

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Enzim selulase termasuk dalam kelas hidrolase (menguraikan suatu zat dengan bantuan air) dan tergolong enzim karbohidrase (menguraikan golongan karbohidrat) (Sadikin, 2002). Berdasarkan karbohidrat yang diuraikannya, selulase merupakan enzim hidrolitik yang dapat menghidrolisis selulosa menjadi unit penyusun gula yang lebih kecil seperti oligosakarida (2-10 unit) dan glukosa dengan cara memutus ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik pada selulosa, dan turunan selulosa yang lainnya (Mathews, Van Holde, Ahern, 1999). Dalam proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa terdapat tiga macam enzim selulase yang terlibat yaitu *endoglucanase*, *exoglucanase*, dan  *$\beta$ -glucosidase / cellobiase* (Sharada, *et al.*, 2014).

Selulase dapat diperoleh dari berbagai jenis fungi, seperti *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Chaetomium cellulyticum*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium brasilianum* (Gupta, *et al.*, 2011). Selain itu selulase dapat diperoleh dari ruminansia, serta bakteri di antaranya adalah *Anoxybacillus sp 527*, *Bacillus sp.AC-1*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp*, *Bacillus cereus*, *Cellulomonas cellulans* MTCC 23, *Clostridium thermocellum*, *Streptomyces sp.BRC1*, *Microbacterium sp.MTCC 10047*, *Bosea sp. MTCC 10045* (Sadhu and Maiti, 2013).

Aplikasi selulase secara umum dalam bidang industri antara lain industri bioetanol, industri tekstil, pakan ternak, industri deterjen, pulp, pemutihan kertas, pengolahan sampah, ekstraksi *olive oil*, serta fermentasi gandum dan bir (Sharada, *et al.*, 2014). Dalam bidang farmasi selulase

dimanfaatkan sebagai suplemen untuk melancarkan sistem pencernaan, dan bahan dasar pembuatan produk tambahan farmasi seperti: metil selulosa, etil selulosa, hidroksi propil selulosa, hidroksi propil metil selulosa, dan natrium karboksi metil selulosa yang merupakan polimer turunan selulosa sebagai bahan penyalut, pengikat, pengisi, penghancur, pelicin pada pembuatan tablet, dan *suspending agent* (Cantor, *et al.*, 2008).

Berdasarkan penelitian terdahulu, enzim selulase juga dapat dihasilkan oleh isolat bakteri murni limbah ampas tebu. Isolat bakteri yang diberi kode SF01 ini termasuk bakteri genus *Bacillus* yang telah dikarakterisasi secara visual melalui pengamatan makroskopis, mikroskopis, dengan dan tanpa pewarnaan, karakterisasi biokimia, serta melalui uji Kit *Microbact<sup>TM</sup>* Gram-negatif (Susanto, 2012). Upaya identifikasi bakteri SF01 ini dilakukan oleh peneliti berikutnya untuk menentukan spesies bakteri dan kemiripannya dengan bakteri selulolitik lain. Beberapa langkah yang dilakukan yaitu analisis homologi gen penyandi 16S rRNA terhadap isolat *Bacillus sp.* dengan mengisolasi DNA kromosom, uji elektroforesis DNA, amplifikasi gen penyandi 16S rRNA menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*), dan sekuensing gen penyandi 16S rRNA untuk mengetahui urutan basa nukleotidanya lalu dibandingkan dengan yang ada pada *GenBank*. Didapatkan hasil bahwa isolat bakteri SF01 memiliki kedekatan persentase homologi 99% dengan *Bacillus subtilis* strain B7 (Ariputri, 2014). Walaupun terdapat perbedaan homologi 1% dengan *Bacillus subtilis* strain B7, *Bacillus subtilis* strain SF01 mempunyai keunikan yang membedakannya dengan *Bacillus subtilis* strain B7. Setelah dikarakterisasi lebih lanjut isolat bakteri SF01 ini berada pada fase pertumbuhan cepat pada jam ke-2 hingga jam ke-17 dan masuk fase stasioner setelah jam ke-17. Waktu optimum untuk produksi enzim tersebut yaitu pada jam ke-20 setelah

inkubasi, suhu optimum selulase 60°C, pH optimumnya 5, stabil pada suhu 60°C selama 5 jam, dan stabil pada rentang pH 4-6 (Utami, 2015).

Pada tahap pengembangannya, enzim selulase perlu dimurnikan dengan berbagai teknik misalnya pengendapan, dialisis, dan kromatografi kolom. Dalam proses pemurnian ini diperlukan berbagai bahan yang mungkin dapat mempengaruhi aktivitas enzim tersebut. Oleh karena isolat bakteri *Bacillus subtilis* SF01 memiliki identitas yang berbeda, maka dari itu diperlukan karakterisasi lanjutan untuk mengetahui pengaruh beberapa senyawa pereduksi yang digunakan pada proses pemurnian enzim dan protein seperti *dithiothreitol* (DTT), TCEP (*tris(2-carboxyl)phosphine*), 2-merkaptotetanol, aprotinin, *1,4 dithioerythritol*/DTE, *sodium borohydride* (NaBH<sub>4</sub>) (Ahmed, 2005). Dari beberapa senyawa pereduksi yang ada peneliti hanya menguji senyawa pereduksi yang sering digunakan dalam tahap pemurnian enzim yaitu *dithiothreitol* (DTT) pada konsentrasi 1-10 mM, 2-merkaptotetanol pada konsentrasi 0,05% (Ahmed, 2005), dan glutation pada konsentrasi 1-20 mM (Wilkinson, Meyer, and Kelly, 2000). Beberapa senyawa pereduksi tersebut dapat meningkatkan aktivitas spesifik enzim (aktivator) atau menurunkan aktivitas spesifik enzim (inhibitor) (Murray, Granner dan Rodwell, 2009).

Penambahan senyawa-senyawa pereduksi seperti DTT (*dithiothreitol*) dan 2-merkaptotetanol dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase asal *Bacillus subtilis* YJ1 dengan konsentrasi masing-masing 5 mM, dan 10 mM, sedangkan penambahan senyawa glutation tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim tersebut pada konsentrasi 5 mM, dan 10 mM (Yin, *et al.*, 2010). Senyawa-senyawa pereduksi (DTT, 2-merkaptotetanol, dan glutation) sering digunakan dalam tahap pemurnian enzim dan ekstraksi pada enzim yang berasal dari alam ataupun enzim hasil rekayasa (Ahmed, 2005). Melalui informasi pengaruh penambahan

senyawa-senyawa pereduksi seperti dithiothreitol (DTT) dengan konsentrasi 1, 3, 5, 7, dan 9 mM, 2-merkapttoetanol dengan konsentrasi 5, 10, 20, 25, 30 mM dan glutation dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25 mM ini diharapkan dapat bermanfaat untuk mempertimbangkan pemilihan reagen atau media enzim selulase asal *Bacillus subtilis* strain SF01 yang digunakan untuk tahap pemurnian atau analisis enzim selulase lebih lanjut. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah *Bacillus subtilis* SF01 diisolasi dari stok gliserol, diremajakan, diinokulasi sebagai *starter* atau inokulum, produksi enzim, panen enzim. Kemudian supernatan yang mengandung enzim selulolitik dilakukan karakterisasi yaitu pengujian kadar protein dengan metode Bradford pembanding *Bovine Serum Albumin* (BSA), sedangkan uji aktivitas enzim selulase pada pengaruh penambahan senyawa-senyawa pereduksi ditentukan dengan mengukur kadar glukosa yang dihasilkan dari reaksi enzimatik dengan penambahan asam 3,5-dinitrosalisilat dengan pembanding *D(+)* *Glucose Monohydrate p.a* secara spektrofotometri.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan maka dirumuskan masalah sebagai berikut: bagaimana pengaruh penambahan senyawa pereduksi *dithiothreitol* (DTT), 2-merkapttoetanol, dan glutation dengan variasi konsentrasi terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolat *Bacillus subtilis* strain SF01?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan senyawa pereduksi *dithiothreitol* (DTT), 2-merkapttoetanol, dan glutation dilihat dari variasi konsentrasinya terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolat *Bacillus subtilis* strain SF01.

#### 1.4 Hipotesis Penelitian

Pada penelitian ini dapat ditarik hipotesa:

1. Penambahan senyawa pereduksi *dithiothreitol* (DTT) konsentrasi 5, 7, dan 9 mM akan meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolat *Bacillus subtilis* strain SF01.
2. Penambahan senyawa pereduksi 2-merkaptotanol konsentrasi 5, 10, 20, 25, 30 mM akan meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolat *Bacillus subtilis* strain SF01.
3. Penambahan senyawa pereduksi glutation konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 mM tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolat *Bacillus subtilis* strain SF01.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai senyawa pereduksi yang dapat menghambat atau meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolat *Bacillus subtilis* strain SF01 asal limbah ampas tebu sehingga dapat menunjang proses produksi, purifikasi dan karakterisasi enzim pada penelitian selanjutnya.
2. Penelitian ini diharapkan dapat menunjukkan karakteristik yaitu pengaruh penambahan senyawa pereduksi (*dithiothreitol*/DTT, 2-merkaptotanol, glutation) terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolat *Bacillus subtilis* strain SF01 asal limbah ampas tebu yang dapat diaplikasikan pada berbagai bidang khususnya industri farmasi.