

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Tumbuhan saat ini telah menjadi sumber karbon terbarukan dan sumber energi baru yang ada di bumi. Setiap tahunnya tumbuhan dapat memproduksi sekitar  $4 \times 10^9$  ton selulosa dan merupakan polimer stabil yang terdiri dari ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik. Selulosa menjadi komoditas yang besar dan berlimpah karena memiliki sifat struktural khas serta dapat dimanfaatkan dalam industri untuk pulp, tekstil serta industri kimia untuk diubah menjadi polimer (Yin, Lin and Xiao, 2010). Pada bidang farmasi selulosa banyak digunakan sebagai eksipien seperti serbuk selulosa dan selulosa mikrokristalin dari berbagai kelas yang digunakan sebagai pengikat, pengisi, penghancur dan pelumas pada tablet (Ozolua *et al.*, 2005). Sumber penghasil selulosa salah satunya merupakan residu pertanian seperti ampas tebu yang mengandung biomassa lignoselulosa terutama terdiri dari selulosa 43,6 %, hemiselulosa 33,8 %, lignin 18,1 %, abu 2,3 % dan lilin 0,8 % berdasarkan berat kering (Guilherme *et al.*, 2014; Correa *et al.*, 2010).

Banyaknya selulosa sebesar 43,6 % yang terkandung pada ampas tebu menjadikannya sebagai substrat yang baik untuk perkembangan mikroorganisme (Correa *et al.*, 2010). Di alam degradasi selulosa paling banyak dilakukan oleh mikroorganisme melalui bantuan sistem multi-enzim (Balamurugan *et al.*, 2011). Enzim sendiri merupakan suatu katalis dalam sistem biologi dan juga berperan dalam perubahan berbagai bentuk energi (Stryer, 2000). Konversi selulosa menjadi biomassa berpotensi untuk dikembangkan menjadi produk yang bermanfaat melalui biokatalisis oleh enzim selulase yang berasal dari mikroorganisme. Selulase merupakan enzim yang disintesis oleh sebagian besar mikroorganisme termasuk jamur, bakteri dan

*actynomicetes* selama masa pertumbuhan mereka pada bahan yang mengandung selulosa. Mikroorganisme penghasil enzim selulase dapat bersifat aerobik, anaerobik, mesofilik atau termofilik (Kuhad, Gupta and Singh, 2011). Enzim selulase merupakan enzim kompleks yang terdiri dari tiga enzim yakni *selobiohidrolase* atau *eksoglukonase* (ekso (1,4)- $\beta$ -D-glukanase), *endoglukonase* (endo (1,4)- $\beta$ -D-glukanase) atau *carboxymethylselulase*, selobiase atau  $\beta$ -glukosidase yang bekerja secara bersamaan untuk menghidrolisis selulosa menjadi molekul yang lebih kecil atau menjadi gula (Balamurugan *et al.*, 2011; Sriariyanun, Tantayontai and Yasurin, 2016).

Berdasarkan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Susanto (2012), diketahui bahwa limbah ampas tebu dapat menghasilkan isolat bakteri yang mempunyai aktivitas selulolitik yang dapat menghasilkan enzim selulase. Pada penelitian selanjutnya telah dilakukan analisis homologi gen penyandi 16S rRNA terhadap isolat tersebut dengan melakukan isolasi DNA kromosom, pengujian elektroforesis DNA, dan amplifikasi gen penyandi 16S rRNA. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat bakteri selulolitik asal limbah ampas tebu tersebut memiliki homologi yang paling dekat dengan *Bacillus subtilis* strain B7 dengan persentase homologi 99% (Ariputri, 2014). Selanjutnya isolat bakteri selulolitik asal limbah ampas tebu ini disebut sebagai isolat *Bacillus subtilis* strain SF01. Utami (2015) menganalisa karakteristik dari enzim yang dihasilkan oleh isolat *Bacillus subtilis* Strain SF01. Hasil yang diperoleh dapat diketahui bahwa waktu optimum untuk produksi enzim selulase adalah pada jam ke-20 pada suhu 37°C dengan *shaker* berkecepatan 150 rpm, suhu optimum enzim selulase adalah suhu 60°C. Ketika pH 5 aktivitas enzim selulase berada pada titik tertinggi dan enzim cenderung stabil setelah 5 jam diinkubasi. Karakteristik spesifik dari isolat *Bacillus subtilis* strain SF01 ini selanjutnya digunakan sebagai acuan untuk proses produksi dan proses pengujian aktivitas ekstrak kasar enzim selulase.

Aplikasi enzim pada bidang industri dan farmasi sangat banyak akan tetapi enzim dibutuhkan perlu dalam bentuk murni untuk dapat diaplikasikan (Kumar and Sharma, 2015). Tingkat kemurnian enzim yang diperlukan tergantung pada aplikasi enzim, terkadang ekstrak kasar enzim saja dapat digunakan tetapi pada industri makanan sedangkan obat-obatan diperlukan tingkat kemurnian yang lebih tinggi sehingga memerlukan beberapa tahapan pemurnian (Kumar and Sharma, 2015). Pemurnian pada enzim dilakukan untuk memisahkan enzim dari campuran protein yang tidak diperlukan dalam proses enzimatis dan dapat menghasilkan produk akhir yang dapat bermanfaat (Zhang, Chisti and Young, 1995; Mowery and Seidman, 2005). Setelah proses pemurnian diharapkan aktivitas spesifik enzim dapat meningkat karena kontaminan yang terdapat pada enzim telah dihilangkan. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat kemurnian enzim meningkat dari sebelumnya. Strategi pemurnian yang ideal memiliki tujuan antara lain mampu menghasilkan *recovery* maksimum pada protein target, kehilangan aktivitas seminimal mungkin, biaya yang murah dan juga pemisahan protein pencemar secara maksimal. Pada langkah awal dilakukan pemurnian parsial menggunakan metode non kromatografi (pengendapan dengan garam, polimer atau pelarut organik) yang bertujuan untuk menghilangkan sebagian besar kontaminan pada enzim (Mowery and Seidman, 2005).

Pemurnian parsial enzim dengan menggunakan ammonium sulfat/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  merupakan salah satu metode yang paling sering digunakan untuk menghilangkan protein yang tidak diinginkan. Metode pengendapan dengan menggunakan garam ammonium sulfat bekerja berdasarkan prinsip *salting out* yakni dengan mengubah kelarutan protein untuk menghilangkannya dari larutan dengan penambahan garam dalam konsentrasi tinggi (Zhang, Chisti and Young, 1995). Pengendapan dengan garam ammonium sulfat didasarkan pada persamaan sifat kepolaran dari ammonium sulfat dan air. Metode pengendapan

dengan ammonium sulfat ini sangat bergantung pada hidrofobitas protein, akibatnya setiap protein akan mengendap pada kejenuhan ammonium sulfat yang berbeda dan akhirnya dapat terjadi fraksinasi protein (Puspaningsih, 2004). Penambahan garam pada konsentrasi tinggi dapat menyebabkan molekul air yang semula terikat pada permukaan hidrofobik protein kemudian berikatan dengan garam. Molekul air yang berikatan dengan garam mengakibatkan protein saling berinteraksi, teragregasi dan akhirnya mengendap (Sinaga, Nugroho dan Dahliaty, 2010). Setiap keadaan yang menyebabkan ditariknya air yang mengelilingi molekul protein akan mengurangi kelarutan protein sehingga protein mengendap. Selain itu, garam dengan konsentrasi tinggi akan menetralkan muatan listrik, sehingga kelarutan semakin berkurang. Oleh karena pengendapan dengan cara ini hanya bersifat menarik air di sekeliling protein, sedangkan molekul protein sendiri tidak mengalami perubahan kimia, maka perubahan tersebut bersifat reversibel. Kelarutan dan fungsi protein akan kembali pulih bila dikembalikan pada keadaan semula. Penggunaan garam ammonium sulfat dipilih untuk proses pemurnian/ pemekatan enzim disebabkan kelarutannya yang tinggi, tidak beracun untuk kebanyakan enzim dan penambahan ammonium sulfat dapat menstabilkan enzim (Alviyulita, Hasibuan dan Hanum, 2014).

Kelebihan garam pada campuran enzim dan ammonium sulfat harus dihilangkan agar tidak mengganggu proses pemurnian selanjutnya. Metode ultrafiltrasi menggunakan tekanan gas untuk mendorong larutan melewati membran. Molekul protein yang memiliki ukuran lebih kecil dari pori membran akan melewati pori membran disebut “ultrafiltrat” sehingga terjadilah pemisahan antara molekul protein dengan ammonium sulfat sedangkan molekul yang lebih besar akan tetap berada pada larutan konsentrat (Scopes, 1987). Membran amicon merupakan membran semipermeabel yang tersedia dalam berbagai ukuran dimensi dan ukuran pori. Pori-pori pada membran

memungkinkan ukuran molekul yang lebih kecil untuk bergerak bebas melewati membran (Mowery and Seidman, 2005).

Enzim yang telah dimurnikan untuk kemudian dilakukan analisis protein dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Elektroforesis/ SDS-PAGE* hal ini untuk memastikan bahwa enzim telah melalui proses pemurnian dengan hilangnya pengotor protein. Prinsip penggunaan SDS-PAGE yakni dengan memisahkan polipeptida menurut masa molekul relatifnya (Mr). Molekul dengan densitas muatan tinggi dapat bermigrasi dengan cepat melalui gel, sedangkan molekul yang lebih besar akan semakin lama bermigrasi sehingga tertahan lebih lama pada gel (Kumar and Sharma, 2015). Penelitian ini dilakukan untuk memurnikan ekstrak kasar enzim selulase menggunakan metode pengendapan ammonium sulfat dengan beberapa fraksi yakni 0-30%, 30-60% dan 60-80% agar diperoleh enzim selulase yang lebih murni dari sebelumnya ditunjukkan melalui peningkatan aktivitas spesifik enzim, sehingga pada penelitian selanjutnya dapat digunakan untuk mengetahui aplikasi dari enzim tersebut. Konsentrasi ammonium sulfat sebanyak 60-80% pada ekstrak kasar enzim selulase diharapkan dapat meningkatkan aktivitas enzim lebih dari 50% (Yin, Lin and Xiao, 2010). Hal ini dapat digunakan sebagai dasar untuk penambahan garam amonium sulfat dan diharapkan dapat meningkatkan aktivitas enzim yang diuji melalui metode asam dinitrosalisilat/ DNS dan pengujian jumlah protein dengan metode Bradford.

## **1.2 Perumusan Masalah**

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

1. Apakah setelah pemurnian dengan metode ammonium sulfat terjadi peningkatan aktivitas spesifik enzim?

2. Berapakah persentase kejenuhan ammonium sulfat yang mampu menghasilkan aktivitas enzim selulase paling tinggi?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui persentase kejenuhan ammonium sulfat yang mampu menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi melalui peningkatan aktivitas spesifik enzim sehingga dapat diketahui metode ammonium sulfat dapat digunakan untuk pemurnian ekstrak kasar enzim selulase asal *Bacillus subtilis* strain SF01.

### **1.4 Hipotesa Penelitian**

1. Setelah dilakukan pemurniaan dengan metode ammonium sulfat terjadi peningkatan aktivitas spesifik enzim yang lebih besar dari aktivitas spesifik enzim sebelumnya.
2. Persentasi kejenuhan ammonium sulfat yang mampu menghasilkan aktivitas selulase tertinggi yakni pada 60-80%.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

1. Melalui penelitian ini diharapkan metode pengendapan dengan ammonium sulfat sesuai untuk pemurnian enzim selulase dari *Bacillus subtilis* strain SF01.
2. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pemurnian enzim selulase dari *Bacillus subtilis* strain SF01 dengan metode ammonium sulfat sehingga dapat diketahui kegunaan/ aplikasi dari enzim yang murni.