia zeolit tersebut zeolit dapat dimanfaatkan sebagai penukar ion, penyaring molekuler, adsorben dan katalis (Senda, 2005).

Kerangka zeolit berupa rongga yang berisi kation M^+ sebagai kation penyumbang muatan AlO_4 yang ditunjukkan pada Gambar 12.



Gambar 12. Kerangka utama zeolit (Lisley and Elain, 1992).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Juli 2017 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, kapas, kain kasa, karet gelang, aluminium foil, kertas, jarum ose, pembakar spiritus, autoklaf model S-90N, *laminar air flow* CURMA model 9005-FL, neraca analitik, *shaker incubator*, *magnetic stirrer*, sentrifuga, lemari pendingin, mikropipet *Eppendroff*, *waterbath* termometer, spatula dan spektrofotometri UV-VIS Carry Win UV 32.

Bahan-bahan yang digunakan adalah NA (*Nutrient Agar*), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , *yeast ekstrak*, urea, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Pepton, CMC (*Carboxymethyl-Cellulose*), *buffer fosfat*, NaOH, Na_2CO_3 , Na(K) tartarat 1%, reagen *follin-ciocalteu*, DNS (*dinitrosalisilic acid*), fenol, akuades, alkohol, kantong selofan, dan zeolit sintetis.

Penelitian ini menggunakan bakteri *B. Subtilis* ITBCCB148 sebagai mikroorganise penghasil enzim selulase yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung.

C. Prosedur Penelitian

1. Persiapan pendahuluan

Seluruh alat-alat yang akan digunakan terlebih dahulu dicuci bersih, dikeringkan dan dilakukan sterilisasi agar alat-alat yang digunakan tersebut terhindar dari mikroba yang tidak diinginkan. Sterilisasi alat dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Seluruh kegiatan dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow* kecuali proses inkubasi.

2. Pembuatan media inokulum, media fermentasi, inokulasi *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dan produksi enzim selulase

a. Pembuatan media inokulum.

Medium inokulum digunakan sebagai medium adaptasi awal pertumbuhan dan medium perkembangbiakan bakteri pada medium cair. Media inokulum dibuat dengan cara menimbang bahan-bahan yang terdiri dari 0,5 % pepton; 0,3% *yeast ekstrak*; 0,5% CMC (*Carboxymethyl Cellulose*); 0,3% urea; 0,14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,05% KH_2PO_4 ; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan 0,1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dalam *buffer fosfat* pH 6,0 sebanyak 50 mL dalam labu erlemmeyer 100 mL dan

disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit (Amalia, 2016).

b. Pembuatan media fermentasi.

Media fermentasi digunakan sebagai medium pertumbuhan dan perkembangbiakan disertai produksi enzim selulase. Media fermentasi yang digunakan 0,5 % pepton; 0,3% *yeast ekstrak*; 0,5% CMC (*Carboxymethyl Cellulose*); 0,3% urea; 0,14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,05% KH_2PO_4 ; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan 0,1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dalam *buffer fosfat* pH 6,0 sebanyak 1000 mL dalam labu erlemmeyer 2000 mL dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit (Amalia, 2016).

c. Inokulasi *Bacillus subtilis* ITBCCB148

Sebanyak 3 ose *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dari media agar miring dipindahkan ke dalam 50 mL media inokulum secara aseptik lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam.

d. Produksi enzim selulase

Produksi enzim selulase dilakukan dengan cara memindahkan sebanyak 2% media inokulum dari jumlah media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptik lalu dikocok menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm selama 72 jam.

3. Isolasi enzim selulase

Isolasi enzim selulase dilakukan menggunakan metode sentrifugasi. Prinsip sentrifugasi berdasarkan kecepatan sedimentasi dengan cara perputaran.

Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel.

Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (di bawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktifitas 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* dan diukur kadar proteinnya dengan metode *Lowry*.

4. Uji aktivitas enzim selulase metode *Mandels*

- a. Pembuatan pereaksi *Mandels* untuk uji aktivitas enzim selulase.

Dalam labu ukur 100 mL, dimasukkan 1% DNS (*dinitrosalisilic acid*); 1% NaOH; 0,2% fenol; 0,05% Na₂SO₃; 1 mL Na(K) Tartarat 40% kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades hingga tanda batas (Mandels *et al.*, 1976).

- b. Uji aktivitas enzim selulase metode *Mandels*

Metode ini didasarkan pada glukosa yang terbentuk. Sebanyak 0,25 mL enzim ditambah dengan 0,25 mL larutan CMC 0,5% dalam *buffer* posfat pH 5,0 dicampur lalu diinkubasi selama 60 menit pada suhu 50°C. Lalu ditambahkan 1 mL pereaksi *Mandels* dan dididihkan selama 10 menit pada penangas air.

Kemudian didinginkan kemudian diukur menggunakan spektrofotometer *UV-VIS*

pada 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa dan perhitungan metode *Mandels*.

5. Penentuan kadar protein metode *Lowry*

a. Pembuatan pereaksi uji kadar protein dengan metode *Lowry*

Uji kadar protein enzim selulase dengan metode *Lowry* diawali dengan pembuatan pereaksi.

1. Pereaksi A : 2 gram 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 kedalam 5 mL larutan Na(K) tartarat 1%
3. Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A
4. Pereaksi D : Reagen *folin-ciocalteau* diencerkan dengan akuades 1:1
5. Larutan standar : Larutan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

b. Uji kadar protein enzim selulase metode *Lowry*

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode *Lowry*. Penentuan kadar protein ini bertujuan untuk mengatur aktivitas spesifik dari protein enzim selulase.

Sebanyak 0,1 mL sampel, 0,9 mL aquades, dan 5 mL pereaksi C dicampur lalu dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan 0,5 mL pereaksi D dan diaduk sempurna. Untuk kontrol 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL aquades, selanjutnya perlakuan sama seperti sampel. Lalu serapannya diukur

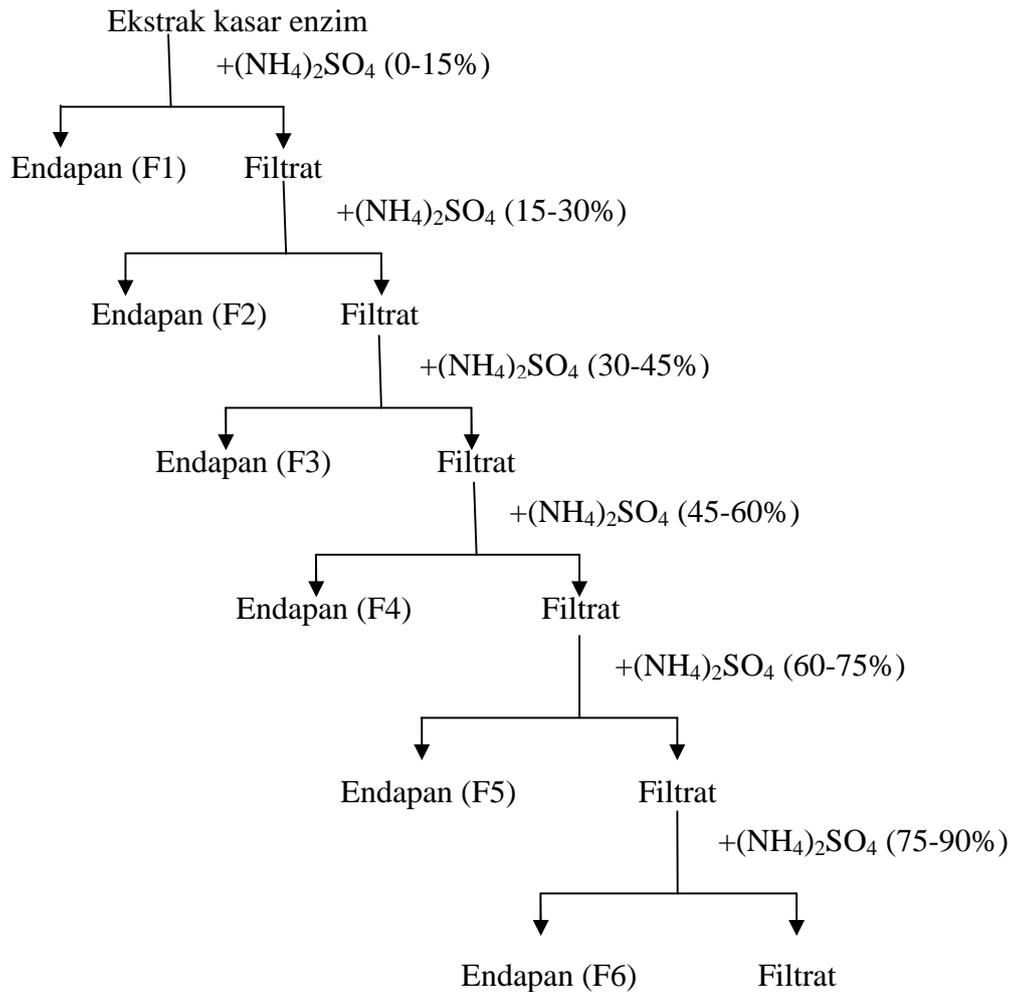
menggunakan spektrofotometer *UV-VIS* pada 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

6. Pemurnian enzim selulase

Setelah enzim selulase diisolasi, selanjutnya enzim tersebut dimurnikan dengan metode fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dan dialisis.

a. Fraksinasi

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh selanjutnya diendapkan dengan menggunakan ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) pada berbagai derajat kejenuhan yaitu 0-15%; 15-30%; 30-45%; 45-60%; 60-75%, dan 75-90% untuk mengetahui pada fraksi mana enzim selulase terendapkan. Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Skema proses fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat

Sejumlah ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditambahkan garam ammonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C . Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan ammonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan *buffer* posfat 0,1 M pH 6,0 dan diuji aktivitasnya dengan metode Mandels dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry untuk mengetahui pada fraksi-fraksi mana terdapat enzim selulase dengan aktivitas spesifik yang tinggi.

b. Dialisis

Endapan enzim dari tiap fraksi hasil fraksinasi kemudian dimurnikan dengan cara dialisis melalui membran semipermeabel (kantong selofan). Endapan tersebut dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis menggunakan *buffer* posfat pH 6,01 M 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 ke dalam larutan *buffer*, yaitu dengan cara mengambil sedikit *buffer* yang digunakan saat dialisis kemudian ditambahkan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 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 kadar proteinnya dengan metode *Lowry*.

7. Amobilisasi enzim selulase menggunakan zeolit.

a. Penetapan pH untuk proses pengikatan enzim selulase pada zeolit

Enzim selulase diikatkan pada matriks dengan variasi pH 5,5; 6; 6,5; 7; dan 7,5; dengan menggunakan *buffer fosfat* 0,1 M. Sebanyak 0,25 gram zeolit sintetis ditambahkan 0,5 mL larutan enzim lalu diaduk hingga larut, selanjutnya didiamkan selama 5-10 menit bertujuan agar enzim terikat pada matriks. Kemudian dilarutkan dengan 5 mL *buffer fosfat* dengan berbagai variasi pH.

Campuran tersebut disentrifugasi. Selanjutnya filtrat didekantasi, filtrat digunakan sebagai kontrol, sedangkan endapan ditambahkan substrat CMC 0,5% sebanyak 0,5 ml sebagai sampel, lalu diuji aktivitas enzim dan kadar proteinnya.

b. 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 6 kali.

8. Karakterisasi enzim selulase

a. Penentuan suhu optimum

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim hasil pemurnian dan amobilisasi dilakukan dengan memvariasikan suhu saat inkubasi yaitu 40; 45; 50; 55; 60; 65; dan 70 °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 hasil pemurnian dan amobilisasi ditentukan dari persamaan *Lineweaver-burk* dengan memvariasikan konsentrasi substrat (larutan CMC) yaitu 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; dan 1,5 % dalam buffer fosfat pH dan suhu optimum.

Kemudian dilakukan pengukuran dengan metode *Mandels*. Selanjutnya data aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diplotkan kedalam kurva *Lineweaver-Burk* untuk penentuan K_M dan V_M .

c. Uji stabilitas termal enzim

Penentuan stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 menit pada pH dan suhu optimumnya. Aktivitas awal enzim (tanpa proses pemanasan) diberi nilai 100% (Virdianingsih, 2002).

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas enzim setelah perlakuan}}{\text{Aktivitas enzim awal (tanpa perlakuan)}} \times 100\%$$

(Virdianingsih, 2002).

9. Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (G_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 (G_i) enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan (Kazan *et al.*, 1997):

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

Keterangan :

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

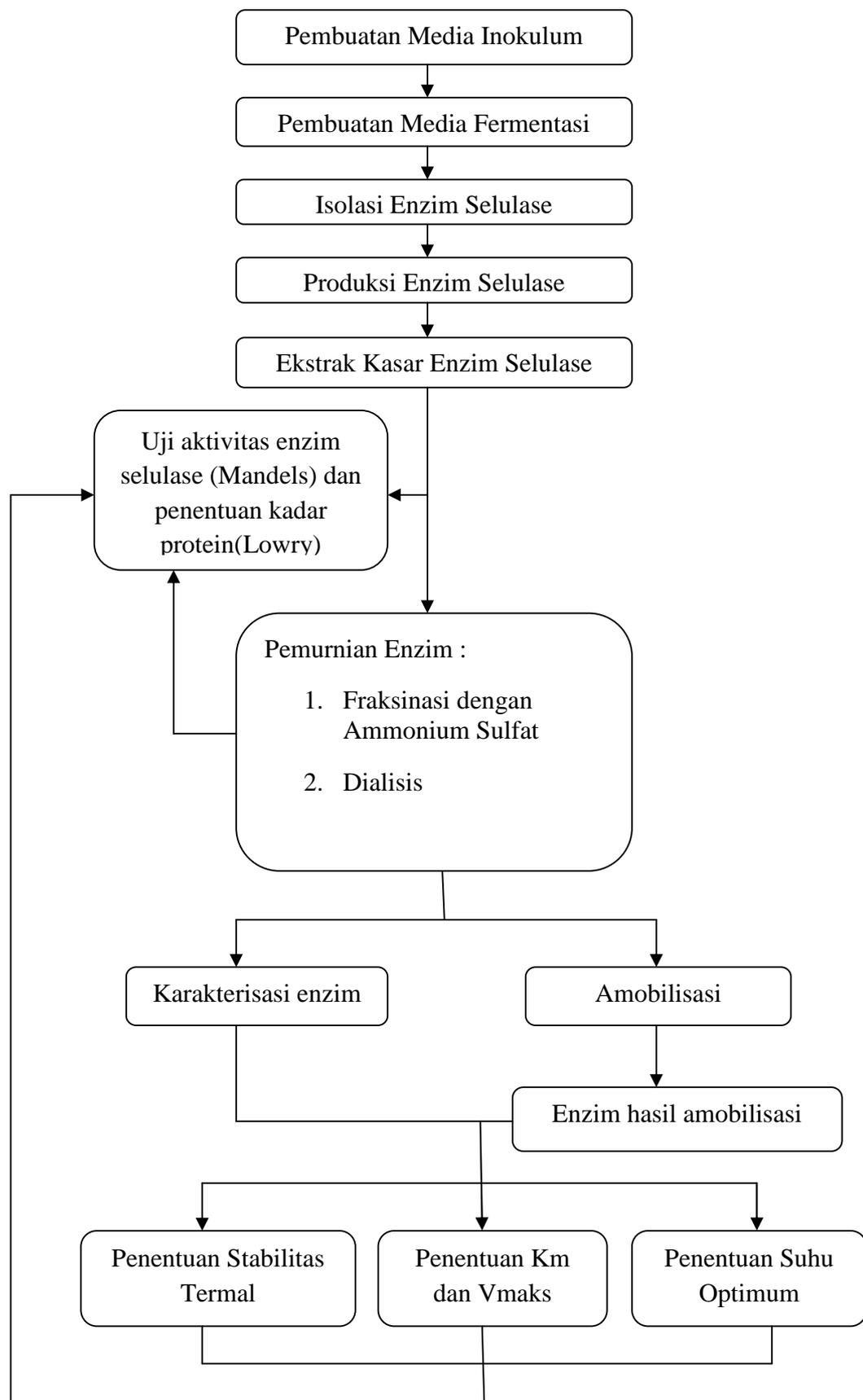
T = suhu absolut (K)

k_i = konstanta laju inaktivasi termal

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

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

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan dalam Gambar 14.



Gambar 14 Diagram Alir Penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas spesifik enzim selulase hasil pemurnian sebesar 10,593 U/mg, meningkat 21 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim dengan aktivitas spesifik sebesar 0,491 U/mg.
2. Enzim selulase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 55°C dan enzim selulase hasil amobilisasi memiliki suhu optimum 60°C.
3. Uji stabilitas termal enzim selulase hasil pemurnian selama 100 menit pada suhu dan pH optimum memiliki aktivitas sisa 26% dan uji stabilitas termal enzim selulase hasil amobilisasi selama 100 menit pada suhu dan pH optimum masih memiliki aktivitas sisa sebesar 53%.
4. Enzim selulase hasil pemurnian memiliki nilai $K_M = 1,091 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{\text{maks}} = 1,200 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 63 \text{ menit}$, $k_i = 0,011 \text{ menit}^{-1}$, dan $G_i = 104,066 \text{ kJ mol}^{-1}$. Sedangkan enzim selulase hasil amobilisasi memiliki nilai $K_M = 4,809 \text{ mg mL}^{-1}$ substrat, $V_{\text{maks}} = 2,475 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, $t_{1/2} = 138,6 \text{ menit}$, $k_i = 0,005 \text{ menit}^{-1}$, dan $G_i = 107,877 \text{ kJ mol}^{-1}$.
5. Pemakaian berulang enzim hasil amobilisasi dapat digunakan sebanyak 4 kali pengulangan.

6. Amobilisasi enzim menggunakan zeolit untuk enzim selulase dari bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dapat mempertahankan stabilitas termal enzim dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.

B. Saran

Dari penelitian yang diperoleh, maka disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menggunakan alternatif matriks pengamobil selain zeolit dan disarankan melakukan penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan kestabilan enzim dengan cara modifikasi kimia atau penambahan zat aditif lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Aehle, W. 2004. *Enzyme in Industry*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Germany. 175, 219, 232.
- Afsahi, B. 2007. *Immobilization of Cellulase on Non-Porous Ultra Fine Silica Particels*. *Scientia Iranica*. 14 (4): 379-383.
- Ahern, T.J. and A.M. Klibanov. 1987. *Why do enzyme irreversibly inactive at high temperature*. *Biotec 1. Microbial Genetic Engineering and Enzyme Tecnology*. Gustav fischer. Stuttgart. New York.
- Akhdiya, A. 2003. *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil*. *Buletin Plasma Nutfah* 9 (2).
- Alexander, R.R. and J.M. Griffith. 1993. *Basic Biochemical Methods*, 2nd ed. Wiley-Liss, Inc. New York.
- Amalia, P. 2016. *Pengaruh Modifikasi Kimia Terhadap Stabilitas Enzim Selulase Dari Bakteri Lokal Bacillus subtilis ITBCCB148 Menggunakan Sitratonat Anhidrida*. Tesis. Universitas Lampung. Lampung.
- Armstrong, F. B. 1983. *Biochemistry, Second Edition*. Oxford University Press. 135-139, 142-143.
- Chalal, D.S 1983. *Growth Characteristic Of Microorganism In Solid State Fermentation For Uppgrading Of Protein Values Of Lignocelluloses And Cellulose Production*. American Chemical Society: 205–310.
- Chibata, I. 1978. *Immobilized enzymes*. Halsted Press Book. Tokyo.

- Collowick, S.P., and Kaplan, N.O. 1995. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc. New York, page 51-58, 87
- Coughlan, M. 1995. *Celluloses: Production properties and applications*. *Biochem. Soc. Trans.* **13**:405-406.
- Deutscher, M.P. 1990. *Methods in Enzymology vol 182: Guide to Protein Purification*. California. Academic Press.
- Duff, S.J.B and W.D. Murray. 1996. *Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review*. *Bioresour. Technol.* **55**. 1–33.
- Eijnsink, G.H., G. Sirgit, V. Torben, and Bertus van de Burg. 2005. *Directed Evolution of Enzyme Stability*. *Biomolecular Engineering*. Elsevier Science Inc. New York. 23: 21-30.
- Enari, T.M. 1993. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Appl. Sci Publisher. New York.
- Fan, L.T., Y.H. Lee, M.M. Gharapuray. 1982. *The nature of lignocellulose and their pretreatment for enzymatic hydrolysis*. *Advances in Biochemical Engineering*. 23: 158-187.
- Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding, 2nd Edition*. W. H. Freeman, New York.
- Gaman, P.M dan K.B. Sherrington. 1994. *Ilmu pangan, Pengantar Ilmu pangan, Nutrisi dan Mikrobiologi*. Universitas Gadjah Mada Press. Yogyakarta.
- Goddard, 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. Biotechnol.* **28** : 41-54.
- Gokhan Coral and Hatice Guvenmez. 2002. *Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of Aspergillus niger Z10 Wild-Type Strain*. *Turk J Biol.* **26** :209-213.

- Gong, C.S dan G.T. Tsao. 1979. *Cellulase and Biosynthesis Regulation*. New York. Academic Press.
- Gupte, S. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Alih bahasa oleh Dr. Julius E. S. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Ikram, U.H., M. M. Javed, T. S. Khan, and Z. Siddiq. 2005. *Cotton Saccharifying Activity of Cellulose Produced by Co-culture of Aspergillus niger and Trichoderma viridi*. Res. J. Arcic & Biol. Sci. **1**(3): 241-245.
- Janecek, S. 1993. *Strategies for Obtaining Stable Enzymes*. Process Biochem. Volume 28. Pp 435-445.
- Judoamidjojo, M. 1989. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Press. Jakarta.
- Kazan, D., H. Ertan and A. Erarslan. 1997. *Stabilization of Escherichia coli Penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers*. Applied. Microbiology and Biotechnology. **48**: 191-197.
- Kodri, Argo, B.D., Yulianingsih, R. 2013. *Pemanfaatan Enzim Selulase Dari Trichoderma reesei dan Aspergillus niger Sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatis Jerami Padi dengan Pretreatment Microwave*. Jurnal Bioproses Komoditas Tropis.
- Koolman, J. 2001. *Atlas Berwarna dan Teks Biokimia*. Penerbit Hipokrates. Jakarta.
- Lehninger, A.L. 1993. *Biochemistry*. Erlangga. Jakarta.
- Lisley, S., and M. Elain. 1992. *Solid State Chemistry*. Chapman & Hall. London.
- Lowry, O.H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr, and R. J. Randall. 1951. *Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent*. J. Biol. Chem. **193** : 265-275.

- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H., Pretorius, I.H. 2002. *Microbial Cellulose Utilization, Fundamental and Biotechnology*. Microbial Molecul Bio Reviews.
- Mandels, M., A. Raymond and R. Charles. 1976. *Measurement of saccharifying cellulose*. Biotech. & Bioeng. Symp. **6**. John Wiley & Sons Inc.
- Marzuki, I. 2014. *Enzim Struktur, Nomenklatur dan Mekanisme Kerja*. UI Press. Jakarta.
- Moon, S.H. and S.J. Parulekar. 1993. *Some Observation on Protease Producing in Continuous Suspention Cultures of Bacillus firmus*. Biotech, Bioeng, 41:43-54.
- Mozhaev, V.V. and K. Martinek. 1984. *Structur-Stability Relationship in Protein: New Approaches to Stabilizing Enzymes*. Enzyme Microbial Technology. 50-59.
- Muchtadi, Tien R. dan Sugiyono. 1992. *Ilmu Pengetahuan Bahan Pangan*. IPB. Bogor.
- Ngili, Yohanis. 2009. *Biokimia Metabolisme dan Bioenergitika*. Yogyakarta : PT. Graha Ilmu. Hal 239-316
- Page, D.S. 1989. *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. 177-223.
- Pelczar, M. J. and E.C.S. Chan. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI-Press. Jakarta. 409 halaman.
- Plummer, David T. 1979. *An Intoduction to practical Biochemistry*, Second Edition, Tata McGaraw-Hill publishing Company, New Delhi.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta. 155, 158-160.
- Pohl, T. 1990. *Concentration of Protein Removal of Salute dalam M.P. Deutscher, Methods of Enzymology. Guide to Protein Purification*. Academic Press. New York.

- Priest, F.G. 1993. *Systematics and ecology of Bacillus*. In: Sonenshein AL, Hoch J, Losick R (eds) *Bacillus subtilis and other gram positive bacteris, biochemistry, physiology and molecular genetics*. American Society for Microbiology Press. Washington. DC.
- Rahayu, K. 1991. *Teknologi Enzim*. PAU Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Rastogi, G., A. Bhalla, A. Adhikari. 1995. *Characterization of thermostable cellulases produced by Bacillus and Geobacillus strains*. *Bioresource Technology*. 101(22) : 8798–8806.
- Sariningsih, R. 2000. *Produksi Enzim Protease Oleh Bacillus subtilis BAC-4*. Skripsi. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Schledel, H.G. and K. Schmidt. 1994. *Mikrobiologi Umum*. UGM. Yogyakarta.
- Scopes, R.K. 1987. *Protein Purification*. Springer Verlag. New York.
- Scrimgeour, C. 1977. *Chemistry of fatty Acid, Baley's industrial oil and fat products*, Edisi keenam, John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Senda, S.P. 2005. *Zeolit Alam*. USU. Sumatera Utara.
- Septiani, U., dan A. Lisma. 2011. *Pemanfaatan Zeolit Alam Sebagai Media Pendukung Amobilisasi -Amilase*. Skripsi. Universitas Andalas. Padang.
- Shahib, M.N. 2005. *Biologi Molekuler Medik I*. Universitas Padjajaran Press. Bandung.
- Suhartono, M.T., A. Suwanto, dan H. Widjaja. 1992. *Diklat Struktur dan Biokimiawi Protein*. Penelitian Antar Universitas. IPB. Bogor.
- Sutarti, M., dan M. Rachmawati. 1994. *Zeolit Tinjauan Literatur*. PDII LIPI, Jakarta.

- Thomas DB. 1989. *A Textbook of Industrial Microbiology*. Second Edition, Sinauer Associates. Sunderland, USA.
- Uswatun, H. 2016. *Peningkatan Kestabilan Enzim Protease Dari Bacillus subtilis ITBCCB148 Dengan Amobilisasi Menggunakan Zeolit*. Skripsi. Universitas Lampung. Lampung.
- Virdianingsih, R. 2002. *Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari Bacillus pumilus y1 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wang, D.I. 1979. *Fermentation and Enzymes Technology*. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Williamson, K.L and L.F. Fieser. 1992. *Organic Experiment 7th Edition*. D C Health and Company. United States of America.
- Winarno, F. G 1989. *Enzim pangan dan gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. 2006. *Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Selection Strategies*. Biotech Adv. 24: 452-481.