

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Enzim merupakan suatu biokatalis. Enzim diproduksi dari jaringan hidup dan berfungsi untuk menurunkan energi aktivasi pada suatu reaksi. Selulase merupakan enzim kelas hidrolase dengan substrat berupa selulosa. Selulase memiliki tiga komponen kompleks enzim selulase yaitu endo- $\beta$ -D-1,4-glukanase (CMCase), ekso- $\beta$ -D-1,4-glukanase dan  $\beta$ -D-1,4-glukosidase (Purwadaria, 1995).

Enzim selulase dihasilkan oleh bakteri, fungi dan tanaman yang memiliki aktivitas selulolitik. Bakteri yang memiliki aktivitas selulolitik misalnya genus *Acetivibrio*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, dan *Streptomyces* (Saratale *et al.*, 2012). Fungi yang memiliki aktivitas selulolitik misalnya *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium brasilianum*, *Trichordema reesei* (Kuhad *et al.*, 2011).

Dalam bidang industri enzim selulase dimanfaatkan dalam pembuatan kertas, tekstil, dan bioetanol (Wilson, 2009; Balasarvanan *et al.*, 2013), juga untuk mengelola limbah yang mengandung selulosa (Fawzya dkk., 2014). Di bidang kesehatan, pemberian enzim selulase secara oral digunakan dalam mengatasi *phytobezoar*, yaitu suatu kumpulan masa yang kompak terdiri dari selulosa, rambut, semen, dan bahan tak tercerna lainnya dari tumbuhan, jika terlalu lama dibiarkan akan menjadi tukak lambung atau *ulcer* (Lee *et al.*, 1977).

Setiap sumber penghasil enzim selulase memiliki karakteristik yang berbeda. Hal-hal yang dapat mempengaruhi karakteristik enzim antara lain yaitu suhu, pH, konsentrasi substrat, waktu inkubasi. Suhu optimum enzim selulase bervariasi dari setiap sumber penghasilnya, yaitu 37°C yang

dihasilkan oleh genus *Cellvibrio* hingga 80°C yang dihasilkan oleh *Bacillus pasteurii* (Forgaty and Weshoff, 1983). Kenaikan suhu dapat meningkatkan laju reaksi (Kennely and Rodwell, 2009), jika kondisi suhu pada enzim selulase asal *Bacillus subtilis* SF01 terlalu tinggi (melebihi suhu optimum 60°C) maka enzim tersebut akan terdenaturasi atau struktur enzim tersebut berubah dan kemampuan katalitiknya berkurang atau bahkan hilang (Kennely and Rodwell, 2009; Fajarpel, 2015). Setiap sumber penghasil enzim selulase juga memiliki pH optimum yang bervariasi, yaitu pH 5 yang dihasilkan oleh *Clostridium thermocellum*, hingga pH 10 yang dihasilkan oleh *Bacillus pumillus* (Forgaty and Weshoff, 1983). Kondisi pH enzim selulase asal *Bacillus subtilis* SF01 yang terlalu tinggi maupun terlalu rendah dari pH optimum 5, dapat membuat enzim terdenaturasi (Kennely and Rodwell, 2009; Fajarpel, 2015). Konsentrasi substrat mempengaruhi laju reaksi enzim, yaitu dengan tiap penambahan substrat, maka laju reaksi makin cepat hingga pada kecepatan maksimum dan konstan, sehingga tidak terjadi peningkatan laju reaksi (Kennely and Rodwell, 2009).

Pada penelitian-penelitian sebelumnya telah ditemukan banyak sumber-sumber penghasil enzim selulase, namun karakternya dapat berbeda dan tidak menutup kemungkinan bila ditemukan sumber penghasil selulase yang lain. Pada penelitian sebelumnya, Susanto (2012) mengisolasi bakteri selulolitik yang berasal dari limbah ampas tebu, kemudian diamati secara makroskopis dan mikroskopis dengan pewarnaan dan tanpa pewarnaan. Selanjutnya dikarakterisasi secara biokimia dan uji kit menggunakan *Microbact: Gram-negative identification system*. Akhirnya disimpulkan bahwa bakteri tersebut termasuk dalam genus *Bacillus*, selanjutnya isolat bakteri tersebut diberi kode SF01. Penelitian berikutnya isolat bakteri tersebut dilakukan tes homologi gen penyandi 16S rRNA. Isolasi DNA kromosom dari bakteri untuk amplifikasi gen penyandi 16S rRNA

dilakukan dengan menggunakan mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil tes homologi gen penyandi 16S rRNA, menunjukkan bahwa gen penyandi 16S rRNA memiliki 99% kemiripan terhadap *Bacillus subtilis* Strain B7 (Ariputri, 2014). Kemudian isolat bakteri dari limbah ampas tebu disebut *Bacillus subtilis* Strain SF01. Setelah dikarakterisasi lanjut, enzim selulase yang dihasilkan *Bacillus subtilis* Strain SF01 memiliki pH optimum 5 dan suhu optimum 60°C (Fajarpel, 2015).

Dalam memproduksi enzim, seringkali dilakukan pemurnian yang bertujuan untuk meningkatkan aktivitas enzim, karena ekstrak kasar protein masih memiliki protein yang tidak berperan sebagai enzim yang mengganggu kinerja enzim tersebut (Gilbert, 2000). Beberapa senyawa yang digunakan dalam pemurnian adalah amonium sulfat, urea dan sodium dodesil sulfat (SDS) (Scopes, 1987; Ahmed, 2005).

Penambahan amonium sulfat pada selulase digunakan dalam pengendapan protein (*salting-out*). Penambahan amonium sulfat dengan konsentrasi 80% (6 M) pada enzim selulase asal *Penicillium sp.* LBKURCC20, menyebabkan aktivitas enzim meningkat hingga 13,5 kali dari aktivitas enzim tanpa penambahan amonium sulfat (Sinaga, Nugroho, dan Dahliaty, 2014). Aktivitas enzim selulase asal *Trichoderma sp.* LBKURCC28 dapat meningkat 75 kali dari aktivitas enzim tanpa penambahan amonium sulfat (Kurniawan, Nugroho, dan Dahliaty, 2014), dan juga aktivitas enzim asal *Penicillium sp.* LBKURCC27 dapat meningkat 12 kali dari aktivitas enzim tanpa penambahan amonium sulfat (Sarip, Nugroho, dan Teruna, 2014).

Penambahan urea dengan konsentrasi 8 M menurunkan aktivitas enzim selulase asal *Mirotherium cellulose* (Datta *et al.*, 1960) dan dapat mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim selulase asal *Trichoderma reesei*, namun pada konsentrasi 2–5 M aktivitas enzim selulase meningkat

(Arunachalam and Kellis, 1996). Pengaruh penambahan urea pada konsentrasi 0 – 5 M juga dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase asal *Apergillus glaucus* XC9 (Tao *et al.*, 2011).

Penambahan SDS pada konsentrasi 6 – 45 mM terhadap selulase asal *Trichoderma reesei* menyebabkan enzim ini mengalami denaturasi dan aktivitasnya menurun. Namun aktivitas enzim meningkat pada penambahan SDS konsentrasi 100 mM dan aktivitas enzim menurun kembali pada konsentrasi 150 – 200 mM. Hal tersebut dikarenakan bahwa SDS memberi efek ganda pada selulase yaitu sebagai denaturan yang membentangkan struktur selulase yang semula  $\alpha$ -helix, dan sebagai *recovery reagent*, mendapatkan kembali aktivitas enzimatis sampai batas tertentu (Xiang *et al.*, 2006).

Selulase asal *Bacillus subtilis* Strain SF01 diproduksi melalui fermentasi dalam media *Nutrient Broth + Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 1% selama 21 jam. Kadar protein dalam ekstrak kasar enzim ditentukan dengan metode *Bradford* dan pembandingan *Bovine Serum Albumin* (BSA). Aktivitas selulase diuji menggunakan substrat CMC 1% pada pH 5,0 dan 60°C. Gula pereduksi yang dihasilkan direaksikan dengan asam 3,5-dinitrosalisilat dan diamati secara spektrofotometri pada panjang gelombang 550 nm, dengan pembandingan glukosa. Pengaruh senyawa amonium sulfat, urea, dan sodium dodesil sulfat diuji dengan mencampur enzim dan larutan senyawa selama 20 menit, sebelum direaksikan dengan substrat. Hasil penelitian menunjukkan ketiga senyawa uji memberikan hasil peningkatan atau penurunan aktivitas spesifik enzim yang tidak bermakna secara statistik (*one way ANOVA*,  $\alpha = 95\%$ ).

Pada penelitian ini akan dilakukan uji pengaruh penambahan senyawa amonium sulfat, urea, dan sodium dodesil sulfat terhadap aktivitas

enzim selulase asal *Bacillus subtilis* SF01, sehingga diperoleh informasi mengenai senyawa yang mempengaruhi aktivitas enzim yang dapat digunakan sebagai dasar pertimbangan dalam pemilihan bahan-bahan yang akan digunakan dalam melakukan produksi dan purifikasi enzim selulase asal *Bacillus subtilis* Strain SF01.

## **1.2 Rumusan Masalah**

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

1. Bagaimana pengaruh penambahan senyawa amonium sulfat tiap variasi konsentrasi yang ditambahkan terhadap aktivitas enzim selulase asal *Bacillus subtilis* SF01?
2. Bagaimana pengaruh penambahan senyawa urea tiap variasi konsentrasi yang ditambahkan terhadap aktivitas enzim selulase asal *Bacillus subtilis* SF01?
3. Bagaimana pengaruh penambahan senyawa sodium dodesil sulfat tiap variasi konsentrasi yang ditambahkan terhadap aktivitas enzim selulase asal *Bacillus subtilis* SF01?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh penambahan senyawa amonium sulfat, urea dan sodium dodesil sulfat tiap variasi konsentrasi yang ditambahkan terhadap aktivitas enzim selulase asal *Bacillus subtilis* SF01.

#### **1.4 Hipotesis Penelitian**

Pada penelitian ini dapat ditarik hipotesa :

1. Penambahan amonium sulfat akan meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolate *Bacillus subtilis* strain SF01 mulai pada konsentrasi 6,6% hingga 19,8%
2. Penambahan urea akan meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolat *Bacillus subtilis* strain SF01 dari konsentrasi 12 hingga 30%.
3. Penambahan Sodium Dodesil Sulfat akan meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolat *Bacillus subtilis* strain SF01 pada konsentrasi 0,1 % hingga 2%

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi pengaruh senyawa Amonium sulfat, Urea dan SDS tiap variasi konsentrasi yang ditambahkan terhadap aktivitas enzim selulase asal *Bacillus subtilis* SF01
2. Menunjang proses produksi, purifikasi, dan karakterisasi dari enzim selulase asal *Bacillus subtilis* Strain SF01