

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Enzim dibutuhkan untuk mengkatalisis reaksi kimia yang ada dalam tubuh makhluk hidup, menguraikan nutrisi menjadi energi dan menyusun bahan dasar kimiawi untuk dapat menjadi bagian-bagian dasar dari tubuh makhluk hidup seperti protein, DNA, membran sel, dan jaringan sehingga kehidupan seperti yang kita kenal dapat berlangsung (Robert *et al.*, 2006). Peran enzim sebagai alat yang praktis dan penting tidak hanya dalam dunia kesehatan, melainkan juga dalam dunia industri kimiawi, pengolahan pangan, pertanian, dan bahkan dalam aktivitas sehari-hari di (Klemm *et al.*, 1998).

Enzim selulase mempunyai nama sistematis yaitu  $\beta$ -1,4 glukano-4-glukanohidrolase, dapat memutuskan ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 pada selulosa, selodekstrin, selobiosa dan turunan selulosa yang lain. Berdasarkan spesifikasi substrat enzim dibagi menjadi empat kelompok yaitu endo- $\beta$ -1,4-glukanase yang memutuskan ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 pada selodekstrin dan selulosa yang telah dilonggarkan oleh asam fosfat dan telah tersubstitusi,  $\beta$ -1,4-D-glukan selobiohidrolase yang memutuskan ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 pada selodekstrin tapi tidak dapat memutuskan selulosa yang tersubstitusi,  $\beta$ -1,4-D-glukan glukohidrolase yang memutuskan ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 pada ujung rantai selulosa non pereduksi, dan  $\beta$ -1,4-D-glukosidase yang memutuskan ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 pada selobiosa dan selo-oligosakarida rantai pendek (Moat *et al.*, 2002).

Beberapa dari enzim selulolitik terutama selulase diproduksi oleh fungi dan bakteri. Ada beberapa bakteri selulolitik yang dapat menghasilkan selulase yaitu *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*,

*Cellovibrio*, dan *Sporosphytophaga*. Bakteri selulolitik tersebut dapat diisolasi dari ampas tebu yang mempunyai kandungan tinggi selulosa sehingga potensial sebagai substrat bakteri selulolitik untuk menghasilkan enzim selulase. Berdasarkan penelitian terdahulu bakteri selulolitik yang diisolasi dari ampas tebu merupakan bakteri penghasil enzim selulase dan termasuk bakteri yang memiliki genus *Bacillus* yang sudah dikarakterisasi secara visual melalui pengamatan makroskopis, mikroskopis, dengan dan tanpa pewarnaan, karakterisasi biokimia, serta melalui uji KIT (Susanto, 2012). Selanjutnya isolat bakteri diidentifikasi menggunakan analisis homologi gen penyandi 16S rRNA dan diperoleh hasil bahwa isolat memiliki homologi tertinggi terhadap *Bacillus subtilis* strain B7 dengan presentase homologi 99% dan isolate tersebut selanjutnya diberi nama *Bacillus subtilis* strain SF01 (Ariputri, 2014).

Perbedaan 1% homologi dari *Bacillus subtilis* strain B7 membuat *Bacillus subtilis* strain SF01 memiliki ciri khasnya sendiri. Melalui karakterisasi yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya diambil kesimpulan *Bacillus subtilis* strain SF01 menghasilkan enzim selulase yang memiliki suhu optimum 60°C, pH optimum 5, stabil pada suhu 60°C selama 5 jam, dan stabil pada rentang pH 4-6. *Bacillus subtilis* strain SF01 mempunyai kurva pertumbuhan pada fase eksponensial pada jam ke-2 hingga jam ke-18 dan masuk fase stasioner setelah jam ke-18, sedangkan waktu optimum untuk produksi enzim yaitu pada jam ke-20 setelah inkubasi (Fajarpel, 2015). Selain itu karakterisasi lanjut dilakukan untuk mengetahui bahan-bahan apa saja yang dapat menaikkan aktivitas (kofaktor) dan menurunkan aktivitas (inhibitor) enzim selulase dari *Bacillus subtilis* strain SF01 (Tanwijaya, 2016). Penambahan logam  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ , dan  $Ca^{2+}$  dapat menurunkan aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* strain SF01,

maka dari itu bahan-bahan yang mengandung ion logam  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ , dan  $Ca^{2+}$  sebaiknya dihindari karena dapat menurunkan aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* strain SF01 (Irwanto, 2015).

Aktivitas spesifik enzim dapat meningkat dengan pemurnian. Pemurnian menghasilkan enzim dengan total kandungan protein yang lebih sedikit daripada enzim sebelum dimurnikan yang menunjukkan bahwa enzim yang diinginkan lebih murni dengan aktivitas spesifik yang lebih besar dari sebelumnya (Rajashri and Anandrao, 2011). Perlunya proses pemurnian protein adalah untuk menghilangkan protein lain yang akan menurunkan atau menaikkan parameter sesungguhnya dari enzim yang diinginkan seperti Michaelis–Menten konstant ( $K_m$ ) dan efek aktivator dan inhibitor pada enzim (Bonner, 2007). Enzim dapat dimurnikan dengan teknik kromatografi berdasarkan metode pemisahan yang memisahkan senyawa dengan struktur yang sama atau sedikit berbeda dengan memakai dua fase di dalamnya. Prinsip pemisahannya memakai fase diam untuk menahan sampel dan fase gerak untuk membawa sampel. Ada beberapa teknik pemisahan kromatografi yaitu kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi penukar ion, dan kromatografi afinitas (Bintang, 2010).

Pada penelitian ini kromatografi penukar ion dipilih untuk memurnikan enzim selulase karena mampu memisahkan spesies molekul yang hanya memiliki sedikit perbedaan sifat muatan, misalnya hanya berbeda 1 muatan asam amino (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2010). Asam amino adalah molekul zwitterion yang mengandung gugus amino yang bersifat basa dan gugus karboksil yang bersifat asam. Keduanya merupakan asam lemah dan menunjukkan adanya ionisasi tergantung pada pH tertentu. Setiap protein memiliki gugus amino pada awal dari rantainya

dan gugus karboksil pada rantai akhirnya. Muatan permukaan yang ada pada protein menunjukkan bahwa protein memiliki muatan secara keseluruhan yang tergantung pada pH dan lingkungan sekitar. Pada pH rendah muatan permukaan protein secara keseluruhan bersifat positif, dan pada pH tinggi muatan protein secara keseluruhan adalah negatif. Ada sebuah titik pada skala pH di mana muatan positif dan negatif adalah seimbang dan keseluruhan muatan pada permukaannya sama dengan nol. Hal itu yang dijelaskan sebagai titik isoelektrik pada protein. Protein akan bermuatan negatif jika dikondisikan dalam suasana pH satu unit di atas pI protein, sebaliknya protein akan bermuatan positif jika dikondisikan dalam suasana pH satu unit dibawah pI protein (Bonner, 2007).

Kromatografi penukar ion bergantung pada muatan molekul pada fase gerak dan muatan gugus yang terikat pada fase diam. Gugus fungsi pada permukaan fase diam akan ternetralisasi oleh muatan ion yang berlawanan pada fase gerak. Ketika sampel protein dimasukkan pertama kali ke dalam kolom, sampel protein akan berdifusi pada permukaan fase diam menggantikan ion yang berlawanan. Penggantian ion yang berlawanan akan mengalir pada kolom dan akan tereluasi bersama fase gerak. Fase diam yang dimaksud dalam penukar ion adalah resin, yang terdiri dari dua tipe yaitu resin penukar anion yang mengandung muatan positif yang menarik molekul bermuatan negatif dan resin penukar kation yaitu resin yang mengandung muatan negatif yang menarik molekul bermuatan positif. Keduanya terbagi lagi menjadi penukar ion kuat dan lemah, yang berkaitan dengan rentang ionisasi dan tidak menggambarkan kuat lemahnya resin dalam mengikat muatan molekul. Resin penukar ion kuat akan mengionisasi pada rentang pH lebih luas daripada resin penukar ion lemah. Sifat kuat dan lemah dari resin anion atau kation berasal dari gugus fungsi resin. Resin

penukar anion kuat yang biasanya memakai gugus fungsi *Quaternary ammonium Q* dan *Quaternary aminoethyl* yang dapat mengionisasi pada pH 2,0 – 12,0 , sedangkan untuk resin penukar anion lemah memakai gugus fungsi *diethyl al aminoethyl* yang dapat terionisasi pada pH 2,0 – 9,0. Resin penukar kation kuat memakai gugus fungsi *methyl methyl sulfonate* dan *sulfopropyl* yang dapat mengionisasi pada pH 4,0 – 13,0. Resin penukar kation lemah memakai gugus fungsi *carboxymethy* yang dapat mengionisasi pada pH 6,0 – 10,0 (Bonner, 2007). Resin penukar ion kuat dapat digunakan untuk protein yang belum diketahui pI-nya, karena rentang pH nya yang luas, sehingga dapat tetap mengionisasi resin dan protein meskipun pI dari protein tidak diketahui (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2010). Dalam hal ini enzim selulase yang berasal dari bakteri *Bacillus subtilis* strain SF01 belum diketahui dengan pasti pI-nya meskipun dari beberapa penelitian pemurnian enzim dari bakteri *Bacillus subtilis* menggunakan resin penukar anion (Yandri, 2011). Maka dari itu pemisahan enzim selulase yang berasal dari bakteri *Bacillus subtilis* strain SF01 pada penelitian ini menggunakan kromatografi penukar anion.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan maka dapat dirumuskan suatu masalah penelitian sebagai berikut:

1. Apakah pemisahan protein dengan menggunakan kromatografi penukar anion dengan eluen NaCl [0,1-1] M dalam buffer Universal pH 8,0 dengan matriks *High Q Resins* dalam kolom berukuran 10 mL dapat meningkatkan aktivitas spesifik enzim selulase yang diisolasi dari bakteri *Bacillus subtilis* Strain SF01?

2. Berapakah peningkatan aktivitas spesifik enzim selulase yang diisolasi dari bakteri *Bacillus subtilis* Strain SF01 setelah dipisahkan dengan menggunakan kromatografi penukar anion pada rentang konsentrasi eluen NaCl [0,1-1] M dalam buffer Universal pH 8,0 dengan matriks *High Q Resins* dalam kolom berukuran 10 mL ?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan :

1. Mengetahui apakah pemisahan protein menggunakan kromatografi penukar anion dengan eluen NaCl [0,1-1] M dalam buffer Universal pH 8,0 dengan matriks *High Q Resins* dalam kolom berukuran 10 mL dapat meningkatkan aktivitas spesifik enzim selulase yang diisolasi dari bakteri *Bacillus subtilis* Strain SF01.
2. Mengetahui peningkatan aktivitas spesifik enzim selulase yang diisolasi dari bakteri *Bacillus subtilis* Strain SF01 setelah dipisahkan dengan menggunakan kromatografi penukar anion pada rentang konsentrasi eluen NaCl [0,1-1] M dalam buffer Universal pH 8,0 dengan matriks *High Q Resins* dalam kolom berukuran 10 mL.

### **1.4 Hipotesis Penelitian**

Pada penelitian ini dapat ditarik hipotesa :

1. Pemisahan protein menggunakan kromatografi penukar anion dengan eluen NaCl [0,1-1] M dalam buffer Universal pH 8,0 dengan matriks *High Q Resins* dalam kolom berukuran 10 mL dapat menghasilkan enzim selulase dari bakteri *Bacillus subtilis* Strain SF01 dengan aktivitas spesifik yang lebih tinggi.

2. Peningkatan aktivitas spesifik enzim selulase dari bakteri *Bacillus subtilis* Strain SF01 hasil pemisahan protein dengan kromatografi penukar anion pada rentang konsentrasi eluen NaCl [0,1-1] M dalam buffer Universal pH 8,0 dengan matriks *High Q Resins* dalam kolom berukuran 10 mL dapat ditentukan.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Manfaat penelitian ini untuk memperoleh protein enzim selulase dari bakteri *Bacillus subtilis* strain SF01 dengan aktivitas yang tinggi, sehingga dapat digunakan di berbagai bidang dalam kehidupan masyarakat dan khususnya aplikasi dalam dunia industri.