### JURNAL SKRIPSI

Oleh: ROSYIDA IRAWATI NIM. 10630059



JURUSAN KIMIA FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG 2016

**SKRIPSI** 

Oleh: ROSYIDA IRAWATI NIM. 10630059

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

JURUSAN KIMIA FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG 2016

#### **SKRIPSI**

Oleh: ROSYIDA IRAWATI NIM. 10630059

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji: Tanggal: 11 Januari 2016

**Pembimbing I** 

**Pembimbing II** 

Akyunul Jannah, S,Si, M.P NIP. 19750410 200501 2 009 Nur Aini, M.Si NIPT. 20130910 2 2 316

Mengetahui, Ketua Jurusan Kimia

Elok Kamilah Hayati, M. Si NIP. 19790620 200604 2 002

### **SKRIPSI**

Oleh: ROSYIDA IRAWATI NIM. 11630057

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si) Tanggal: 11 Januari 2016

Penguji Utama	: Rachmawati Ningsih, M.Si		)
	NIP. 19810811 200801 2 010		
Ketua Penguji	: Anik Maunantin, S,T, M.P		)
	NIPT. 20140201 2 412		
Sekretaris Penguji	: Akyunul Jannah, S.Si, M.P	(	)
	NIP. 19750410 200501 2 009		
Anggota Penguji	: Nur Aini, M.Si	(	)
	NIPT. 20130910 2 2 316		

Mengesahkan, Ketua Jurusan Kimia

Elok Kamilah Hayati, M. Si NIP. 19790620 200604 2 002

### SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:
Nama : Rosyida Irawati
NIM : 10630059

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : "Karakterisasi pH, Suhu dan Konsentrasi Substrat pada

Enzim Selulase Kasar yang Diproduksi oleh Bacillus

circulans"

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 11 Januari 2016 Yang Membuat Pernyataan,

Rosyida Irawati NIM. 10630059

#### **ABSTRAK**

Irawati, Rosyida. 2016. Karakterisasi pH, Suhu dan Konsentrasi Substrat pada Enzim Selulase Kasar yang Diproduksi oleh *Bacillus circulans*. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Akyunul Jannah, S.Si., M.P.; Pembimbing II: Nur Aini, M.Si.; Konsultan: Anik Maunatin, S.T., M.P.

Kata Kunci: Bacillus circulans, aktivitas selulase, karakteristik

Kebutuhan akan enzim semakin meningkat di era globalisasi saat ini. Enzim selulase adalah salah satu jenis enzim yang memiliki peranan penting dalam biokonversi limbah-limbah organik. Karakterisasi enzim selulase dapat membantu mengetahui kondisi optimum enzim saat bekerja. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik enzim selulase dari Bacillus circulans meliputi pH, suhu, dan konsentrasi substrat. Karakterisasi enzim ditentukan dengan menguji aktivitas enzim pada variasi pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; dan 9,0); variasi suhu (30; 37; 40; dan 50) °C yang dilakukan pada kondisi pH optimum hasil perlakuan sebelumnya; dan variasi konsentrasi substrat CMC (Carboxymethyl Cellulose) (1,0; 1,5; 2,0; 2,5; dan 3,0) % yang dilakukan pada kondisi pH dan suhu optimum hasil perlakuan sebelumnya. Aktivitas enzim selulase ditentukan berdasarkan kadar gula reduksi yang dihasilkan menggunakan metode DNS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar enzim selulase yang diproduksi oleh Bacillus circulans memiliki karakteristik pada pH 8 dengan aktivitas enzim sebesar 2,17 x 10<sup>-2</sup> Unit/mL. Suhu karakteristik adalah suhu 37 °C dengan aktivitas enzim sebesar 2,19 x 10<sup>-2</sup> Unit/mL. Konsentrasi substrat karakteristik adalah pada konsentrasi substrat 2,5 % dengan aktivitas enzim sebesar 2,21 x 10<sup>-2</sup> Unit/mL dan menghasilan nilai V<sub>maks</sub> dan K<sub>M</sub> sebesar 0,0235 Unit/mL dan 0,2166 %.

#### **ABSTRACT**

Irawati, Rosyida. 2016. Characterization of Crude Cellulase Enzymes in pH, Temperature and Substrate Consentration was produced by *Bacillus circulans*. Undergraduate Thesis. Chemistry Major. Faculty of Science and Technology, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.Advisor I: Akyunul Jannah, S.Si., M.P.; Advisor II: Nur Aini, M.Si.; Consultant: Anik Maunatin, S.T., M.P.

**Key Words**: Bacillus circulans, cellulase activity, characteristics

Enzyme is demand increasing in this globalization era. Cellulase enzymes are one of the enzymes that play an important role in the bioconversion of organic waste. Characterization of cellulase enzyme can help determine the optimum conditions the enzymes at work. This study aimed to determine the characteristics of cellulase enzymes from Bacillus circulans including pH, temperature, and substrate concentration. Characterization of the enzyme was determined by testing the enzyme activity at various pHs (5.0; 6.0; 7.0; 8.0; and 9.0); various temperatures (30; 37; 40; and 50)°C conducted at optimum pH result from the previous treatment; and various CMC substrate concentrations (1.0; 1.5; 2.0; 2.5, and 3.0)% conducted under optimum pH and temperature conditionfrom the previous treatments. Cellulase enzyme activity was determined based on reduction sugar level generated using DNS method. The results showed that the crude extract of cellulase enzymes produced by Bacillus circulans had characteristics of pH of 8.0 with enzyme activity of 2.17 x 10<sup>-2</sup> Units/mL. Characteristic of temperature was 37°C with the enzyme activity of 2.19 x 10-2 Units/mL. Characteristic of the substrate concentration was at substrate concentration of 2.5% with the enzyme activity of  $2.21 \times 10^{-2}$  Units/mL and producing the values of  $V_{max}$  and  $K_{M}$ respectively at 0.0235 Units/mL and 0.2166%.

### ملخص

إروتي, رشيدة. 2016. وصف الدرجة الحمضية, درجة الحررة و تركيز الاساس في الإنزيم الخليوز الذي يستخرج بباسيلوس سركولس (Bacillus circulans). بحث العلم. كلية العلوم والتكنولوجي بقسم الكيمياء بالجامعة الإسلامية الحكمية مولانا مالك إبراهيم بمالانج. مشرفة الاولى: اعين الجنة الماجستر. المشريفة الثانية: نور عين الماجستر. المستشارة: أنيك موناتن الماجستر.

الكلمة الرئيسة: باسيلوس سركولس (Bacillus circulans), تنشيط الخليوز, خاصيّة.

#### KATA PENGANTAR



Assalamu'alaikum Wr. Wb

Puji syukur penulis ucapkan kehadirat Allah SWT karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan judul "Karakterisasi pH, Suhu dan Konsentrasi Substrat Pada Enzim Selulase Kasar yang Diproduksi oleh *Bacillus circulans*" ini dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa terlimpahkan kepada Nabi besar Muhammad SAW yang dengan sabar membimbing umatnya menuju keadaan penuh ilmu dan naungan tata krama yakni *Ad-diinul Islam*.

Penulis menyadari bahwa baik dalam perjalanan studi maupun penyelesaian skripsi ini banyak memperoleh bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- 1. Bapak, ibu dan kakak penulis yang selalu membimbing, mendidik, mengarahkan dan senantiasa mendoakan hingga proses penyusunan skripsi ini terselesaikan
- 2. Prof. DR. H Mudjia Raharjo, M.Si, selaku rektor universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 3. Dr. Bayyinatul Muchataromah, drh. M.Si, selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 4. Elok Kamila Hayati, M.Si selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 5. Akyunul Jannah, S.Si, M.P, Anik Maunantin, S.T, M.P dan Nur Aini, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu untuk membimbing penulis demi terselesainya tugas ini.
- 6. Seluruh Dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Seluruh Staf Laboratorium dan Staf Administrasi Jurusan Kimia dan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Kakak-kakak, teman-teman dan adik-adik Kimia angkatan 2008, 2009, 2010, 2011, 2012 Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 9. Teman-teman Sumbersari 161 (Diah, Maya, Echa', Fida, Ninis, Kis, Vera, Daus, Dina, Nisa, Ima dan Ilul)
- 10. Serta pihak-pihak yang telah membantu penulis yang tidak mungkin disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Penulis berharap semoga dengan tersusunnya skripsi ini dapat memberikan manfaat dan masukan bagi kita semua. *Amin Ya Rabbal Alamin* 

Malang, 12 Januari 2016

Penulis

### **DAFTAR ISI**

HALAM	AN JU	DUL	
LEMBAF	R PEN	RNYATAAN	i
LEMBAF	R PERS	SETUJUAN	ii
LEMBAF	R PEN	GESAHAN	. iii
LEMBAF	RORIS	SINALITAS	iv
KATA PI	ENGA	NTAR	v
<b>DAFTAR</b>	ISI		vii
<b>DAFTAR</b>	GAM	BAR	. ix
		EL	
DAFTAR	LAM	PIRAN	. xi
ABSTRA	K		xii
BAB I	PEN	DAHULUAN  Latar Belakang	
	1.1	Latar Belakang	1
	1.2	Rumusan Masalah	6
	1.3	Tujuan Penelitian	
	1.4	Batasan Masalah	
	1.5	Manfaat Penelitian	
BAB II	TINJ	JAUAN PUSTAKA	
	2.1	Selulosa	7
	2.2	Bacillus circulans	
	2.3	Enzim Enzim	.11
	2.4	Enzim Selulase	
	2.5	Hidrolisis Selulosa menjadi Glukosa	
	2.6	Glukosa	
	2.7	Metode DNS (dinitrosalicylic acid)	
	2.8	Spektrofotometer UV-Vis	
	2.9	Kajian Penelitian dalam Perspektif Islam	
		CERPUS !!	
<b>BAB III</b>	MET	TODOLOGI PENELITIAN	
	3.1	Waktu dan Tempat	.27
	3.2	•	.27
		3.2.1 Alat	.27
		3.2.2 Bahan	.27
	3.3 R	Cancangan Penelitian	.27
		ahapan Penelitian	
	3.5 C	Cara Kerja	.29
		3.5.1 Pembuatan Media	
		3.5.1.1 Pembuatan Media CMC Agar	.29
		3.5.1.2 Pembuatan Media CMC Cair 1 %	
		3.5.1.3 Pembuatan Media Nutrien Agar	.30
		3.5.2 Peremajaan Bacillus circulans	
		3.5.3 Uji Konfirmasi <i>Bacillus circulans</i> terhadap produksi	
		Enzim Selulase secara Kualitatif	.31
		3.5.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Selulase	.31

		3.5.5 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase	31
		3.5.6 Karakterisasi Enzim Selulase	32
		3.5.6.1 Penentuan pH Optimum Enzim Selulase	32
		3.5.6.2 Penentuan Suhu Optimum	
		3.5.6.3 Penentuan V <sub>max</sub> dan K <sub>m</sub> Enzim Selulase	
		3.5.7 Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase Metode	
		Dinitrosalicylic Acid (DNS)	34
		3.5.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	
		3.5.7.2 Pembuatan Kurva Standart	
		3.5.7.3 Analisis Kadar Gula pada Sampel	35
	3.6 A	Analisis Data	35
BAB IV	PEN	MBAHASAN	
	4.1	Prosedur Analisis Enzim SelulaseKasar	36
		4.1.1 Pembuatan Media	36
		4.1.2 Peremajaan Bacillus circulans	37
	4,2	Uji Konfirmasi Bacillus circulans terhadap	
		Enzim selulase secara Kualitatif	38
	4.3		39
	4.4	Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase	41
	4.5	Kurva Standart Glukosa menggunakan Metode DNS	41
	4.6	Karakterisasi Enzim Selulase	43
		4.6.1 Penentuan pH Optimum Ekstrak Kasar Selulase	44
		4.6.2 Penentuan Suhu Optimum Ekstrak Kasar Selulase	49
		4.6.3 Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum Ekstrak l	Kasar
		Selulase	52
	4.7	Kajian Penelitian dalam Perspektif Islam	56
D . D	DEL.		
BAB V		TUTUP  Kesimpulan	
	5.1	Kesimpulan	60
	5.2	Saran Saran	60
DAFTAR	R PUST	ГАКА	61

# DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur selulosa	7
Gambar 2.2 Kurva pertumbuhan bakteri	9
Gambar 2.3 Kurva hubungan konsentrasi substrat terhadap aktivitas selulase	10
Gambar 2.4 Hubungan Antara Konsentrasi Substrat dan kecepatan Reaksi	
Enzimatis	15
Gambar 2.5 Kurva hubungan 1/[S] dan 1/V aktivitas enzim selulase	16
Gambar 2.6 Struktur D-glukosa	21
Gambar 2.7 Reaksi glukosa dengan pereaksi DNS	22
Gambar 4.1 Uji enzim selulase kualitatif	38
Gambar 4.2 Dugaan ikatan antara Congo red dengan selulosa	39
Gambar 4.3 Kurva pertumbuhan Bacillus circulans	
Gambar 4.4 Kurva Standart Glukosa	
Gambar 4.5 Reaksi DNS dengan glukosa	43
Gambar 4.6 Kurva pengaruh pH terhadap enzim selulase	
dalam substrat CMC	45
Gambar 4.7 Reaksi Enzim Selulase terhadap Selulosa	46
Gambar 4.8 Kurva pengaruh suhu terhadap enzim selulase	
dalam substrat CMC	50
Gambar 4.9 Kurva pengaruh konsentrasi Substrat CMC	
terhadap e <mark>nzim selulase</mark>	53
Gambar 4.10 Grafik hubungan 1/V dengan 1/[S] berdasarkan persamaan	
Lineweaver-Burk	56

# DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kebutuhan Glukosa	21
Tabel 4.1 Hasil Analisis pengaruh pH terhadap enzim selulase	
dalam substrat CMC	45
Tabel 4.2 Hasil Analisis pengaruh suhu terhadap enzim selulase	
dalam substrat CMC	49
Tabel 4.3 Hasil Analisis pengaruh konsentrasi substrat CMC	
terhadap enzim selulase	52



# DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir	66
Lampiran 2. Pembuatan Larutan	71
Lampiran 3. Indeks selulolitik	74
Lampiran 4. Kurva pertumbuhan bakteri dan aktivitas enzim	75
Lampiran 5. Kurva standart glukosa	76
Lampiran 6. Perhitungan aktivitas enzim	77
Lampiran 7. Perhitungan statistik	78
Lampiran 8. Nilai V <sub>maks</sub> dan K <sub>M</sub>	89
Lampiran 9. Dokumentasi	90



#### BAB I

#### **PENDAHULUAN**

### 1.1 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<sup>8</sup> sampai 10<sup>11</sup> kali lebih cepat daripada tanpa menggunakan katalis (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006). Salah satu jenis enzim yang memiliki peranan penting dalam biokonversi limbah-limbah organik adalah enzim selulase.

Enzim selulase digunakan secara luas dalam industri tekstil, deterjen, pulp dan kertas. Enzim selulase juga digunakan dalam pengolahan kopi (Frazier dkk,. 1988) 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., 2006). Enzim selulase merupakan biokatalisator pada reaksi biokimia yang dapat menghidrolisis selulosa menjadi glukosa.

Enzim dapat diproduksi oleh tanaman, hewan dan mikroorganisme. Enzim dari mikroorganisme lebih banyak digunakan dibandingkan dari tanaman atau hewan karena mikroorganisme dapat berkembang biak dengan cepat, pertumbuhan relatif mudah diatur, enzim yang dihasilkan tinggi sehingga ekonomis bila digunakan untuk industri dan enzim yang dihasilkan lebih stabil (Yusak. 2004). Mikoorganisme penghasil enzim dapat berupa fungi dan bakteri.

Mikroorganisme penghasil selulase dari kelompok bakteri menjadi pilihan utama karena memiliki pertumbuhan yang cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi selulase menjadi lebih pendek (Alam dkk, 2004). Selain itu, bakteri juga memiliki ukuran molekul selulase yang lebih kecil dibandingkan dengan fungi sehingga lebih mudah untuk berdifusi ke jaringan tumbuhan yang mengandung selulosa (Li dan Gao, 1997). Salah satu bakteri yang dapat menghasilkan enzim selulase adalah *Bacillus circulans*.

Bacillus circulans merupakan salah satu bakteri yang mudah ditemukan. Bacillus circulans dapat diisolasi dari tanah, air laut ataupun air rawa (Hatmanti, 1998 dalam Hatmanti 2000). Bacillus circulans memiliki beberapa keunggulan sebagai sumber sistem selulase yaitu tidak bersifat patogen, mudah ditumbuhkan, media pertumbuhannya murah, dan menghasilkan sistem selulase dengan aktivitas yang tinggi. Selain itu, Bacillus circulans tumbuh baik pada kondisi basa dalam memproduksi selulase (Susanti, 2011). Ray dkk (2007) melaporkan bahwa Bacillus circulans memproduksi selulase dengan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan Bacillus subtilis di sekitaran pH netral, yaitu antara pH 7 – 7,5. Bacillus circulans memiliki aktivitas selulase di sekitaran nilai 25 U/mL sementara Bacillus subtilis disekitaran nilai 20 U/mL.

Seperti halnya yang disebutkan dalam firman Allah SWT surat ar-Ra'd [13]: 3

Artinya: dan Dia-lah Tuhan yang membentangkan bumi dan menjadikan gununggunung dan sungai-sungai padanya. dan menjadikan padanya semua buah-buahan berpasang-pasangan, Allah menutupkan malam kepada siang. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang memikirkan (Q.S. ar-Ra'd [13]: 3)

Firman Allah ini menjelaskan bahwa Dialah Tuhan yang membentangkan bumi menjadi luas dan lebar dan supaya mudah dijadikan tempat kediaman makhluk-Nya. Semua binatang dapat hidup di atasnya dengan sempurna dan leluasa dan manusia dapat mengambil manfaat dari hasil buminya, hewan-hewannya dan benda-benda logam yang terpendam di dalamnya dan dapat berkeliaran di muka bumi untuk mencari rezeki dan segala kemanfaatanya (As-Suyuti, 2008). Berdasarkan ayat tersebut, maka dapat dihubungkan dengan bakteri sebagai makhluk bumi kecil Allah yang memiliki peranan penting dalam kehidupan. Bakteri hidup di berbagai tempat seperti air, tanah ataupun udara. Bakteri bekerja membantu kelangsungan hidup makhluk hidup lainnya dengan cara menguraikan sumber makanannya di tempat dimana bakteri berada. Hasil penguraian bakteri seperti enzim dapat diambil manfaatnya untuk kelangsungan hidup makhluk lain. Seperti dalam firman Allah SWT surat an-Nahl [16]:13:

Artinya: Dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran (Q.S. an-Nahl [16]: 13).

Firman Allah menjelaskan ketika Allah telah mengingatkan atas tandatanda yang ada di langit, Dia mengingatkan atas apa yang Dia ciptakan di bumi, berupa benda-benda yang menajubkan dan berbagai macam sesuatu, diantaranya binatang-binatang, benda-benda tambang, tumbuh-tumbuhan dan benda-benda mati, dengan berbagai macam warna dan bentuknya termasuk kegunaan dan

keistimewaannya (Syaikh, 2007). Bakteri adalah salah satu makhluk Allah dengan keistimewaannya yang mampu menghasilkan enzim dan mampu mendegradasi makhluk yang telah mati agar siklus kehidupan dapat berputar. Setiap enzim dari berbagai bakteri akan memiliki kondisi optimum untuk bekerja. Demikianlah Allah mengatur dan memperhitungkan segala yang ada di bumi dan di langit.

Kerja suatu enzim akan dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, kondisi suhu, pengaruh pH dan pengaruh inhibitor (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006). Faktor ini akan mempengaruhi enzim dalam menghasilkan produk. Setiap enzim memiliki kondisi optimum yang berbeda dalam kerjanya. Oleh karena itu, enzim memiliki karakteristik/ciri khas masing-masing. Ketika enzim digunakan sesuai karakteristiknya maka akan diperoleh kerja enzim yang maksimum.

Enzim seluase memiliki kondisi yang karakteristik. Karakteristik enzim selulase dapat diketahui dengan menentukan kondisi optimum diantaranya meliputi pH, suhu dan konsentrasi substrat. Kondisi pH optimum dibutuhkan enzim untuk mengaktifkan seluruh enzim dalam mengikat substrat menjadi produk (Susanti, 2011). Perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim yang dapat menyebabkan denaturasi (Poedjiadi, 2004). Penelitian Susanti (2011) menyatakan pH optimum aktivitas ekstrak kasar selulase tertinggi pada CMCase oleh *Bacillus circulans* koleksi biakan murni Laboratorium Mikrobiologi ITB dengan nilai 129,97 U/mL adalah pada pH 7. Meryandini dkk (2009) melakukan isolasi bakteri selulolitik dari tanah dan diperoleh isolat C4-4 dan C11-1. Hasil karakterisasi pH optimum enzim selulase

isolat C4-4 dan C11-1 adalah pada pH 5 dan 8. Kondisi pH optimum selulase oleh *Bacillus* sp adalah pH 6 (Vijayaraghavan dan Vincent, 2012).

Pada suhu optimal, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat (Masfufatun, 2011). Karakterisasi enzim selulase oleh bakteri selulolitik yang diisolasi dari bekatul menghasilkan suhu optimum, yaitu 50 °C (Saropah, 2012). Yin dkk (2010) menyatakan suhu optimum selulase oleh *Bacillus subtilis* adalah 60 °C. Suhu optimum enzim selulase umumnya berkisar antara 40 – 60 °C (Akhtar, 1998 dalam Susanti, 2012).

Konsentrasi substrat berpengaruh terhadap kontak enzim-substrat. Enzim-substrat memiliki spesifitas yang tinggi. Apabila substrat cocok dengan enzim, maka kinerja enzim juga akan optimal (Aziz, 2012). Saropah (2012) melakukan karakterisasi enzim selulase oleh bakteri selulolitik menggunakan variasi konsentrasi substrat (0,5 – 1,5 %) dan hasil optimum berada pada konsentrasi 1,5 %. Hasil ini menghasilkan nilai V<sub>maks</sub> 0,0086 Unit/mL serta K<sub>m</sub> I,6943 %. Konsentrasi substrat optimum aktivitas ekstrak kasar selulase tertinggi pada CMCase oleh *Bacillus circulans* menggunakan variasi substrat (0,1 – 2,0 %) dengan hasil optimum adalah konsentrasi 1 %. Enzim selulase memiliki nilai V<sub>maks</sub> 1000 μg glukosa/jam dan K<sub>M</sub> 5 % (Susanti, 2011).

Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat dinyatakan bahwa aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Enzim selulase memiliki kondisi optimum yang berbeda tergantung darimana enzim dihasilkan. Oleh karena itu penentuan kondisi optimum meliputi pH, suhu dan konsentrasi substrat optimum pada enzim hasil produksi *Bacillus circulans* perlu dikaji lebih lanjut.

#### 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana karakteristik enzim selulase kasar yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus circulans*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui karakteristik enzim selulase kasar yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus circulans*.

#### 1.4 Batasan Masalah

- 1. Karakterisasi enzim meliputi kondisi pH, suhu dan konsentrasi substrat
- 2. Variasi kondisi pH yang digunakan 5, 6, 7, 8 dan 9
- 3. Variasi kondisi suhu yang digunakan 30 °C; 37 °C; 40 °C dan 50 °C
- 4. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan 1,0 %; 1,5 %; 2,0 %; 2,5 % dan 3,0 %

### 1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang karakteristik enzim selulase yang diproduksi oleh bakteri *Bacillus circulans*.

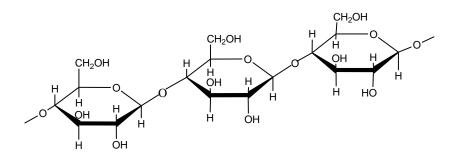
#### **BAB II**

#### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Selulosa

Selulosa tersusun atas D-glukosa yang terikat melalui ikatan  $\beta(1\rightarrow 4)$ . Selulosa adalah polimer yang tidak bercabang yang terdiri dari 100-14.000 monosakarida atau lebih. Ikatan  $\beta(1\rightarrow 4)$  tidak dapat diputuskan oleh enzim  $\alpha$ -amilase (Lehninger, 1997). Struktur linier ini menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Di alam, biasanya selulosa berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tanaman (Holtzapple, 1993).

Selulosa merupakan komponen terbesar pada dinding tanaman. Keberadaan pada dinding tanaman bersama-sama dengan hemiselulosa dan lignin. Oleh karena itu, serat tanaman biasa disebut lignoselulosa (Sukadarti, dkk., 2010). Mikrofibrin selulosa terdiri atas bagian amorf (15 %) dan bagian berkristal (85 %). Struktur berkristal dan adanya lignin serta hemiselulosa merupakan hambatan utama untuk menghidrolisis selulosa (Sjostrom, 1995). Pada proses hidrolisis sempurna menghasilkan glukosa, sedangkan proses hidrolisis sebagian akan menghasilkan disakarida selobiosa. Struktur selulosa adalah sebagai berikut (Sjostrom, 1995):



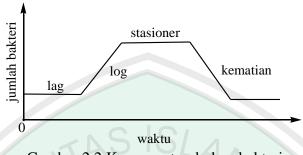
Gambar 2.1 Struktur selulosa

#### 2.2 Bacillus circulans

Bakteri merupakan mikrobia prokariotik uniseluler yang berkembang biak secara aseksual dengan pembelahan sel. Cara hidup bakteri dapat hidup bebas, parasitik, saprofitik, patogen pada manusia, hewan dan tumbuhan (Sumarsih, 2003). Bakteri merupakan organisme yang mempunyai penyebaran terluas di alam. Bakteri mampu hidup di berbagai habitat dan mampu menguraikan senyawa-senyawa kompleks menjadi lebih sederhana untuk memperoleh zat tertentu yang dibutuhkan dalam mempertahankan hidupnya. Bakteri dengan kemampuan tersebut menjadi organisme terpenting yang berperan dalam proses penguraian dan dekomposisi (Hatmanti, 2000).

Bakteri memiliki 4 fasa hidup, yaitu fasa lag, log, stasioner dan kematian. Pada fasa lag, jumlah perubahan sel sangat sedikit, sel tidak aktif karena populasi mikroba sedang mengalami aktivitas metabolisme tertentu yang meliputi DNA dan sintesis enzim, jadi tidak ada perubahan jumlah tetapi perubahan massa. Pada fasa log (eksponensial) sel mulai membelah dan masuk ke dalam periode pertumbuhan, reproduksi sel paling aktif dan waktu generasinya konstan. Pada fasa stasioner, laju pertumbuhan lambat sehingga jumlah sel yang hidup dan mati seimbang dan populasinya stabil. Penyebab terhentinya pertumbuhan bakteri pada fasa ini adalah ketika konsentrasi sel sangat besar kekurangan nutrisi, akumulasi produk limbah dan lain-lain (Tortora dkk., 2001). Pada fasa stasioner beberapa spesies mikroba mensintesis beberapa produk yang tidak berperan penting dalam pertumbuhan sel, produk ini disebut metabolit sekunder. Metabolit sekunder dapat bersifat sebagai antimikroba, inhibitor enzim, promoter pertumbuhan, dll (Rachman, 1989). Pada fasa kematian, jumlah kematian akhirnya melebihi jumlah

sel-sel baru terbentuk dan koloni memasuki fasa kematian atau penurunan fasa logaritmik (Tortora dkk, 2001).



Gambar 2.2 Kurva pertumbuhan bakteri

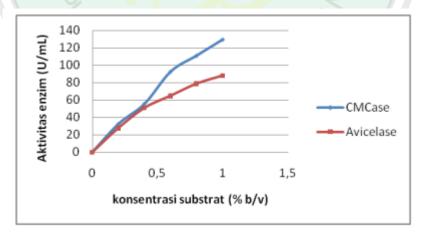
Bakteri mempunyai bentuk dasar bulat, batang, dan lengkung. Bentuk bakteri dapat dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu. Bakteri dapat mengalami *involusi*, yaitu perubahan bentuk yang disebabkan faktor makanan, suhu, dan lingkungan yang kurang menguntungkan bagi bakteri. Selain itu dapat mengalami *pleomorfi*, yaitu bentuk yang bermacam-macam dan teratur walaupun ditumbuhkan pada syarat pertumbuhan yang sesuai. Umumnya bakteri berukuran 0,5 – 10 μ (Sumarsih, 2003).

*Bacillus* merupakan perwakilan dari bakteri gram positif berbentuk batang yang terdapat di alam. Genus *Bacillus* merupakan salah satu kelompok bakteri yang mampu mendegradasi selulosa (Biorata, 2012). Marga *Bacillus* merupakan saprofit ringan yang tak berbahaya, mudah tumbuh dalam kerapatan tinggi, mampu membentuk endospora yang tahan panas, dan mampu tumbuh pada temperatur 10 - 50 °C (Salle, 1984 dalam Hatmanti, 2000).

Susanti (2011) menyatakan *Bacillus circulans* merupakan *Bacillus alkalopilik*, yaitu bakteri yang mampu tumbuh pada pH tinggi (keadaan basa). *Bacillus circulans* memiliki beberapa keunggulan sebagai sumber sistem selulase yaitu tidak bersifat patogen, mudah ditumbuhkan, media pertumbuhannya murah,

dan menghasilkan sistem selulase dengan aktivitas yang tinggi. Dalam penelitiannya juga dilaporkan bahwa pH optimum untuk memproduksi selulase dari *Bacillus circulans* adalah pada pH 9. Ray dkk (2007) melaporkan bahwa *Bacillus circulans* menghasilkan selulase dengan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan *Bacillus subtilis* disekitaran pH netral, yaitu antara pH 7 – 7,5. *Bacillus circulans* memiliki aktivitas selulase di sekitaran nilai 25U/mL sementara *Bacillus subtilis* di sekitaran nilai 20U/mL.

Konsentrasi substrat optimum aktivitas ekstrak kasar selulase tertinggi pada CMCase oleh *Bacillus circulans* menggunakan variasi substrat (0,1-2,0%) dengan hasil optimum adalah konsentrasi 1 %. Penambahan substrat lebih lanjut hanya sedikit meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim, karena hampir semua enzim telah membentuk kompleks enzim-substrat, sehingga tidak terdapat lagi sisi aktif enzim yang bebas. Enzim selulase memiliki nilai  $V_{maks}$  1000 µg glukosa/jam dan  $K_M$  5 % (Susanti, 2011).



Gambar 2.3 Kurva hubungan konsentrasi substrat terhadap aktivitas selulase

Bacillus circulans merupakan salah satu bakteri yang mudah ditemukan.

Bacillus circulans dapat diisolasi dari tanah, air laut ataupun air rawa. Hal ini ditunjukkan dengan diperolehnya Bacillus circulans di perairan Pantai Meru

Betiri Jawa Timur. *Bacillus circulans* tersebut diisolasi dari daerah hutan, semak, pantai berpasir dan estuarin (Hatmanti, 1998 dalam Hatmanti 2000).

#### **2.3 Enzim**

Enzim merupakan biokatalisator yang mampu meningkatkan kecepatan reaksi spesifik tanpa ikut bereaksi dan tidak menghasilkan produk samping, bersifat jauh lebih efisien dibandingkan katalis lain, disebabkan molekul enzim memiliki spesifikasi yang tinggi terhadap substratnya. Ukuran molekul enzim jauh lebih besar dari ukuran substratnya karena enzim terdiri dari ratusan bahkan lebih dari seribu asam amino. Ikatan enzim dengan substrat biasa terjadi di sekitar active site, selain itu enzim memiliki sisi regulator yang berfungsi sebagai pengatur untuk meningkatan ataupun menurunkan aktivitas kerja enzim. Sisi regulator ini akan mengikat molekul kecil atau substrat secara langsung ataupun tidak langsung yang berfungsi untuk enzim-substrat yang bersifat sementara dan akan kembali membentuk enzim bebas dan produk (Lehninger, 1997).

Menurut Palmer (1995), reaksi antara enzim dengan substrat dapat terjadi menurut dua hipotesis berikut:

## a. Hipotesis Lock and Key

Spesifitas enzim termasuk adanya struktur komplementer antara enzim dengan substrat terjadi apabila substrat mempunyai kesesuaian bentuk ruang dengan enzim pada struktur sisi aktif enzim.

### b. Hipotesis Induce Fit

Substrat tidak mempunyai kesesuaian ruang dengan sisi aktif enzim pada kompleks enzim-substrat, tetapi dalam proses pengikatan substrat, enzim mengalami perubahan konformasi sehingga sesuai dengan substrat. Proses ini disebut proses induksi.

Aktivitas enzim dipengaruhi banyak faktor. Faktor-faktor tersebut menentukan efektifitas kerja enzim. Apabila faktor tersebut berada pada kondisi yang optimum, maka kerja enzim juga akan maksimal. Beberapan faktor yang mempengaruhi kerja enzim, yaitu (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006):

#### a. 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.

#### b. Konsentrasi substrat

Hasil eksperimen menunjukkan bahwa dengan konsentrasi enzim yang tetap, maka pertambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikkan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Keadaan ini telah diterangkan oleh Michaleis-Menten dengan hipotesis mereka tentang terjadinya kompleks enzim-substrat.

Kompleks enzim-substrat dapat diperoleh dengan adanya kontak antara enzim dengan substrat. Kontak ini terjadi pada sisi aktif enzim. Pada konsentrasi substrat rendah, sisi aktif enzim hanya akan menampung substrat sedikit. Bila konsentrasi substrat diperbesar, makin banyak substrat yang akan bergabung dengan enzim pada sisi aktif tersebut. Dengan demikian, konsentrasi kompleks enzim-substrat makin besar. Hal ini menyebabkan makin besarnya kecepatan reaksi. Pada suatu batas konsentrasi substrat tertentu, semua sisi aktif enzim telah

dipenuhi dengan substrat atau telah jenuh dengan substrat, dimana dalam keadaan ini bertambahnya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambah besarnya konsentrasi kompleks enzim-substrat, sehingga jumlah hasil reaksinya pun tidak bertambah besar.

Michaelis dan Menten berkesimpulan bahwa kecepatan reaksi bergantung pada konsentrasi kompleks enzim-substrat [ES], sebab apabila tergantung pada konsentrasi substrat [S], maka penambahan konsentrasi substrat akan menghasilkan pertambahan reaksi yang apabila digambarkan akan menunjukkan garis lurus. Jadi secara umum reaksi dengan enzim ditulis sebagai berikut (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006):

$$E + S \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> dan k<sub>3</sub> masing-masing ialah tetapan kecepatan reaksi pembentukan kompleks ES, tetapan (konstanta) kecepatan reaksi pembentukan kembali E dan S, dan tetapan (konstanta) kecepatan reaksi penguraian kompleks ES menjadi enzim dan hasil reaksi. Kecepatan reaksi pembentukan kompleks ES ialah:

$$V_1 = k_1 [E] [S]$$

$$V_1 = k_1 ([E_0] - [ES]) [S]$$
(1)

 $[E_0]$  = konsentrasi enzim total

 $[E_0]$  – [ES] menyatakan konsentrasi enzim yang masih bebas dan [S] ialah konsentrasi substrat. Kecepatan penguraian kompleks ES menjadi E dan S kembali adalah:

$$V_2 = k_2 [ES] \tag{2}$$

Sedangkan kecepatan penguraian ES menjadi E dan P ialah:

$$V_3 = k_3 [ES] \tag{3}$$

Jadi kecepatan penguraian ES ialah:

$$V_2 + V_3 - k_2 [ES] + k_3 [ES]$$
 (4)

Dalam keadaan keseimbangan maka kecepatan pembentukan ES sama dengan kecepatan penguraian ES. Jadi:

$$0 = k_1 ([E_0] - [ES]) [S] - k_2 [ES] + k_3 [ES] atau$$
 (5)

$$k_1 ([E_0] - [ES]) [S] = (k_2 + k_3) [ES]$$
 (6)

Sehingga: 
$$[ES] = \frac{k_1([E_0] - [ES])[S]}{k_2 + k_3}$$
 (7)

atau 
$$[ES] = \frac{k1[E0][S] - k1[ES][S]}{k2 + k3}$$

[ES] 
$$(k_2 + k_3) = k_1 [E_0] [S] - k_1 [ES] [S]$$

[ES] 
$$(k_2 + k_3) + k_1$$
 [ES] [S] =  $k_1$  [E<sub>0</sub>] [S]

[ES] 
$$((k_2 + k_3) + k_1 [S]) = k_1 [E_0] [S]$$

Sehingga: 
$$[ES] = \frac{k_1[E_0][s]}{(k_2+k_3)+k_1[s]} \times \frac{\frac{1}{k_1}}{\frac{1}{k_1}}$$

Sehingga: 
$$[ES] = \frac{[E0][S]}{\frac{k2+k3}{k1} + [S]}$$

K<sub>m</sub> ialah konstanta Michaelis-Menten

Dari persamaan (7) dapat diperoleh konsentrasi kompleks enzim substrat sebagai berikut:

$$[ES] = \frac{[E0][S]}{Km+[S]} \tag{8}$$

Kecepatan permulaan terjadinya hasil reaksi P sebanding dengan konsentrasi ES atau:

$$V = k_3 [ES]$$
 (9)

Apabila konsentrasi substrat sangat besar sehingga semua enzim membentuk kompleks enzim-substrat, maka kecepatan reaksi ialah maksimal dan dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$V_{\text{maks}} = k_3 [E_0] \tag{10}$$

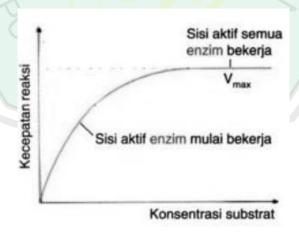
Harga [ES] dalam persamaan (8) dimasukkan ke dalam persamaan (9), maka diperoleh:

$$V = k_3 \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]} \tag{11}$$

Dengan jalan memasukkan persamaan (10) ke dalam persamaan (11) maka diperoleh:

$$V = \frac{V maks [S]}{K m + [S]} \tag{12}$$

Persamaan (12) disebut persamaan Michaelis-Menten. Penentuan harga K<sub>m</sub> dari suatu reaksi dapat dipakai beberapa macam cara. Salah satu cara ialah menggunakan grafik kecepatan reaksi konsentrasi substrat seperti di bawah ini:



Gambar 2.4 Hubungan Antara Konsentrasi Substrtrat dan Kecepatan Reaksi Enzimatis

Dari persamaan (12) dapat diketahui apabila harga  $V = \frac{1}{2} V_{maks}$  maka  $K_m =$  [S]. Hal ini berarti  $K_m$  sama dengan konsentrasi substrat (dalam mol per liter) yang menghasilkan kecepatan reaksi sebesar setengah dari kecepatan maksimum.

Cara lain untuk menentukan harga  $K_M$  maupun  $V_{maks}$  ialah dengan membuat grafik antara 1/V dengan 1/[S].

Persamaan Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V maks [S]}{K m + [S]}$$

$$V = \frac{Vmaks [S]}{Km} + \frac{Vmaks [S]}{[S]}$$

Dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$V = \frac{Km + [S]}{Vmaks [S]} \tag{13}$$

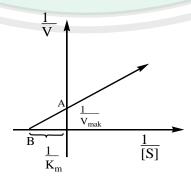
Atau

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{Vmaks} \left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{Vmaks} \tag{14}$$

Dari persamaan di atas ini terlihat bahwa 1/V adalah fungsi dari 1/[S]. oleh karena  $K_m$  dan  $V_{maks}$  adalah konstanta maka apabila 1/V diganti dengan Y dan 1/[S] diganti dengan X, maka persamaan tersebut menjadi:

$$Y = ax + b$$
  $a = \frac{Km}{V_{maks}}$   $b = \frac{1}{V_{maks}}$ 

Dengan demikian terlihat bahwa bila dibuat grafik yang menunjukkan antara 1/V dengan 1/[S], akan terjadi garis lurus.



Gambar 2.7 kurva hubungan 1/[S] dan 1/V aktivitas enzim selulase

Pada titik potong antara grafik dengan sumbu Y, (titik A) harga 1/[S] = 0 maka persamaan (14) menjadi:

$$1/V = \frac{K_m}{V_{maks}} \times 0 + \frac{1}{V_{maks}}$$

$$1/V = \frac{1}{V maks}$$
, karenanya harga  $V = V_{maks}$ 

Pada titik potong antara grafik dengan sumbu X, (titik B) harga 1/V=0, maka persamaan (12) menjadi:

$$0 = \frac{Km}{V_{maks}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}, \text{ atau}$$

$$\frac{1}{[S]} \times \frac{Km}{V_{maks}} = -\frac{1}{V_{maks}}, \text{ oleh karena itu}$$

$$\frac{1}{[S]} = -\frac{1}{V_{maks}} \times \frac{V_{maks}}{Km} = -\frac{1}{Km}$$

$$\frac{1}{[S]} = -\frac{1}{Km}$$

Dengan demikian harga 1/[S] pada titik potong tersebut sama dengan -  $1/K_m$ . Dari harga-harga tersebut dapat diperoleh harga  $V_{maks}$  maupun harga  $K_m$ . kemiringan garis grafik tersebut ditentukan oleh harga  $K_m/V_{maks}$  atau tangens sudut =  $K_m/V_{maks}$ . Metode penentuan  $K_m$  dan  $V_{maks}$  dengan cara ini disebut metode grafik Lineweave-Burk

# c. pH (keasaman)

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat membentuk ion positif, ion negatif atau bermuatan ganda (*zwitter ion*). Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas sisi aktif enzim dalam membentuk enzimsubstrat. pH rendah atau pH tinggi juga dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi yang mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Oleh karena itu enzim memiliki pH optimum yang berbeda-beda.

#### d. Suhu

Reaksi enzimatik juga dipengaruhi oleh suhu. Suhu optimum merupakan suhu yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim. Karena enzim merupakan suhu protein, maka kenaikkan suhu juga dapat menyebabkan proses denaturasi yang menyebabkan sisi aktif enzim terganggu dan mengurangi kecepatan reaksi.

#### e. Waktu kontak

Waktu kontak/reaksi antara enzim dan substrat menentukan efektivitas kerja enzim. Semakin lama waktu reaksi maka kerja enzim juga akan semakin optimum (Azis, 2012)

#### f. Produk akhir

Reaksi enzimatik selalu melibatkan dua hal, yaitu substrat dan produk akhir. Dalam beberapa hal, produk akhir juga dapat menurunkan produktivitas kerja enzim (Azis, 2012).

### 2.4 Enzim Selulase

Enzim selulase merupakan enzim yang memegang peranan penting dalam proses biokonversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa, protein sel tunggal, makanan ternak, etanol dan lain-lain (Chala, 1983). Enzim ini merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ikatan  $\beta(1-4)$  pada selulosa. Enzim selulase termasuk enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang dilepas dari sel ke lingkungan untuk menghidrolisis polimer di lingkungan. Enzim ini yang diproduksi di dalam sel mikroba selulolitik dan kemudian dikeluarkan dari sel masuk ke dalam sistem pencernaan untuk mencerna selulosa (Masfufatun, 2011).

Hidrolisis enzimatik yang sempurna memerlukan aksi sinergi dari tiga tipe enzim ini, yaitu (Ikram dkk., 2005):

- Endo-1,4-β-D-glukanase (endoselulase, carboxymethylcellulase atau CMCase), yang mengurai polimer selulosa secara random pada ikatan internal α-1,4-glikosida untuk menghasilkan oligodekstrin dengan panjang rantai yang bervariasi.
- Exo-1,4-β-D-glukanase (cellobiohydrolase), yang mengurai selulosa dari ujung pereduksi dan non pereduksi untuk menghasilkan selobiosa dan/atau glukosa
- 3. β-glukosidase (*cellobiase*), yang mengurai selobiosa untuk menghasilkan glukosa

Selulase digunakan secara luas dalam industri tekstil, deterjen, pulp dan kertas. Selulase juga digunakan dalam pengolahan kopi (Frazier dkk, 1988) dan kadang-kadang digunakan dalam industri farmasi sebagai zat untuk membantu sistem pencernaan. 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., 2006).

#### 2.5 Hidrolisi Selulosa menjadi Glukosa

Proses hidrolisis dapat dilakukan dengan menggunakan asam atau secara enzimatik. Proses hidrolisis secara enzimatik mirip dengan proses-proses hidrolisis secara asam akan tetapi katalis asam diganti dengan enzim. Teknik ini dikenal dengan teknik hidrolisis dan fermentasi terpisah (*Separated Hydrolysis and Fermentation*), suhu rendah, pH netral, berpotensi memberikan hasil yang

tinggi dan biaya pemeliharaan peralatan yang relatif rendah karena tidak ada bahan korosif (Taherdazeh dan Kartini, 2007). Hidrolisis dengan enzim tidak membuat atau menghasilkan kondisi lingkungan yang kurang mendukung proses biologi/fermentasi seperti pada hidrolisis dengan asam. Kadar gula pereduksi pada ubi jalar yang dihasilkan pada hidrolisis secara enzimatik lebih tinggi yaitu 12,61 % daripada hasil hidrolisis secara asam yaitu 6,20 % (Nasrulloh, 2009)

Hidrolisis selulosa secara biologis dapat dilakukan baik menggunakan enzim selulase maupun mikroorganisme penghasil selulase. Ada tiga enzim yang berperan didalam perombakan selulosa menjadi glukosa, yaitu: (a) Enzim endoglukonase, berfungsi memotong rantai glukosa yang panjang menjadi rantai yang lebih pendek secara acak, (b) Enzim cellobiohydrolase, berfungsi memotong setiap dua rantai glukosa (selobiosa), (c) Enzim β-glukosidase, berfungsi memotong selobiosa menjadi molekul-molekul glukosa (Sukadarti, dkk., 2010).

Proses hidrolisis enzimatik dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: enzim, ukuran partikel, suhu, pH, waktu hidrolisis, perbandingan cairan terhadap substrat dan pengadukan. Hal inilah yang mendasari adanya beberapa penelitian yang memvariasi salah satu atau beberapa faktor tersebut guna menentukan keberhasilan dari hidrolisis (Purba, 2009 dalam Lathifah, 2013).

#### 2.6 Glukosa

Glukosa merupakan jenis monosakarida yakni gula tunggal yang mempunyai rumus kimia  $C_6H_{12}O_6$ . Glukosa disebut juga gula anggur, gula darah (dijumpai dalam darah) atau dekstrosa karena mempunyai sifat memutar bidang polarisasi ke kanan (+). Gula tunggal monosakarida ini tidak dapat dipecah lagi

sehingga tidak mempunyai rumus yang lebih sederhana lagi. Glukosa dalam prakteknya juga disebut gula reduksi (Fessenden dan Fessenden, 1999).

Gambar 2.5 Struktur D-glukosa (Fessenden da Fessenden, 1999)

Menurut Indah (2009), menyebutkan bahwa pada suhu dibawah 60 °C kelarutan glukosa sama dengan sukrosa. Pada suhu di bawah 60 °C kelarutan glukosa lebih rendah dari pada sukrosa, sebaliknya di atas suhu 60 °C kelarutan glukosa lebih tinggi. Suhu transisi glukosa adalah 50 °C, pada suhu di bawah ini monohidrat glukosa membentuk fase padat.

Glukosa dalam industri dimanfaatkan sebagai bahan tambahan pembuatan makanan, minuman, pasta gigi dan bahan baku pembuatan bahan kimia lainnya maupun obat-obatan. Kebutuhan akan glukosa di Indonesia yang semakin meningkat, akan tetapi impor glukosa justru lebih besar dibandingkan jumlah ekspornya.

Tabel 2.1 Kebutuhan glukosa

Tahun	Produksi (Kg)	Impor (Kg)	Ekspor (Kg)
2005	26.417.850	3.345.471	35.817
2006	14.856.686	16.560.707	74.604
2007	42.393.860	15.431.943	1.249.806
2008	68.313.805	21.572.474	3.504.883
2009	56.480.000	21.743.106	7.994.173
2010	47.463.468	22.160.836	

(Badan Pusat Statistik Indonesia 2005 – 2010)

## 2.7 Metode Dinitrosalicylic Acid (DNS)

Metode kuantitatif yang dapat digunakan dalam uji aktivitas selulase adalah dengan mengamati kadar gula tereduksi yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim terhadap substrat. Dari berbagai cara uji aktivitas selulase yang paling sering digunakan dalam penelitian adalah dengan menggunakan metode dinitrosalicylic acid (DNS) atau Somogy-Nelson (Zulaikhah, 2013).

Metode DNS digunakan untuk mengukur gula pereduksi dengan teknik kalorimetri. Teknik ini hanya dapat mendeteksi satu gula pereduksi, misalnya glukosa. Glukosa memiliki gugus aldehid, sehingga dapat dioksidasi oleh asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi gugus karboksil dan menghasilkan asam 3-amino-5-salisilat pada kondisi basa dengan suhu 90 – 100 °C. Senyawa ini dapat dideteksi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Bintang, 2010).

Gambar 2.6 Reaksi glukosa dengan pereaksi DNS (Kismiati dan Agustini, 2010 dalam Novitasari, 2014)

Kepekaan yang tinggi dari suatu metode dicapai apabila metode tersebut akan menghasilkan hubungan linier antara gula pereduksi yang dihasilkan dengan waktu inkubasi. Glukosa mudah didekstruksi oleh oksidasi pereaksi basa yang digunakan pada pereaksi DNS. Metode *Somogy-Nelson* memiliki kekurangan pada perlakuan analisis yang lama dan lebih rumit (tidak nyaman) serta tingkat

bahaya racunnya lebih tinggi bila dibandingkan dengan metode DNS (Muawanah, 2006).

## 2.8 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmitan atau absorbansi suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Panjang gelombang cahaya UV atau *visible* bergantung pada mudahnya promosi elektron. Molekul-molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi elektron akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek. Molekul yang memerlukan energi lebih sedikit akan menyerap cahaya dalam daerah tampak (senyawa berwarna) yang mempunyai elektron yang lebih mudah dipromosikan daripada senyawa yang menyerap pada panjang gelombang UV (Khopkar, 2003).

Spektrofotometer UV-Vis dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Pada aspek kuantitatif, suatu berkas radiasi dikenakan pada larutan sampel dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan akan diukur besarnya. Radiasi yang diserap oleh larutan sampel ditentukan dengan membandingkan intensitas cahaya yang diteruskan dengan intensitas atau kekuatan radiasi cahaya yang diserap. Intensitas ini akan sebanding dengan jumlah foton yang melalui luas penampang tertentu (Rohman dkk,, 2010).

Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan table kuvet dan konsentrasi larutan. Kuantitas spektroskopi biasanya mengukur transmitans ( $T = I/I_0$ ) dan absorbansi (A = log 1/T). Adapun persamaan hukum Lambert-Beer adalah sebagai berikut (Rohman dkk,. 2010):

$$A = log 1/T = log I/I_0 = a.b.c = -log T$$
 .....(2.1)

## Keterangan:

A = Absorbansi

a = Absorpsivitas

b = Tebal kuvet

c = Konsentrasi larutan (mol/L)

T = Transmitan

Rumus ini dapat dijelaskan bahwa cahaya atau radiasi dengan intensitas  $I_0$  yang melewati bahan setebal b berisi sejumlah n partikel (ion, atom atau molekul) akan mengakibatkan intensitas berkurang menjadi I. berkurangnya intensitas radiasi tergantung dari luas penampang (S) yang menyerap partikel, dimana luas penampang sebanding dengan jumlah partikel (n) (Hayati, 2007).

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Panjang gelombang maksimal diperoleh dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dan panjang gelombang dari suatu larutan bak dengan konsentrasi tertentu. Terkadang dijumpai keadaan yang mana pemakaian panjang gelombang maksimal kurang baik. Hal ini dikarenakan misalnya, selain zat yang dianalisis, juga terdapat zat lain yang mempunyai absorbansi pada panjang gelombang tersebut. Ada beberapa variable yang dapat mempengaruhi absorbansi yaitu: jenis pelarut, pH larutan, suhu, konsentrasi tinggi dan zat penggangu (Rohman dkk,, 2012).

## 2.9 Kajian Penelitian dalam Prespektif Islam

Al-Qur'an merupakan kitab yang memberikan petunjuk kepada umat manusia. Dalam hubungannya dengan ilmu pengetahuan, al-Qur'an mendorong umat manusia untuk menggunakan akal pikirannya dalam melakukan observasi alam semesta sehingga diperoleh penemuan baru yang selaras dengan al-Qur'an (Shihab, 1999). Al-Qur'an terkadang memberikan penjelasan melalui

perumpamaan-perumpamaan untuk memudahkan manusia dalam mempelajari ciptaan-Nya. Perumpamaan dalam al-Qur'an dapat berupa tumbuhan dan hewan baik yang berukuran besar ataupun yang sangat kecil. Seperti dalam firman Allah SWT surat al-Baqarah [2]: 26:

Artinya: "Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, Maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?" dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik" (Q.S. al-Baqarah [2]: 26).

Menurut asy-Syaukani (2008), lafadz فَا فَوْقَها dimaksudkan sebagai hewan yang memiliki ukuran lebih kecil daripada nyamuk, sehingga dapat diartikan bahwa hewan dengan ukuran lebih kecil dari nyamuk tersebut salah satunya adalah mikroorganisme. Keberadaan mikroorganisme tidak dapat dilihat secara langsung, namun keberadaan mikroorganisme penting dalam keberlangsungan siklus hidup. Salah satu mikroorganisme yang bermanfaat adalah bakteri yang mampu menghasilkan enzim untuk memecah atau menguraikan senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana.

Suatu enzim bekerja secara khas terhadap suatu substrat tertentu. Kerja suatu enzim sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti substrat. pH, suhu dll. Hal ini telah dijelaskan dalam al-Qur'an surat Faathir [35]: 20 – 21:

## وَلَا ٱلظُّلُمَاتُ وَلَا ٱلنُّنورُ ﴿ وَلَا ٱلظِّلُّ وَلَا ٱلظِّلُّ وَلَا ٱلْخُرُورُ ﴿

Artinya: "Dan tidak (pula) sama gelap gulita dengan cahaya. Dan tidak (pula) sama yang teduh dengan yang panas" (Q.S. Faathir [35]: 20 - 21).

Menurut al-Qurthubi (2009), lafadz ولاالظلمت ولاالنور diartikan "tidak sama antara gelap gulita dengan cahaya, serta tidak sama pula antara keteduhan dengan kepanasan". Kata الحرور tidak akan terjadi kecuali jika adanya sinar matahari di siang hari. Sedangkan السموم (angin panas) terjadi pada waktu malam. Keteduhan dan kepanasan dapat diartikan suhu sebagai faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan suatu makhluk. Ayat ini dapat menggambarkan bahwa enzim dapat melakukan kerja optimalnya pada keadaan tertentu. Enzim memerlukan kondisi-kondisi tertentu seperti suhu, pH dan konsentrasi substrat yang sesuai untuk memperoleh kerja optimum dari suatu enzim.

#### **BAB III**

#### **METODOLOGI**

## 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan September 2014, di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian adalah autoklaf, seperangkat alat gelas, rak tabung reaksi, bluetip, kuvet, alumunium foil, plastik wrap, hotplat, neraca analitik, kapas, karet, bola hisap, jarum ose, *shaker incubator*, inkubator, laminar, *magnetic stirrer*, *centrifuge*, vortek dan spektrofotometer.

## **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah bakteri *Bacillus circulans* (koleksi Laboratorium Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang), aquades, media *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) agar, media *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) cair, nutrien agar (NA), alkohol 70 %, *Congo red* 1 %, reagen *Dinitrosalicylic Acid* (DNS), NaOH, NaCl, buffer fosfat, dan glukosa anhidrat.

#### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik. Sampel yang digunakan berupa ekstrak kasar enzim selulase yang diproduksi oleh *Bacillus circulans* melalui media *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) cair. Sampel akan dianalisis untuk menentukan kondisi optimum enzim tersebut pada substrat selulosa jenis

Carboxy Methyl Cellulose (CMC). Tahap pertama dilakukan peremajaan isolat menggunakan media nutrien agar. Kemudian dilakukan uji konfirmasi pada bakteri untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim selulase. Setelah itu dilanjutkan dengan produksi enzim dalam media CMC cair.

Racangan penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) tunggal meliputi kondisi pH (5, 6, 7, 8, dan 9); kondisi suhu (30 °C; 37 °C; 40 °C dan 50 °C) dilakukan pada kondisi pH optimum hasil perlakuan sebelumnya; dan konsentrasi substrat (1,0 %; 1,5 %; 2,0 %; 2,5 %; dan 3,0 %) dilakukan pada kondisi pH dan suhu optimum hasil perlakuan sebelumnya. Penelitian ini dilakukan dengan 3 kali pengulangan.

## 1. Kondisi pH

pН	Aktivit <mark>a</mark> s Enzim
5	
6	
7	7
8	
9	

Analisis aktivitas enzim dianalisis menggunakan metode DNS. Kondisi pH optimum ditunjukkan dengan aktivitas enzim tertinggi dan digunakan untuk perlakuan berikutnya.

## 2. Kondisi Suhu

Suhu (°C)	Aktivitas Enzim
30	• • •
37	
40	
50	

Perlakuan ini dilakukan pada pH optimum hasil perlakuan sebelumnya. Kondisi suhu optimum ditunjukkan dengan aktivitas enzim tertinggi dan digunakan untuk perlakuan berikutnya.

#### 3. Konsentrasi Substrat

Konsentrasi substrat (1 %)	Aktivitas Enzim
1,0 %	
1,5 %	
2,0 %	
2,5 %	
3,0 %	

Perlakuan ini dilakukan pada pH dan suhu optimum hasil perlakuan sebelumnya. Konsentrasi substrat optimum ditunjukkan dengan aktivitas enzim tertinggi dan hasil analisis digunakan untuk penentuan nilai  $V_{maks}$  dan  $K_M$ .

## 3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilak<mark>ukan dengan tahapan-tahap</mark>an sebagai berikut:

- 1. Pembuatan Media
- 2. Peremajaan Isolat
- 3. Uji Konfirmasi *Bacillus circulans* terhadap Produksi Enzim Selulase secara Kualitatif
- 4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri dan Aktivitas Selulase
- 5. Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase
- 6. Karakterisasi Enzim Selulase
- Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode Dinitrosalicylic
   Acid (DNS)
- 8. Analisa data

#### 3.5 Cara Kerja

## 3.5.1 Pembuatan Media

## 3.5.1.1 Pembuatan Media CMC Agar (Indahsari, 2012)

Media yang digunakan dalam media CMC agar terdiri dari 1 g CMC; 0,04 g MgSO<sub>4</sub>; 0,15 g KNO<sub>3</sub>; 0,1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,004 g CaCl<sub>2</sub>; 0,4 g *yeast extract* dan 3,4

g agar. Semua bahan dicampur dengan aquades sebanyak 100 mL. Media dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, media tersebut dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditutup kapas. Media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

## 3.5.1.2 Pembuatan Media CMC Cair 1% (b/v) (Saropah, 2013)

Media yang digunakan dalam media CMC *broth* terdiri dari 1 g CMC; 0,04 g MgSO<sub>4</sub>; 0,15 g KNO<sub>3</sub>; 0,1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,004 g CaCl<sub>2</sub> dan 0,4 g yeast exstract. Semua bahan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan aquades sebanyak 100 mL. Media dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Erlenmeyer ditutup kapas dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

## 3.5.1.3 Pembuatan Media Nutrien Agar (Lathifah, 2013)

Media nutrien agar ditimbang 2,3 g dan dilarutkan dalam 100 mL aquades. Media dipanaskan hingga mendidih dan dimasukkan 5 mL ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup kapas dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Tabung diletakkan miring hingga dingin dan terbentuk agar.

## 3.5.2 Peremajaan Bacillus circulans (Saropah, 2013)

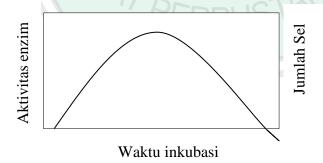
Peremajaan *Bacillus circulans* dilakukan di dalam laminar dengan mengambil 1 ose bakteri *Bacillus circulans* dan digoreskan pada media NA miring (prosedur 3.5.2.3). Isolat *Bacillus circulans* diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

# 3.5.3 Uji Konfirmasi *Bacillus circulans* terhadap Produksi Enzim Selulase secara Kualitatif (Indahsari, 2012)

Bacillus circulans dari media NA ditotolkan pada cawan petri yang berisi media CMC agar. Selanjutnya kultur diinkubasi selama 48 jam. Visualisasi zona bening dilakukan dengan congo red (1 mg/mL) selama 30 menit dan dicuci dengan NaCl 0,1 %.

# 3.5.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri dan Aktivitas Selulase (Saropah, 2013)

Sebanyak 2 ose *Bacillus circulans* hasil peremajaan diinokulasikan ke dalam 200 mL media CMC cair. Inokulum diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang selama 24 jam. Inokulum diambil 20 mL dan dipindahkan dalam 200 mL media CMC baru. Inokulum diambil 4 mL tiap 4 jam sekali dan diukur jumlah sel dan aktivitas selulasenya. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan membuat plot antara waktu, absorbansi dan aktivitas enzim. Aktivitas selulase ditentukan dengan mengukur kadar glukosa dengan metode DNS.



## 3.5.5 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase (Saropah, 2013)

Sebanyak 2 ose *Bacillus circulans* diinokulasikan dalam 200 mL media CMC cair dan diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang selama 24 jam. Inokulum diambil sebanyak 10 mL dan dipindahkan

dalam 100 mL media CMC. Inokulum diinkubasi hingga fase yang menghasilkan enzim selulase tinggi yang ditentukan dari kurva pertumbuhan sambil digoyang dalam *shaker* inkubator pada suhu ruang. Inokulum disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 5000 rpm dan suhu 4 °C. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim selulase.

## 3.5.6 Karakterisasi Enzim Selulase (Saropah, 2013) 3.5.6.1 Penentuan pH Optimum Enzim Selulase

Sebanyak 1 mL substrat CMC 1 % yang sudah dilarutkan dalam larutan buffer dengan variasi pH 5, 6, 7, 8 dan 9 dimasukkan dalam 5 tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditambahkan 1 mL ekstrak kasar selulase pada masing-masing tabung reaksi. Masing-masing tabung diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah itu dipanaskan di dalam air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan pada suhu ruang. Aktivitas enzim dianalisis menggunakan metode DNS.

Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 µmol glukosa per menit pada kondisi tertentu (Dybkaer, 2001: Saropah, 2013). Aktivitas selulase ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi yang diperoleh dari konsentrasi glukosa standart, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus (Kombong, 2004: Saropah, 2013):

$$AE = \frac{c}{BM \ produk \ x \ t} \times \frac{H}{E}$$

Keterangan:

AE = Aktivitas enzim (Unit/mL)

C = Konsentrasi glukosa

BM = Berat molekul glukosa = 180 g/mol

t = Waktu inkubasi (menit)

H = Volume total enzim-substrat (mL)

E = Volume enzim (mL)

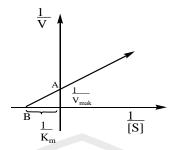
## 3.5.6.2 Penentuan Suhu Optimum Enzim Selulase

Penentuan suhu enzim optimum dilakukan dengan cara menguji aktivtas enzim selulase pada suhu 30 °C; 37 °C; 40 °C dan 50 °C dengan substrat CMC 1 % dalam larutan buffer pH optimum dan diinkubasi selama 60 menit. Sebanyak 1 mL substrat CMC 1 % yang sudah dilarutkan dalam buffer sesuai pH optimum dimasukkan dalam 4 tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditambahan 1 mL ekstrak kasar selulase pada masing-masing tabung reaksi. masing-masing tabung diinkubasi selama 60 menit pada suhu 30 °C; 37 °C; 40 °C dan 50 °C. setelah itu dipanaskan di dalam air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan pada suhu ruang. Aktivitas enzim dianalisis dengan metode DNS.

## 3.5.6.3 Penentuan V<sub>max</sub> dan K<sub>M</sub> Enzim Selulase

Penentuan V<sub>max</sub> dan K<sub>M</sub> ditentukan dengan cara menguji aktivitas selulase pada konsentrasi substrat dengan variasi konsentrasi 1,0 %; 1,5 %; 2,0 %; 2,5 % dan 3,0 % (b/v) dan dilakukan pada pH optimum, suhu optimum selama 0 menit. Sebanyak 1 mL substrat CMC 1,0 %; 1,5 %; 2,0 %; 2,5 % dan 3,0 % (b/v) yang sudah dilarutkan dalam buffer pH optimum dimasukkan dalam 5 tabung reaksi yang berbeda. Kemudian larutan ditambahkan 1 mL ekstrak kasar selulase pada masing-masing tabung reaksi. Masing-masing sampel diinkubasi pada suhu optimum selama 60 menit. Setelah itu dipanaskan di dalam air mendidih selama 15 menit. Kemudian sampel didinginkan pada suhu ruang. Aktivitas enzim dianalisis dengan metode DNS. Selanjutnya penentuan nilai V<sub>maks</sub> dan K<sub>M</sub> menggunakan persamaan regresi berikut:

$$Y = aX + b$$
  $a = \frac{Km}{V_{maks}}$   $b = \frac{1}{V_{maks}}$ 



# 3.5.7 Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase Metode *Dinitrosalicylic Acid* (DNS) (Miller, 1959 dalam Zulaikhah, 2013)

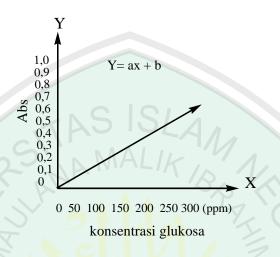
## 3.5.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan glukosa 100 ppm dibuat. Larutan diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian reagen DNS 1 mL ditambahkan dan dihomogenkan. Setelah itu tabung reaksi ditutup dengan alumunium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit sampai larutan berwarna merah kecoklatan. Kemudian larutan KNa-Tartrat 40 % ditambahkan sebanyak 1 mL. kemudian tabung didinginkan dalam air es selama 5 menit dan ditambahkan aquades hingga volume menjadi 10 mL. Selanjutnya larutan dihomogenkan dan diukur pada panjang gelombang 400 – 800 nm dengan interval 10 pada spektrofotometer.

#### 3.5.7.2 Pembuatan Kurva Standart Glukosa

Sebanyak 6 tabung reaksi disiapkan, masing-masing tabung diisi dengan larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250 ppm. Setelah itu, larutan diambil 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 1 mL reagen DNS ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan. Mulut tabung ditutup dengan alumunium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. larutan KNa-Tartrat 40 % ditambahkan sebanyak 1 mL. Tabung reaksi didinginkan dalam

air es selama 5 menit. Aquades ditambahkan hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yang telah dihasilkan.



## 3.5.7.3 Analisis Kadar Gula pada Sampel

Larutan sampel sebanyak 1 mL diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Reagen DNS ditambahkan sebanyak 1 mL. Larutan tersebut ditempatkan dalam air mendidih selama 5 menit. Kemudian KNa-Tartrat 40 % ditambahkan sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam air es selama 5 menit. Selanjutnya larutan sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh.

## 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varians (One Way ANOVA) untuk menguji adanya perbedaan kadar glukosa hasil hidrolisis. Apabila terjadi perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji Tukey taraf 5 % untuk mengetahui perbedaan yang nyata.

#### **BAB IV**

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Prosedur Analisis Enzim Selulase Kasar

#### 4.1.1 Pembuatan Media

Pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroorganisme diperlukan suatu media. Media harus mengandung semua zat yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhannya, antara lain senyawa organik (protein, karbohidrat, lemak), mineral dan vitamin. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi yang ada di dalam media berupa senyawa kecil yang diformulasikan untuk menyusun komponen sel (Maunatin, 2013). Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah Nutrien Agar (NA), *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) Agar dan CMC cair.

Media NA digunakan dalam proses peremajaan *Bacillus circulans*. *Nutrient Agar* termasuk media umum berupa media padat yang dapat ditumbuhi oleh mikroorganisme secara umum (Maunatin, 2013). Pada tahap analisis digunakan media CMC, yaitu media CMC agar untuk analisis kualitatif dan media CMC cair untuk analisis kuantitatif. Kandungan dalam media CMC agar adalah bubuk CMC, MgSO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, *yeast extract* dan agar, sedangkan pada media CMC cair mengandung komposisi yang sama seperti Media CMC agar tetapi tanpa menggunakan agar. Pemilihan media CMC pada penelitian kali ini dikarenakan enzim yang akan diambil berupa enzim selulase, dimana enzim selulase bekerja dalam menghidrolisis selulosa. CMC merupakan turunan dari selulosa yang mudah larut dalam medium dan mudah terhidrolisis (Ambriyanto, 2010).

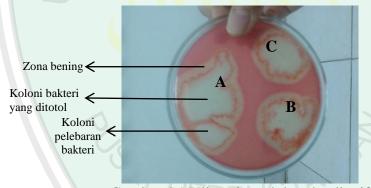
## 4.1,2 Peremajaan Bacillus circulans

Peremajaan *Bacillus circulans* dilakukan pada media NA (*Nutrient Agar*) miring sebagai media pertumbuhannya. Median NA mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri, dimana semua unsur ini dalam bentuk persenyawaan (Irianto, 2007). Peremajaan *Bacillus circulans* bertujuan untuk meregenerasi sel *Bacillus circulans*, menjaga ketersediaan nutrisi dan untuk menghindari adanya perubahan karakteristik dari *Bacillus circulans* yang ditanam. Peremajaan dilakukan secara aseptis untuk menghindari adanya kontaminasi yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Cara aseptis dilakukan dengan memijarkan jarum ose di atas api segera sebelum dan sesudah melakukan pemindahan bakteri serta melewatkan mulut tabung di atas api segera sebelum dan sesudah memasukkan jarum ose dan mengambilnya dan segera mungkin menutup mulut tabung (Sutedjo, 1996)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik dari enzim selulase yang telah diproduksi oleh bakteri *Bacillus circulans*. Karakteristik yang akan diuji merupakan kondisi optimum dari kerja enzim selulase yaitu meliputi kondisi pH, suhu dan konsentrasi substrat. Penelitian ini meliputi beberapa tahapan yaitu uji konfirmasi *Bacillus circulans* terhadap enzim selulase secara kualitatif menggunakan *Congo red*, pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dan aktivitas selulase, produksi ekstrak kasar enzim selulase dan karakterisasi enzim selulase dengan analisis enzim metode DNS.

## 4.2 Uji Konfirmasi *Bacillus circulans* terhadap Enzim Selulase secara Kualitatif

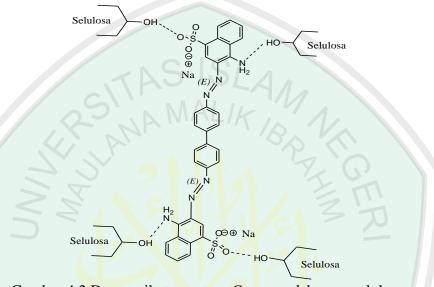
Uji konfirmasi *Bacillus circulan* secara kualitatif adalah proses yang bertujuan mengetahui kemampuan bakteri *Bacillus circulans* dalam menghasilakan enzim selulase. Uji kualitatif dilakukan menggunakan media padat berupa CMC agar. Media CMC agar dituangkan ke dalam cawan petri yang telah steril. Bakteri ditotolkan pada bagian tengah media CMC agar. Bakteri dalam media CMC didiamkan beberapa hari untuk proses pertumbuhan. Uji kualitatif dilakukan pada biakan bakteri yang telah terbentuk dalam media CMC agar menggunakan larutan *Congo red* dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya dicuci dengan larutan NaCl 0,1 %.



Gambar 4.1 Uji enzim selulase kualitatif

Berdasarkan Gambar 4.1 hasil uji kualitatif memperlihatkan adanya zona bening di sekitaran biakan bakteri yang menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus circulans* mampu menghasilkan enzim selulase. Hasil uji kualitatif menghasilkan indeks selulolitik sebesar 1,43. Menurut Ratnakomala (2010), zona bening menunjukkan bahwa bakteri mampu memanfaatkan selulosa yang terkandung dalam medium untuk pertumbuhannya. Zona bening mengidentifikasikan bahwa selulosa telah terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu disakarida ataupun monosakarida. Menurut Sudarmaji dkk (1997), *Congo red* merupakan

indikator pada rentang pH 3 – 5,2. Penambahan NaCl (pH 7) akan mengubah warna *Congo red* yang tidak terikat oleh selulosa, sehingga semakin memperjelas visualisasi zona bening yang terbentuk. Adapun dugaan interaksi antara *Congo red* dengan selulosa adalah sebagai berikut:



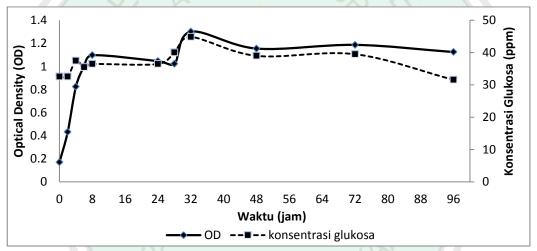
Gambar 4.2 Dugaan ikata<mark>n ant</mark>ara *Congo red* dengan selulosa (Indahsari, 2012)

## 4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri dan Aktivitas Selulase

Kurva pertumbuhan diperoleh dengan membuat plot antara waktu inkubasi, densitas optik dan aktivitas selulase. Mula-mula dibuat inokulum dengan mengambil bakteri hasil peremajaan sebanyak 2 ose dan diinokulasikan ke dalam 200 mL media CMC cair 1 %. Inokulum diinkubasi pada shaker inkubator selama 24 jam. Inokulum diambil sebanyak 20 mL dan diinokulasikan ke dalam 200 mL media baru CMC cair 1 % sebagai media produksi. Setiap 4 jam sekali inokulum diambil 4 mL untuk diukur densitas optiknya serta produktivitas gula reduksi yang dihasilkan. Densitas optik digunakan untuk menyatakan massa atau jumlah sel yang sebelumnya dibuat kurva standart, sehingga cara ini digunakan untuk memperkirakan jumlah atau massa sel secara tidak langsung (Sumarsih,

2003). Densitas optik diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sedangkan produktivitas gula reduksi ditentukan melalui metode DNS.

Berdasarkan kurva pertumbuhan yang telah diperoleh hasil tertinggi terjadi pada jam 32. Pada jam 32 nilai densitas optik dan produktivitas gula reduksi dari bakteri *Bacillus circulans* 1,301 dan 44,8243 ppm. Tingkat konsentrasi gula reduksi tertinggi menunjukkan bahwa pada kondisi tersebut bakteri memproduksi banyak enzim. Hasil tertinggi dari kurva pertumbuhan digunakan sebagai waktu panen enzim saat proses produksi enzim selulase.



Gambar 4.3 Kurva pertumbuhan Bacillus circulans

Pertumbuhan bakteri *Bacillus circulans* (Gambar 4.3) ditandai dengan meningkatnya nilai densitas optik (kekeruhan) dan nilai produktivitas gula reduksi tertinggi sejalan dengan meningkatnya lama waktu inkubasi. Bertambahnya jumlah sel akan meningkatkan produktifitas enzim selulase. Tahapan fase yang terjadi pada pertumbuhan bakteri *Bacillus circulans* dalam medium CMC meliputi fase eksponensial yang terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-32 yang ditandai dengan bertambahnya jumlah sel dalam populasi. Fase stasioner terjadi pada jam ke-32 sampai jam ke-72. Pada fase ini mikroogranisme tidak lagi melakukan pembelahan sel. Pada kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus circulans* tidak terdapat

fase adaptasi karena inokulum bakteri *Bacillus circulans* diproduksi selama 24 jam yang merupakan fase adaptasi.

#### 4.4 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

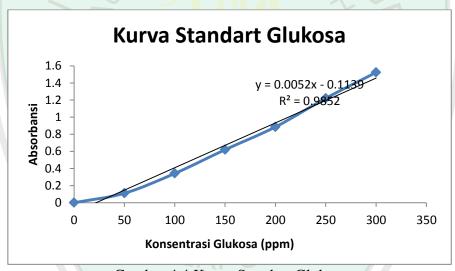
Produksi ekstrak kasar enzim dilakukan untuk memperoleh enzim yang terdapat dalam *Bacillus circulans*. Enzim selulase kasar pada *Bacillus circulan* termasuk enzim ekstraseluler, sehingga dapat diekstrak dengan cara sentrifugasi. Fungsi utama enzim ekstraseluler adalah mengubah nutrien di sekitar sel dan membawanya masuk ke dalam sel sebagai energi untuk pertumbuhan sel (Aulanni'am, 2005). Enzim selulase kasar diperoleh dengan mensentrifugasi kultur *Bacillus circulans* dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C untuk memisahkan sel-sel mikroorganisme yang mengendap dan supernatant yang merupakan cairan yang berisi enzim. Sentrifugasi dilakukan dalam keadaan dingin untuk menjaga agar enzim tidak terdenaturasi.

# 4.5 Kurva Standart Glukos<mark>a men</mark>ggunakan Metode DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat)

Analisis ekstrak kasar enzim selulase secara kuantitatif dilakukan menggunakan metode DNS. Analisis metode DNS merupakan analisis untuk menentukan kadar gula reduksi yang dihasilkan dari aktivitas enzim. Kadar gula reduksi ditentukan dengan membuat kurva standart glukosa yang berfungsi untuk mengetahui konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya. Kurva standart menggunakan larutan glukosa dipilih karena glukosa termasuk gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa oleh enzim selulase. Kurva standart dibuat dengan ditentukan terlebih dahulu panjang gelombang maksimumnya. Panjang

gelombang maksimum bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang memberikan serapan tertinggi pada sampel saat dilakukan pengukuran absorbansi.

Pada penelitian ini penentuan aktivitas enzim dilakukan pada panjang gelombang 530 nm. Kurva standart glukosa dibuat dengan variasi konsentrasi glukosa 50; 100; 150; 200; 250 dan 300 (ppm). Hasil kurva standart glukosa memiliki persamaan linier y = 0,0052x – 0,1139 dengan nilai kolerasi (R²) sebesar 0,9852. Nilai absorbansi sampel dapat disubtitusikan ke dalam persamaan linier dan diplotkan terhadap kurva standart glukosa, sehingga konsentrasi glukosa pada sampel dapat diketahui.



Gambar 4.4 Kurva Standart Glukosa

Reaksi DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehid gula dan teroksidasi menjadi karboksil dan DNS sebagai oksidator yang akan tereduksi membentuk 3-amino dan asam 5-nitrosalisilat. Reaksi ini berlangsung pada suasana basa dan pada suhu tinggi atau pada air mendidih. Adanya gula reduksi pada sampel akan bereaksi dengan larutan DNS yang awalnya berwarna kuning menjadi warna jingga kemerahan. Besar kecilnya aktivitas enzim akan

mempengaruhi kadar gula pereduksi yang dihasilkan (Kusmiati dan Agustini, 2010 dalam Novitasari, 2014).

Pereaksi DNS dapat bekerja dengan adanya komponen pendukung. Komponen yang membantu kerja DNS adalah KNa-Tartrat (garam Rochelle), fenol, sodium bisulfit (N<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) dan natrium hidroksida (NaOH). Menurut Miller (1959) pereaksi DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat) berfungsi mereduksi glukosa dalam keadaan basa yang dibantu oleh NaOH, KNa-Tartrat (garam Rochelle) berfungsi menghilangkan pengaruh senyawa yang mengganggu sehingga kompleks warna tetap stabil, fenol untuk stabilisasi warna yang terbentuk dan sodium bisulfit berfungsi menghilangkan pengaruh oksigen terlarut yang dapat mengoksidasi glukosa produk. Reaksi antara DNS dengan glukosa adalah sebagai berikut:

Gambar 4.5 reaksi DNS dengan glukosa (Kusmiati dan Agustini, 2010 dalam Novitasari, 2014)

#### 4.6 Karakterisasi Enzim Selulase

Setiap enzim selulase dari berbagai macam bakteri memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Hal ini dikarenakan enzim selulase dalam melakukan kerja katalitiknya dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu diantaranya pH, suhu dan konsentrasi substrat (Lehninger, 1997). Di industri pengungkapan sifat dan

karakteristik suatu produk enzim sangat diperlukan untuk efisiensi proses produksi. Selain itu, karakteristik enzim juga difungsikan untuk memperoleh produk akhir yang berkualitas (Masfufatun, 2011). Oleh karenanya, untuk mengetahui karakteristik enzim selulase oleh *Bacillus circulans* dilakukan pengukuran kondisi optimum di berbagai kondisi yang berbeda yaitu pH, suhu dan konsentrasi substrat.

## 4.6.1 Penentuan pH Optimum Ekstrak Kasar Enzim Selulase

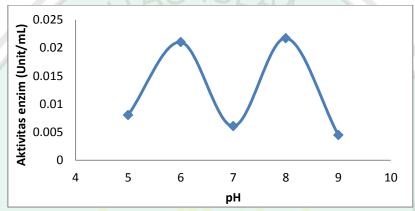
Enzim membutuhkan pH tertentu untuk menjalankan aktivitasnya. Perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas sisi aktif enzim dalam membentuk enzim-substrat. Nilai pH rendah atau pH tinggi juga dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi yang mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Oleh karena itu enzim memiliki pH optimum yang berbeda-beda (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim selulase ditentukan dengan cara mengambil 1 mL substrat CMC 1 % yang sudah dilarutkan dalam larutan *buffer phospat* dengan variasi pH 5, 6, 7, 8 dan 9 dimasukkan dalam 5 tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditambahkan 1 mL ekstrak kasar selulase pada masingmasing tabung reaksi. Masing-masing tabung diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah itu dipanaskan di dalam air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan pada suhu ruang. Aktivitas enzim dianalisis menggunakan metode DNS.

pН	Aktivitas Enzim (Unit/mL)
5	$8.05 \times 10^{-3}$ a
6	$2.10 \times 10^{-2}$ c
7	$6.06 \times 10^{-3}$ ab
8	$2.17 \times 10^{-2}$ c
9	$4.47 \times 10^{-3}$ a

Table 4.1 Hasil analisis pengaruh pH terhadap enzim selulase dalam substrat CMC

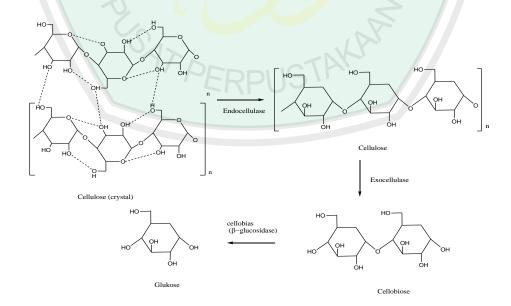
<sup>\*</sup> notasi huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan



Gambar 4.6 Kurva pengaruh pH terhadap enzim selulase dalam substrat CMC

Berdasarkan data yang telah dihasilkan pH optimum dari ekstrak kasar enzim selulase adalah pada pH 8 dengan aktivitas enzim sebesar 2,17 x 10<sup>-2</sup> Unit/mL. Penelitian Susanti (2011) menyatakan *Bacillus circulans* merupakan *Bacillus alkalopilik*, yaitu bakteri yang mampu tumbuh pada pH tinggi (keadaan basa). Pada penelitiannya dilaporkan bahwa pH optimum untuk memproduksi selulase dari *Bacillus circulans* adalah pada pH 9. Ray dkk (2007) melaporkan bahwa *Bacillus circulans* menghasilkan selulase dengan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan *Bacillus subtilis* di sekitaran pH netral, yaitu antara pH 7 – 7,5. *Bacillus circulans* memiliki aktivitas selulase di sekitaran nilai 25U/mL sementara *Bacillus subtilis* di sekitaran nilai 20U/mL.

Hasil penelitian menunjukkan pada pH 6 terjadi peningkatan aktivitas enzim kemudian pada pH 7 terjadi penurunan aktivitas dan kembali meningkat pada pH 8. Hal yang sama juga terjadi pada *Bacillus sp* 31 yang mengalami peningkatan aktivitas enzim pada pH 5 kemudian mengalami penurunan aktivitas hingga pH 8 dan kembali meningkat pada pH 9. Hasil ini menggolongkan *Bacillus sp* 31 sebagai alkalin enzim karena aktivitas optimum tersebut pada pH basa (Utarti dkk, 2009). Adanya aktivitas dari enzim *endo-1,4-β-glucanase* dapat menyebabkan terjadinya perubahan pH dalam lingkungan media (Pometto III dan Crawford, 1986 dalam Hidayat, 2005). Selama proses inkubasi *Bacillus* sp. AR 009, pH media cenderung berubah menjadi basa. Hal ini kemungkinan disebabkan akumulasi produk yang berupa gula reduksi sederhana yang dihasilkan dari hidrolisis selulase secara acak pada ikatan *1,4-D-glycosidic* (Hidayat, 2005). Adapun reaksi enzimatik antara enzim selulase dan selulosa adalah sebagai berikut:



Gambar 4.7 Reaksi enzim selulase terhadap selulosa (Kim, 1995)

Enzim selulase merupakan multienzim yang terdiri dari endo  $\beta$ -1,4-glukanase, ekso  $\beta$ -1,4-glukanase dan  $\beta$ -glukosidase. Enzim endo  $\beta$ -1,4-glukanase menghidrolisis polimer secara acak dan menghasilkan molekul selulosa sederhana. Enzim ekso  $\beta$ -1,4-glukanase menghidrolisis dua subunit glukosa pada bagian ujung sehingga menghasilkan selobiosa disakarida. Enzim  $\beta$ -glukosidase menghidolisis selobiosa menjadi glukosa.

Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA, penentuan pH optimum enzim selulase kasar dapat ditunjukkan pada L.7.1 yang menunjukkan adanya pengaruh terhadap perlakuan variasi pH dimana nilai sig adalah 0. Adanya pengaruh terhadap perlakuan variasi pH maka diperlukan uji lanjut menggunakan uji tukey untuk mengetahui adanya perbedaan perlakuan dari masing-masing pH. Hasil uji tukey dapat dilihat pada L.7.1 yang menunjukkan bahwa perlakuan pH 8 memberikan beda nyata dibandingkan perlakuan dengan pH 5; 7 dan 9 yaitu dengan notasi C. Namun pH 8 tidak menunjukkan beda nyata pada pH 6 yang ditandai dengan notasi yang sama yaitu notasi C. Hasil statistik menunjukkan bahwa dalam penelitian ini pH optimum aktivitas enzim selulase kasar berada pada pH 6 dan pH 8. Nilai aktivitas selulase pada pH 8 lebih tinggi dari pH 6, sehingga dapat disimpulkan bahwa pH optimum adalah pH 8 dengan nilai aktivitas selulase tertinggi sebesar 2.17 × 10<sup>-2</sup> Unit/mL.

Enzim selulase kasar hasil penelitian menunjukkan terdapat dua pH optimum, yaitu pada kondisi asam rendah pH 6 dan basa rendah pH 8. Hal ini terjadi besar kemungkinan karena enzim merupakan protein yang tersusun atas asam amino dimana dalam strukturnya terdapat gugus asam karboksil (-COOH) dan gugus amina (-NH<sub>2</sub>). Adanya kedua gugus tersebut, asam amino dalam

kondisi netral (pH isoelektrik) akan membentuk ion positif dan negatif (*zwintterion*). Oleh karena itu muatan ion tergantung pada pH larutan (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006). Pada asam amino dalam bentuk ion zwitter, gugus amino mendapat tambahan sebuah proton dan gugus karboksil terdisosiasi. Derajat asam amino sangat dipengaruhi oleh pH. Pada pH asam, gugus karboksil tidak terdisosiasi, sedang gugus aminonya menjadi ion. Pada pH basa, gugus karboksil terdisosiasi, sedang gugus aminonya tidak (Winarno, 2004).

Menurut Mulyaman (2014), asam amino dapat bersifat lebih asam ataupun lebih basa. Asam amino bersifat asam seperti asam aspartat dan asam glutamat yang bermuatan polar dan sangat mudah menangkap elektron. Adapun asam amino bersifat basa seperti lisin, arginin dan histidin. Kandungan jumlah asam amino dengan sifat keasaman dan kebasaan tertentu dalam suatu enzim dapat mempengaruhi perubahan pH. Enzim menyediakan banyak tempat untuk pengikatan proton karena enzim adalah protein yang tersusun oleh asam amino yang dapat mengikat proton pada gugus amino, karboksil dan gugus fungsional lainnya. Gugus fungsional pada sisi aktif yang dapat terionisasi memegang peranan penting pada suatu reaksi yang dikatalis oleh enzim (Suhartono, 1989 dalam Urtati dkk, 2009). Gugus fungsional tersebut terdapat pada asam amino basa dan asam amino asam (Whitaker, 1994 dalam Urtati dkk, 2009).

Pada penelitian ini kondisi asam dan basa rendah dapat membentuk ion pada asam amino, sehingga dapat mengaktifkan sisi aktif enzim dan pada kondisi ini aktivitas enzim meningkat. Namun penambahan asam atau basa lebih lanjut mengakibatkan terjadinya perubahan asam amino, sehingga sisi aktif enzim tidak lagi aktif dan aktivitas enzim menurun. Pada kondisi netral atau asam amino

dalam kondisi ion zwitter tidak menbentuk sisi aktif sehingga enzim mengalami penurunan aktivitas.

## 4.6.2 Penentuan Suhu Optimum Ekstrak Kasar Enzim Selulase

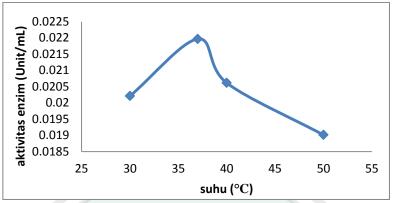
Suhu sangat berpengaruh terhadap kerja enzim. Enzim dapat menjalankan aktivitasnya pada kisaran suhu tertentu. Suhu optimum merupakan suhu yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim. Penurunan suhu akan mengakibatkan enzim tidak aktif sementara kenaikan suhu juga dapat menyebabkan proses denaturasi yang menyebabkan sisi aktif enzim terganggu dan mengurangi kecepatan reaksi (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim selulase dilakukan dengan mengambil 1 mL substrat CMC 1 % yang sudah dilarutkan dalam *buffer phospat* sesuai pH optimum yaitu pH 8. Sampel dimasukkan dalam 4 tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditambahan 1 mL ekstrak kasar selulase pada masing-masing tabung reaksi. Masing-masing tabung diinkubasi selama 60 menit pada suhu 30 °C; 37 °C; 40 °C dan 50 °C. Setelah itu dipanaskan di dalam air mendidih selama 15 menit. Kemudian didinginkan pada suhu ruang. Aktivitas enzim dianalisis dengan metode DNS.

Table 4.2 Hasil analisis pengaruh suhu terhadap enzim selulase dalam substrat CMC

Suhu (°C)	Aktivitas Enzim (Unit/mL)
30	$2.02 \times 10^{-2}$ b
37	$2.19 \times 10^{-2}$ c
40	$2.06 \times 10^{-2}$ b
50	$1.90 \times 10^{-2}$ a

<sup>\*</sup> notasi huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan



Gambar 4.8 Kurva pengaruh suhu terhadap enzim selulase dalam substrat CMC

Berdasarkan data yang telah dihasilkan suhu optimum dari ekstrak kasar enzim selulase terjadi pada suhu 37 °C ditandai dengan aktivitas enzim tertinggi sebesar 2,19 x 10<sup>-2</sup> Unit/mL. Penelitian ini sebanding dengan penelitian Aruwajoye (2014) dengan hasil suhu optimum 37 °C dengan nilai aktivitas enzim selulase sebesar 1,7 Unit/mL. Penelitian Singh dkk (2012) menyatakan bahwa suhu optimum enzim selulase yang telah diproduksi oleh bakteri *Bacillus circulans* adalah pada suhu 25 °C. Penelitian Nirmala dan Sindhu (2011) menunjukkan suhu optimum enzim selulase oleh *Bacillus circulans* berada pada suhu 45 °C.

Bacillus sp tergolong bakteri mesofil yang mampu tumbuh pada suhu 20 – 45 °C. Suhu optimum pada Bacillus subtilis adalah 35 °C (Sreekumar dan Soudrajat, 2010 dalam Bakti 2012). Pertumbuhan optimum pada Bacillus thuringiensis terjadi pada suhu 40 °C. Menurut Bakti (2012), Bacillus sp BPPT CC RK2 memiliki suhu optimum 37 °C. Pada pertumbuhan bakteri jumlah sel yang tumbuh diasumsikan berbanding lurus dengan banyaknya enzim yang diproduksi (Alam dkk, 2013)

Aktivitas enzim terlihat meningkat pada suhu 30 °C menuju suhu 37 °C, kondisi ini menunjukkan adanya peningkatan energi kinetik. Peningkatan suhu menyebabkan aktivitas enzim meningkat karena suhu yang tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas reaksi antara substrat dengan enzim. Reaksi yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk makin banyak (Susanti, 2011). Sedangkan pada suhu 37 °C menuju suhu 40 – 50 °C aktivitas enzim mengalami penurunan. Peningkatan suhu lebih lanjut pada enzim pada satu titik tertentu akan menurunkan aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena enzim mengalami denaturasi. Enzim mengalami perubahan konformasi pada suhu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim (Lakitan, 2004 dalam Susanti, 2011).

Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA, penentuan suhu optimum enzim selulase kasar dapat ditunjukkan pada L.7.2 yang menunjukkan adanya pengaruh terhadap perlakuan variasi suhu dimana nilai sig adalah 0. Adanya pengaruh terhadap perlakuan variasi suhu maka diperlukan uji lanjut menggunakan uji tukey untuk mengetahui adanya perbedaan perlakuan dari masing-masing suhu. Hasil uji tukey dapat dilihat pada L.7.2 yang menunjukkan bahwa perlakuan suhu 37 °C memberikan beda nyata dibandingkan perlakuan dengan suhu 30 °C; 40 °C dan 50 °C yaitu dengan notasi C. berdasarkan hasil statistik dapat disimpulkan bahwa suhu optimum berada pada suhu 37 °C dengan aktivitas selulase sebesar 2,19 x 10<sup>-2</sup> Unit/mL.

## 4.6.3 Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum Ekstrak Kasar Enzim Selulase

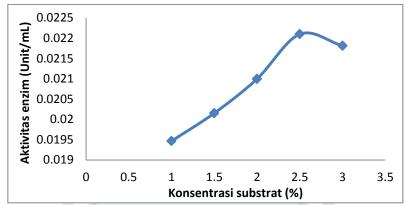
Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim selulase ditentukan dengan mengambil 1 mL substrat CMC 1,0 %; 1,5 %; 2,0 %; 2,5 % dan 3,0 % (b/v) yang sudah dilarutkan dalam buffer pH optimum yaitu pH 8. Sampel dimasukkan dalam 5 tabung reaksi yang berbeda. Kemudian larutan ditambahkan 1 mL ekstrak kasar selulase pada masing-masing tabung reaksi. Masing-masing sampel diinkubasi pada suhu optimum yaitu suhu 30 °C selama 60 menit. Setelah itu dipanaskan di dalam air mendidih selama 15 menit. Kemudian sampel didinginkan pada suhu ruang. Aktivitas enzim dianalisis dengan metode DNS

Table 4.3 Hasil analisis pengaruh konsentrasi substrat CMC terhadap enzim selulase

Konsentrasi substrat (%)	Aktivitas enzim (Unit/mL)
1	$1.94 \times 10^{-2}$ a
1.5	$2.01 \times 10^{-2}$ a
2	$2.09 \times 10^{-2}$ b
2.5	$2.21 \times 10^{-2}$ c
3	$2.18 \times 10^{-2}$ c

<sup>\*</sup> notasi huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan

Konsentrasi substrat optimum aktivitas ekstrak kasar selulase tertinggi pada CMCase oleh *Bacillus circulans* menggunakan variasi substrat (1,0 – 2,0 %) dengan hasil optimum adalah konsentrasi 1 %. Penambahan substrat lebih lanjut hanya sedikit meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim, karena hampir semua enzim telah membentuk kompleks enzim-substrat, sehingga tidak terdapat lagi sisi aktif enzim yang bebas (Susanti, 2011).



Gambar 4.9 Kurva pengaruh konsentrasi substrat CMC terhadap enzim selulase

Berdasarkan data yang telah dihasilkan konsentrasi substrat optimum dari ekstrak kasar enzim selulase adalah pada konsentrasi substrat 2,5 % dengan aktivitas enzim sebesar 2,21 x 10<sup>-2</sup> Unit/mL. Penelitian Saropah (2012) menunjukkan konsentrasi substrat optimum ekstrak kasar selulase oleh bakteri selulolitik adalah 1,5 %. Sedangkan penelitian Susanti (2011) menunjukkan konsentrasi substrat CMC optimum enzim selulase oleh *Bacillus circulans* adalah konsentrasi 1 %.

Pada konsentrasi 1 – 2,5 % terjadi peningkatan aktivitas enzim. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi substrat rendah, sisi aktif enzim hanya akan menampung substrat sedikit. Bila konsentrasi substrat diperbesar, makin banyak substrat yang akan bergabung dengan enzim pada sisi aktif tersebut. Dengan demikian, konsentrasi kompleks enzim-substrat makin besar. Hal ini menyebabkan makin besarnya kecepatan reaksi. Namun pada penambahan konsentrasi di atas 2,5 % terjadi penurunan aktivitas enzim. Pada kondisi tersebut menunjukkan bahwa semua sisi aktif enzim telah dipenuhi dengan substrat atau telah jenuh dengan substrat, dimana dalam keadaan ini bertambahnya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambah besarnya konsentrasi kompleks enzim-

substrat, sehingga jumlah hasil reaksinya pun tidak bertambah besar (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

Konsentrasi substrat sebanding dengan aktivitas ekstrak kasar enzim. Pada konsentrasi rendah, aktivitas juga rendah karena sisi aktif enzim hanya sedikit mengikat substrat sehingga gula pereduksi yang dihasilkan sedikit. Demikian juga dengan konsentrasi substrat yang semakin tinggi, maka sisi aktif enzim akan banyak mengikat substrat dan produksi gula pereduksi yang dihasilkan juga makin banyak. Namun penambahan substrat lebih lanjut hanya sedikit meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim, karena hampir semua enzim telah membentuk kompleks enzim-substrat (Susanti, 2011). Pada penambahan konsentrasi substrat berlebih akan mengakibatkan terjadi penurunan kecepatan reaksi enzimatik. Hal ini terjadi karena semakin tinggi konsentrasi CMC maka makin tinggi viskositasnya sehingga probabilitas substrat berikatan dengan sisi aktif enzim semakin kecil (Masfufatun, 2011).

Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA, penentuan konsentrasi substrat optimum enzim selulase kasar dapat ditunjukkan pada L.7.3 yang menunjukkan adanya pengaruh terhadap perlakuan variasi konsentrasi substrat dimana nilai sig adalah 0. Adanya pengaruh terhadap perlakuan variasi konsentrasi substrat maka diperlukan uji lanjut menggunakan uji tukey untuk mengetahui adanya perbedaan perlakuan dari masing-masing konsentrasi substrat. Hasil uji tukey dapat dilihat pada L.7.3 yang menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi substrat 1,0 % dan 1,5 % memberikan beda nyata dibandingkan perlakuan dengan konsentrasi substrat 2,0 %; 2,5 %; dan 3,0 % yaitu dengan notasi A serta konsentrasi substrat 2,5 % dan 3,0 % memberikan beda nyata

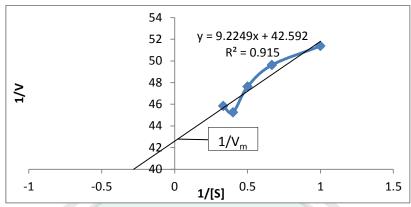
dibandingkan perlakuan dengan konsentrasi substrat 1,0 %; 1,5 %; dan 2,0 % yaitu dengan notasi C. Hasil statistik menunjukkan konsentrasi substrat optimum adalah konsentrasi 2,5 % dan 3,0 %. Aktivitas selulase tertinggi berada pada konsentrasi 2,5 %, sehingga disimpulkan bahwa konsentrasi substrat optimum berada pada konsentrasi substrat 2,5 % dengan aktivitas selulase tertinggi sebesar 2,21 x 10<sup>-2</sup> Unit/mL.

Hasil analisis pengaruh konsentrasi substrat selanjutnya digunakan untuk menentukan laju reaksi maksimum (V<sub>maks</sub>) dan konstanta Michaelis-Menten (K<sub>M</sub>). penentuan V<sub>maks</sub> dan K<sub>M</sub> penting dilakukan untuk mengetahui karakteristik enzim. Nilai V<sub>maks</sub> menunjukkan tingkat kejenuhan enzim oleh substrat sedangkan nilai K<sub>M</sub> menunjukkan efisiensi katalis dari enzim yang didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat kecepatan katalitik enzim mencapai setengah kecepatan maksimumnya (Gultom, 2001). Penentuan nilai V<sub>maks</sub> dan K<sub>M</sub> dilakukan dengan cara mengukur kecepatan awal dan aktivitas enzim selulase pada kondisi optimumnya (pH 8 dan suhu 37 °C) pada variasi substrat 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 %.

Analisis penentuan nilai  $V_{maks}$  dan  $K_M$  dilakukan dengan mentransformasikan persamaan Michaelis-Menten ke dalam persamaan Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{Vmaks} + \frac{KM}{Vmaks} \frac{1}{[S]}.$$
 (4.1)

Diperoleh nilai intersep = 
$$\frac{1}{Vmaks}$$
, slope =  $\frac{KM}{Vmaks}$ , y =  $\frac{1}{V}$  dan x =  $\frac{1}{[s]}$ 



Gambar 4.10 Grafik hubungan 1/V dengan 1/[S]

Berdasarkan Gambar 4.10 diperoleh persamaan linier Y = 9,2249x + 42.592, sehingga nilai  $V_{maks}$  sebesar 0,0235 Unit/mL dan  $K_M$  sebesar 0,2166 %. Nilai  $V_{maks}$  sebesar 0,0235 Unit/mL menunjukkan kecepatan maksimum enzim selulase ketika jenuh dengan substrat selulosa, sedangkan kostanta Michaelis-Menten ketika enzim selulase mencapai setengah dari kecepatan maksimumnya adalah sebesar 0,2166 %. Hasil penelitian Saropah (2012) dari ekstrak kasar selulase oleh bakteri selulolitik memiliki nilai  $V_{maks}$  sebesar 0,0086 Unit/mL dan  $K_M$  sebesar 1,6943 %. Sementara itu penelitian Susanti (2011), CMC-ase oleh  $Bacillus\ circulans\ memiliki\ nilai\ V_{maks}\ sebesar -0,2 % dan <math>K_M$  sebesar 5 %.

## 4.7 Kajian Penelitian dalam Prespektif Islam

Allah SWT menciptakan segala sesuatu di langit maupun di bumi ini semata-mata untuk kepentingan dan kebutuhan seluruh makhluk-Nya agar tercipta keseimbangan ekosistem yang saling melengkapi. Keseimbangan dari ciptaan Allah SWT adalah berupa lingkungan yang bermanfaat bagi kehidupan sebagaimana dalam firman-Nya surat az-Zumar [39]: 21:

Artinya: "Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa Sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, Maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal" (Q.S. az-Zumar [39]: 21).

Menurut al-Qurthubi (2009), lafadz ثم يجعله حطما diartikan " kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai ", diambil dari makna tahathtamaal 'uud yakni kayu yang remuk karena kering. Remukan kayu dalam hal ini disebabkan oleh mikroorganisme yang mengeluarkan enzim sehingga kayu tersebut terpecah-pecah menjadi remuk dan tidak kokoh lagi.

Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat diproduksi oleh bakteri *Bacillus circulans*. Bakteri *Bacillus circulans* akan memproduksi enzim selulase melalui media berselulosa dan mampu memecah selulosa menjadi glukosa yang dapat dimanfaatkan sebagai pemanis. Peristiwa ini seperti halnya dijelaskan dalam firman Allah Al-Qur'an surat Ali 'Imran [3]: 27

Artinya: "Engkau masukkan malam ke dalam siang dan Engkau masukkan siang ke dalam malam. Engkau keluarkan yang hidup dari yang mati, dan Engkau keluarkan yang mati dari yang hidup[191]. dan Engkau beri rezki siapa yang Engkau kehendaki tanpa hisab (batas)" (Q.S. Ali 'Imran [3]: 27).

Maksud dari kalimat وتخرج الحي من الميت وتخرج الميت من الحي (Engkau keluarkan yang hidup dari yang mati, dan Engkau keluarkan yang mati dari yang hidup), Allah mengeluarkan tanaman dari biji-bijian dan biji-bijian dari tanaman, pohon kurma dari bijinya dan biji kurma dari pohonnya, orang mukmin dari orang kafir, orang kafir dari orang mukmin, ayam dari telur dan telur dari ayam dan lain

sebagainya yang serupa dengan itu (Syaikh, 2007). Siklus kehidupan dan kematian merupakan rahasia keajaiban alam dan rahasia kehidupan. Ciri utama siklus itu adalah bahwa zat-zat hidrogen, karbondioksida, nitrogen dan garam yang non organik di bumi, berubah menjadi zat-zat organik yang merupakan bahan kehidupan bagi hewan dan tumbuhan berkat bantuan sinar matahari. Selanjutnya zat-zat tersebut kembali mati dalam bentuk kotoran makhluk hidup karena faktor disolusi bakteri dan kimia, yang mengubahnya menjadi zat non organik untuk memasuki siklus kehidupan yang baru. Begitulah Sang Pencipta mengeluarkan kehidupan dari kematian dan mengeluarkan kematian dari kehidupan di setiap saat (Depag, 2010). Hasil penelitian memberikan gambaran maksud dari kalimat وتخرج الميت من الحي yakni, Allah mengeluarkan yang mati berupa enzim selulase dari yang hidup berupa bakteri Bacillus circulans.

Mikroorganisme adalah makhluk ciptaan Allah dengan ukuran yang kecil namun Allah telah memberi kelebihan di dalamnya untuk menjaga keseimbangan hidup. Mikroorganisme mampu menghasilkan enzim dimana setiap enzim dari mikroorganisme yang berbeda akan memiliki karakteristik yang berbeda pula. Demikianlah Allah memperhitungkan segala yang Ia ciptakan. Enzim selulase yang berasal dari setiap mikroorganisme memiliki karakteristik yang berbeda. Enzim selulase kasar yang telah diproduksi *Bacillus circulans* pada penelitian ini memiliki pH karakteristik 8, suhu 37 °C dengan konsentrasi substrat 2,5 %. Pada kondisi ini ekstrak kasar enzim selulase memiliki aktivitas enzim sebesar 2,21 x  $10^{-2}$  Unit/mL. Nilai V<sub>maks</sub> sebesar 0,0235 Unit/mL dan K<sub>M</sub> sebesar 0,2166 %. Hasil penelitian ini memiliki nilai aktivitas enzim lebih tinggi dibandingkan pada penelitian sebelumnya. Pada penelitian Saropah (2012) hasil karakterisasi enzim

selulase kasar dari bakteri selulolitik memiliki aktivitas enzim sebesar 0,0064  $Unit/mL. \ Nilai \ V_{maks} \ dan \ K_M \ yang \ dihasilkan sebesar 0.0086 \ Unit \ dan 1,6943 \ \%.$ 



#### **BAB V**

#### **PENUTUP**

# 5.1 Kesimpulan

Ekstrak kasar enzim selulase yang diproduksi oleh *Bacillus circulans* memiliki karakteristik pada pH 8 dengan aktivitas enzim sebesar  $2,17 \times 10^{-2}$  Unit/mL. Suhu karakteristik adalah suhu 37 °C dengan aktivitas enzim sebesar  $2,19 \times 10^{-2}$  Unit/mL. Konsentrasi substrat karakteristik adalah pada konsentrasi substrat 2,5 % dengan aktivitas enzim sebesar  $2,21 \times 10^{-2}$  Unit/mL dan menghasilkan nilai  $V_{maks}$  dan  $K_M$  sebesar 0,0235 Unit/mL dan 0,2166 %.

#### 5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lanjutan tentang karakterisasi dengan kajian variasi yang lain seperti konsentrasi enzim, inhibitor, waktu inkubasi dan kofaktor guna mengetahui pengaruh kajian tersebut terhadap aktivitas enzim. Serta perlu adanya pemurnian enzim selulase dari ekstrak kasar tersebut guna memperoleh aktivitas lebih tinggi pada enzim.

#### **DAFTAR PUSTAKA**

- Alam, M.Z., Manchulur, M.A.,dan Anwar, M. N. 2004. Isolation Purification, Characterization of Cellulolytic Enzym Producer by the Isolate *Streptomyces omiyaensis*. *Parkist J Biol Sci.* Volume 7, Nomor 10: 16471653.
- Alam, M.S., Sarjono, P.R., dan Aminin, A.L.N. 2013. Isolasi Bakteri Selolitik Termofilik Kompos Pertanian Desa Bayat, Klaten, Jawa Tengah. *Chem Info*. Volume 1, Nomor 1 b.: 190 195.
- Al-Qurthubi, I. 2009. *Tafsir al-Qurthubi*. Penerjemah: Fathurrahman Abdul Hamid, Dudi Rosyadi, dan Marwan Affandi. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Ambriayanto, K.S. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Pendegradasi Selulosa dari Serahan Daun Rumput gajah (*Pennisetum purpureum* Schaum). *Jurnal*. Surabaya: ITS.
- Anonymous. 2011. Kebutuhan Glukosa di Indonesia. Jakarta: Badan Pusat Statistik.
- Aruwajoye, G.S. 2014. Extracellular Cellulase Production by *Bacillus circulans* Isolated from Decayed Wood. *IJARAS*. Volume 3, Nomor 2: 1 8.
- As-Suyuti. 2008. *Tafsir Jalalin*. Terjemahan Bahrun Abu Bakar. Bandung: Penerbit Sinar Baru Algensindo.
- Asy-Syaukani, I. 2008. *Tafsir Fathul Qadir*. Penerjemah; Amir Hamzah Fahrudin, dan Asep Saefullah. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Aulanni'am, 2005. Protein dan Analisisnya. Malang: Citra Mentari Grup.
- Aziz, P. 2012. Enzim dan faktor-faktor yang Mempengaruhi Laju Reaksi Enzim. *Addition material* for FIK Biochemical Experiment Class. Diakses tanggal 15 April 2012.
- Bakti, C.P. 2012. Optimasi Produksi Enzim Selulase dari Bacillus sp. BPPT CC RK 2 dengan Variasi pH dan Suhu Menggunakan *Response Surface Methodology*. *Skripsi*. Depok: UI.
- Bintang, M. 2010. Biokimia Teknik Penelitian. Jakarta: Erlangga.
- Biorata, A.M. 2012. Optimasi Produksi Selulase dari *Bacillus sp.* BPPTK CC RK 2 menggunakan Metode Respon Permukaan dengan Variasi Rasio C/N dan Waktu Fermentasi. *Skripsi*. Depok: UI.

- Chala, D.S. 1983. Growth Characteristic of Microorganism in Solid State Fermentation For Upgrading of Protein Value of Lignocelluloses and Celullose Production. *American Chemical society*: 205 310.
- Departemen Agama RI, 2010. Al-Qur'an dan Tafsirnya. Jakarta: Lentera Abadi.
- Fan, Zhiliang., Lee, R. Lynd. 2006. Convertion of Paper Sludge to Ethanol, II: Proses Desigm and Economic Analysis. *Bioprocess Biosyst Eng* 30: 35 45.
- Fessenden, R.J dan Fessenden J.S. 1999. *Kimia Organik*. Penerjemah: pudjaatmaka, A.H. Jakarta: UGM Press.
- Frazier, W.C, dennis C. Westhoff. 1988. *Food microbiology* 4<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Company.
- Gultom, T. 2011. *Biokimia Struktur dan Fungs*i. Yogyakarta: UNY Press.
- Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus spp.* ISSN 0216-1877. *Oseana*. Volume XXV, Nomor 1: 31 41.
- Hayati, E.K. 2007. Buku Ajar Dasar-dasar Analisis Spektroskopi. Malang: KJM UIN Malang.
- Hidayat, I. 2005. Pengaruh pH terhadap Aktivitas *Endo-1,4-β-glucanase Bacillus* sp. AR 009. *Biodiversitas*. Volume 6, Nomor 4: 242 244.
- Holtzapple, M.T. 1993. *Cellulose. In:encyclopedia of Food Science.*, Food Technology and Nutrition, 2: 2731-2738. Acadeni Press. London.
- Ikram, U.H, Javed, M.M., Khan, T.S., dan Ziddiq, S. 2005. Cotton saccharifying activity of Cellulose produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma virid*. Res.J. Arcic & Biol. Sci. Volume 1, Nomor 3: 241 245.
- Indah, S. 2009. Pra Rancangan Pabrik Pembuatan Glukosa dari Pati Jagung dengan Proses Hidrolisa dengan Kapasitas 12000 ton/tahun. *Skripsi Teknik Kimia*. Medan: USU Reporatory.
- Indahsari, M.N. 2012. Isolasi Bakteri Selulolitik dari Bekatul dan Uji Aktivitas Enzim Selulase pada Media dengan Berbagai Sumber nitrogen. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Malang.
- Irianto, K. 2007. *Mikrobiologi: Menguak Dunia Mikroorganisme*. Bandung: CV Yrama Widya.
- Khopkar. 2003. Konsep Dasar Kimia Analitik. Jakarta: UI Press.

- Kim, H. 1995. Characterization and Substrate Spcivicity of an Endo-Beta-1,4-D-Glukanase (Avicelase I) from An Extracelluler Multienyim Complexs of *Bacillus circulans. Appl Enviro Microbiol* 61: 959 965.
- Lathifah, K. 2013. Pengaruh Konsentrasi dan Lama Inkubasi pada Hidrolisis Bekatul menjadi Glukosa menggunakan Enzim Selulase Kasar. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN malang.
- Lehninger, A.L. 1997. Biochemistry. New York: WorthPublisher Inc.
- Li, X. dan Gao, P. 1997. CMC-liquiefying Enzym, a Low Molecular Mass Initial Cellulose-Decomposing Cellulose Responsible for Fragmentation from *Sterptomyces* sp. LX. *J. appl. Microbial.* 83: 56 66.
- Maunatin, A. 2013. Mikrobiologi Dasar. Malang: Laboraturium jurusan Biologi UIN Malang.
- Masfufatun. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Seluase. *Jurnal*. Surabaya: Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.
- Meryandini, A; Widosari, W; Maranatha, B dan Sunarti, T.C. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara. Sains.* Volume 13, Nomor 1: 33 38.
- Miller, G.L. 1959. Usr of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar. *Anal Chem.* 31: 426.
- Muawanah, A. 2006. Produksi Eznzim Xilanase Termostabil dari *Termomyces lanugiosus* IFO 150 pada Substrat Bagas Tebu. *Skripsi*. Bogor: Program Studi Ilmu Pangan Sekolahan Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Mulyaman, D. 2014. Asam Amino dan Struktur serta Sifat-sifatnya. httpchemde.blogspot.co.id201410baiklah-teman-teman-skarang-saya-akan.html. diakses tanggal 8 januari 2016.
- Nasrulloh. 2009. Hidrolisis Asam dan Enzimatis Pati Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L) menjadi Glukosa sebagai Substrat Fermentai Etanol. *Skripsi*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Nirmala, P dan Sindhu, A. 2011. Production of Endoglucanase by Optimizing the Environmental Condition of *Bacillus circulans* on Submergen Fermentaion. *International Journal of Applied Engineering Research*, *Dindigul*. Volume 2, Nomor 2: 472 481.
- Novitasari, E. 2015. Pengaruh Suhu dan Lama Sakarifikasi Terhadap Proses Hidrolisis Bekatul Menjadi Glukosa Menggunakan Enzim Glukoamilase. *Skripsi*. Malang: UIN Malang.

- Palmer, T. 1995. *Understanding Enzyme 3<sup>rd</sup>*. new York: Ellishorwood Publisher.
- Poedjiadi, A dan Supriyanti, T.F.M. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI press.
- Rachman, A. 1989. Pengantar Teknologi Fermentasi. Bogor; IPB.
- Ray, A.K., Bairagi, A., Ghosh, K.S., dan Sen, S.K. 2007. Optimation of Fermentation Condition for Cellulose Production by *Bacillus subtilis CY5* and *Bacillus circulans TP3* Isolated from Fish Gut. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. Volume 37, Nomor 1: 47 53.
- Rohman, A., dan Gandjar, I.G. 2010. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Rohman, A., dan Gandjar, I.G. 2012. *Analisis Obat secara Spektrofotometri dan Kromatografi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Saropah, D.A. 2012. Penentuan Kondisi Optimum Ekstrak Kasar Selulas Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Malang.
- Shihab, M.Q. 1999. Membumikan al-Quran: Fungsi dan Peeran Wahyu dalam Kehidupan Masyarakat. Bandung: Mizan.
- Singh, A.J; Maharana, A.K; Masih, H; Kumar, Y dan Kumar, S. 2012. Production Optimization and Purification of Bacterial Cellulase by Solid State Bioprocessing of Agro Biomass. Reserch Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. Volume 3, Nomor 2: 977 989.
- Sjostrom, E. 1995. *Kimia Kayu: Dasar-dasar dan Penggunaan*. Penerjemah Hardjono Sastrohamidjojo. Yogyakarta: Gadja Mada University Press.
- Sudarmaji, S: Haryono, B dan Suhardi. 1997. Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Yogyakarta: liberty.
- Sukadarti, S., Haryono, B. dan Prasetyo, H. 2010. Produksi Reduksi dan Sabut Kelapa menggunakan Jamur *Trichoderma reesei*. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"*. Yogyakarta: UPN Veteran.
- Sumarsih, S. 2003. Mikrobiologi Dasar. *Diktat Kuliah*. Yogyakarta: Jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian UPN Veteran.
- Susanti, E. 2011. Optimasi Produksi dan Karakterisasi Sistem Selulase dari *Bacillus circulans* strain Lokal dengan Induser Avicel. *Jurnal Ilmu Dasar*. Volume 12, Nomor 1: 40 49.
- Sutedjo, M. 1996. *Mikrobiologi tanah*. Jakarta: PT. Rineka Cipta.

- Syaikh, A. I. 2007. *Tafsir Ibnu Katsir*. Penerjemah: M. Abdul Ghoffar E.M. Jakarta: Pustaka Imam asy-Syafi'i.
- Taherdazeh, M.J. dan Karini, k. 2007. *Acid-based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulose Materials*: a review Bioresources. Volume 2, Nomor 3: 472 499.
- Tortora, G., Fince, B.R. dan Case, C.L. 2001. *Introduction Microbiologi* edisi 7. San Francisco Spanyol: Addison Weasly angman.
- Utarti, E; Nurita, L dan Arimurti, S. 2009. Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar *Bacillus sp* 31. *Jurnal Ilmu Dasar*. Volume 1, Nomor 1: 102 108.
- Vijayaraghavan, P dan Vincent, S.G.P. 2012. Purification and Characterization of Carboxymethyl Celullase from *Bacillus* sp, Isolated from a Paddy Fied. *Polish Journal of Microbiology*. Volume 16, Nomor 1: 51 55.
- Winarno, F.G. 2004. Kimia Pangan dan Gizi. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Yin, Li-Jung., Lin, Hsin-Hung., dan Xiao, Zheng-Rong. 2010. Purification and Characterization of a Cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *Journal of Science and Technology*. Vol 18. No 3. Pp 466 471.
- Yusak, Y. 2004. Pengaruh Suhu dan Buffer Asetat Terhadap Hidrolisis CMC oleh Enzim Selulase dari Ekstrak Aspergillus niger dalam Media Campuran Onggok dan Dedak. *Jurnal Sains Kimia*. Volume 8, Nomor 2: 35-36.
- Zulaikhah, S. 2013. Pemurnian Enzim Selulase Kasar dari Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi Bekatul secara Parsial dengan Amonium Sulfat. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Malang.

# Lampiran 1: Diagram Alir Penelitian

#### L.1.2 Pembuatan Media

# L1.2.1 Pembuatan Media CMC agar

CMC 1 g; 0,04 g MgSO<sub>4</sub>; 0,15 g KNO<sub>3</sub>; 0,1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;

0,004 g CaCl<sub>2</sub>; 0,4 g yeast exstract dan 3,4 g agar

- Dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL
- Ditambahkan aquades sebanyak 100 mL
- Dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut
- Ditutup mulut erlenmeyer dengan kapas
- Disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit

Media CMC Agar

## L.1.2.2 Pembuatan Media CMC Broth 1 %

CMC 1 g; 0,04 g MgSO<sub>4</sub>; 0,15 g KNO<sub>3</sub>; 0,1 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,004 g CaCl<sub>2</sub>; 0,4 g yeast exstract

- Dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL
- Ditambahkan aquades sebanyak 100 mL
- Dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut
- Ditutup mulut erlenmeyer dengan kapas
- Disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit

Media CMC Broth 1 %

# L.1.2.3 Pembuatan Media Nutrien Agar (NA)

#### Bubuk NA

- Ditimbang 2,3 g
- Dilarutkan dalam aquades sebanyak 100 mL
- Dipanaskan hingga mendidih
- Dimasukkan 5 mL ke dalam tabung reaksi
- Ditutup kapas
- Disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit
- Diletakkan miring hingga dingin dan terbentuk agar

Media NA

# L.1.3 Peremajaan isolat

## Bakteri Bacillus circulans

- Diambil 1 ose bakteri
- Digoreskan pada media NA miring
- Ditutup kapas
- Diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang

Hasil

# L.1.4 Uji Konfirmasi Bacillus circulans terhadap Produksi Enzim Selulase

## Isolat Media NA

- Ditotolkan pada cawan petri berisi media CMC Agar
- Diinkubasi selama 48 jam
- Dituangkan congo red (1 mg/mL)
- Dibiarkan selama 30 menit
- Dicuci dengan NaCl 0,1 %

Hasil

# L.1.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri dan Aktivitas Selulase

## Biakan bakteri

- Diambil 2 ose
- Diinokulasikan dalam 200 mL media CMC cair
- Diinkubasi dalam shaker dengan kecepatan 125 rpm selama 24 jam
- Diambil 20 mL inokulum
- Dimasukkan dalam 200 mL media CMC cair baru
- Diinkubasi dalam *shaker incubator* dan diambil sebanyak 4 mL tiap 4 jam selama 24 jam
- Dihitung jumlah sel dan aktivitas bakteri
- Dibuat plot antara waktu, OD dan aktivitas enzim

#### L.1.7 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

#### Biakan bakteri

- Diambil 2 ose
- Diinokulasikan dalam 200 mL media CMC cair
- Diinkubasi dalam shaker dengan kecepatan 125 rpm selama 24 jam suhu ruang
- Diambil 10 mL inokulum
- Dimasukkan dalam 100 mL media CMC baru
- Diinkubasi pada *shaker incubator* pada suhu ruang hingga fase yang menghasilkan selulase tinggi dari kurva pertumbuhan
- Disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm pada suhu 4 °C

Filtrat

Residu

## L.1.8 Karakterisasi Enzim Selulase

# L.1.8.1 Penentuan pH optimum Enzim Selulase

Ekstrak kasar selulase

- Diambil 1 mL substrat CMC Broth 1 %
- Dilarutkan dalam larutan buffer pH (5, 6, 7, 8 dan 9)
- Dimasukkan dalam 5 tabung yang berbeda
- Ditambahkan ekstrak kasar selulase 1 mL
- Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit
- Dipanaskan di dalam air mendidih selama 15 menit
- Didinginkan pada suhu ruang
- Dianalisis aktivitas enzim dengan metode DNS
- Dihitung dengan rumus:

$$AE = \frac{c}{BM \ produk \ x \ t} \ \mathcal{X} \ \frac{H}{E}$$

# L.1.8.2 Penentuan Suhu Optimum Enzim Selulase

#### Ekstrak kasar selulase

- Diambil 1 mL substrat CMC Broth 1 %
- Dilarutkan dalam larutan buffer pH optimum
- Dimasukkan dalam 4 tabung yang berbeda
- Ditambahkan ekstrak kasar selulase 1 mL
- Diinkubasi pada suhu (30 °C; 40 °C; 50 °C dan 60 °C) selama 60 menit
- Dipanaskan di dalam air mendidih selama 15 menit
- Didinginkan pada suhu ruang
- Dianalisis aktivitas enzim dengan metode DNS

Hasil

# L.1.8.3 Penentuan V<sub>max</sub> dan K<sub>M</sub> Enzim Selulase

#### Ekstrak kasar selulase

- Diambil 1 mL substrat CMC Broth (1,0 %; 1,5 %; ,2,0 %; 2,5 % dan 3,0 %)
- Dilarutkan dalam larutan buffer pH optimum
- Dimasukkan dalam 5 tabung yang berbeda
- Ditambahkan ekstrak kasar selulase 1 mL
- Diinkubasi pada suhu optimum selama 60 menit
- Dipanaskan di dalam air mendidih selama 15 menit
- Didinginkan pada suhu ruang
- Dianalisis aktivitas enzim dengan metode DNS

Hasil

# L.1.9 Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS (Dinitrosalicylic Acid)

## L.1.9.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum pada Glukosa

## Larutan glukosa 100 ppm

- Diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL reagen DNS dan dihomogenkan
- Ditutup dengan alumunium foil
- Dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit hingga larutan berwarna merah kecoklatan
- Ditambahkan 1 mL larutan KNa-tartrat 40 %
- Didinginkan dan ditambahkan aquades hingga volume mencapai 10 mL
- Dihomogenkan
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 800 nm dengan interval 10 pada spektrofotometer UV-Vis

#### L.1.9.2 Pembuatan Kurva Standart Glukosa

Larutan glukosa 0, 50, 100, 150, 200, 250 dan 300 ppm

- Diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL reagen DNS dan dihomogenkan
- Ditutup dengan alumunium foil
- Dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit hingga larutan berwarna merah kecoklatan
- Ditambahkan 1 mL larutan KNa-tartrat 40 %
- Didinginkan dan ditambahkan aquades hingga volume mencapai 10 mL
- Dihomogenkan
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum

Hasil

# L.1.9.3 Analisis Kadar Gula Sampel

## Sampel

- Diambil 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL reagen DNS
- Dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit
- Ditambahkan 1 mL Kna-Tartrat 40 %
- Dimasukkan kedalam air es selama 5 menit
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum

## **Lampiran 2: Pembuatan Larutan**

## L.2.1 Pembuatan Media CMC Agar

Media yang digunakan dalam media CMC agar terdiri dari 1 g CMC; 0,04 g MgSO<sub>4</sub>; 0,15 g KNO<sub>3</sub>; 0,1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,004 g CaCl<sub>2</sub>; 0,4 g *Yeast extract* dan 3,4 g agar. Semua bahan dicampur dengan aquades sebanyak 100 mL, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditutup kapas, kemudian disterilisasi dalam autoklaf.

# L.2.2 Pembuatan Media CMC Broth 1% (b/v)

Media yang digunakan dalam media CMC yang terdiri dari 1 g CMC; 0,04 g MgSO<sub>4</sub>; 0,15 g KNO<sub>3</sub>; 0,1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,004 g CaCl<sub>2</sub> dan 0,4 g yeast exstract. Semua bahan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan aquades sebanyak 100 mL kemudian dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. erlenmeyer ditutup kapas dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

## L.2.3 Pembuatan Media Nutrien Agar

Media nutrient agar ditimbang 2,3 g dan dilarutkan dalam 100 mL aquades. Dipanaskan hingga mendidih, kemudian dimasukkan 5 mL ke dalam tabung reaksi, ditutup kapas dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Selanjutnya tabung diletakkan miring hingga dingin dan terbentuk agar.

#### L.2.4 Pembuatan Larutan Standart Glukosa

Cara membuat larutan stok glukosa sandart 100 ppm adalah:

$$ppm = \frac{mg}{L}$$

$$100 \text{ ppm} = \frac{1 mg}{1000 mL} = \frac{10 mg}{100 mL}$$

Untuk membuat larutan standart 100 ppm diperlukan 10 mg glukosa anhidrat, dilarutkan dengan aquades dan ditandabataskan dalam labu takar 100 mL. larutan

glukosa standart dengan kosentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250 dan 300 ppm diperoleh dengan pengenceran larutan stok:

a. Kosentrasi 50 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

 $50 \text{ ppm x } 10 \text{ mL} = 100 \text{ ppm x } V_2$ 

$$V_2 = \frac{10 \ ppm \times 10 \ mL}{100 \ ppm}$$

$$V_2 = 5 \text{ mL}$$

b. Konsentrasi 100 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

 $100 \text{ ppm x } 10 \text{ mL} = 100 \text{ ppm x } V_2$ 

$$V_2 = \frac{20 \ ppm \times 10 \ mL}{100 \ ppm}$$

$$V_2 = 10 \text{ mL}$$

c. Konsentrasi 150 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

150 ppm x 10 mL = 100 ppm x  $V_2$ 

$$V_2 = \frac{30 \ ppm \times 10 \ mL}{100 \ ppm}$$

$$V_2 = 15 \text{ mL}$$

d. Konsentrasi 200 ppm

$$\mathbf{M}_1 \times \mathbf{V}_1 = \mathbf{M}_2 \times \mathbf{V}_2$$

 $200 \text{ ppm x } 10 \text{ mL} = 100 \text{ ppm x V}_2$ 

$$V_2 = \frac{40 ppm \times 10 mL}{100 ppm}$$

$$V_2 = 20 \text{ mL}$$

e. Konsentrasi 250 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

250 ppm x 10 mL = 100 ppm x  $V_2$ 

$$V_2 = \frac{250 \ ppm \ x \ 10 \ mL}{100 \ ppm}$$

$$V_2 = 50 \text{ mL}$$

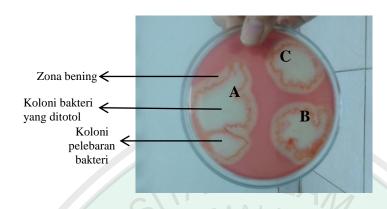
# f. Konsentrasi 300 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$
  
 $300 \text{ ppm } \times 10 \text{ mL} = 100 \text{ ppm } \times V_2$   
 $V_2 = \frac{300 \text{ ppm } \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$   
 $V_2 = 30 \text{ mL}$ 

# L.2.5 Pembuatan Reagen DNS

Reagen DNS terdiri dari: 1 g asam 3-5 dinitrosalisilat; 0,2 g fenol; 0,05 g sodium sulfit dan 1 g natrium hidroksida. Kemudian semua bahan dilarutkan dengan aquades dalam labu takar 100 mL dan ditera. Sebanyak 1 mL garam Rochelle 40 % ditambahkan segera setelah terbentuknya kompleks warna antara DNS dan gula pereduksi hasil hidrolisis.

# Lampiran 3: Indeks Selulolitik



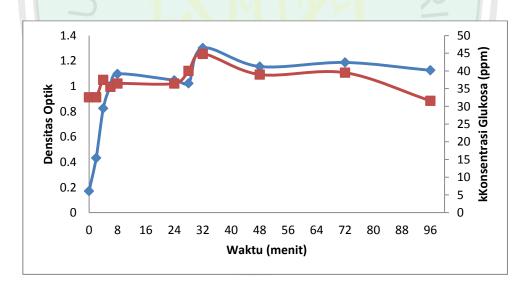
 $Indeks \ selulolitik = \frac{\textit{Diameter Zona Bening (DZB)}}{\textit{Diameter koloni bakteri (DKB)}}$ 

Biakan koloni	DZB (cm)	DK (cm)	Indeks Selulolitik
A	4,36	3,55	1,22
В	3,81	2,53	1,50
С	4,08	2,57	1,58
	1,43		

Lampiran 4: Kurva Pertumbuhan Bakteri dan Aktivitas Selulase L.4.1 Tabel Absorbansi dan Aktivitas Enzim Bakteri *Bacillus circulans* 

Waktu	OD	Aktivitas Enzim (konsentrasi glukosa)
0	0.1707	32.58025538
2	0.4318	32.58025538
4	0.8239	37.46575154
6	1	35.47712962
8	1.097	36.46552192
24	1.0457	36.46552192
28	1.0222	40.02002308
32	1.301	44.82430923
48	1.1549	38.98892114
72	1.187	39.50288096
96	1.1249	31.57884481

L.4.2 Kurva Absorbansi dan Aktivitas Enzim Bakteri Bacillus circulans

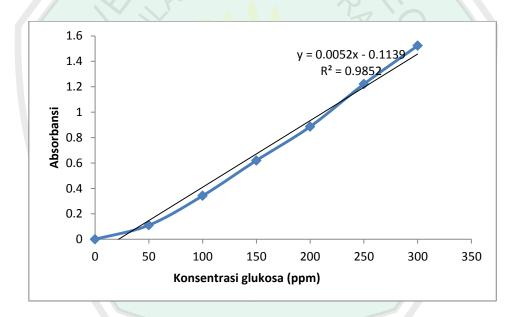


Lampiran 5: Kurva Standar Larutan Glukosa

# L.5.1 Tabel Data Absorbansi Larutan Glukosa dengan $\lambda$ 530 nm

Konsentrasi Glukosa (ppm)	Absorbansi
0	0
50	0.1107
100	0.342
150	0.6198
200	0.886
250	1.221
300	1.5229

# L.5.2 Kurva Standar Larutan Glukosa



## Lampiran 6: Perhitungan Aktivitas Selulase

Misal: pengukuran aktivitas selulase pada pH 8 dengan suhu 37 °C dan konsentrasi substrat CMC 1 %.

Persamaan kurva standar glukosa

Diketahui: 
$$y = ax + b$$

$$0,412 = 0,0052x - 0,1139$$

$$x = 101,13462$$

maka x = 101,13462

Nilai x menunjukkan banyaknya glukosa yang dihasilkan pada reaksi hidrolisis. Sehingga aktivitas enzim selulase dapat diketahui dengan persamaan:

Unit Aktivitas = 
$$\frac{C}{BM \ produk \ x \ t} \times \frac{H}{E}$$

Dimana: C = konsentrasi glukosa

BM = berat molekul glukosa

t = waktu inkubasi (menit)

H = volume enzim-substrat (mL)

E = volume enzim (mL)

Aktivitas 
$$=\frac{101,13462}{10800} \times \frac{2}{1}$$

 $= 0.018728 \mu mol/mL menit$ 

= 0.018728 Unit

Satu unit aktivitas enzim selulase dinyatakan dengan banyaknya mikro mol glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL ekstrak kasar enzim selulase per menit pada kondisi tertentu, sehingga aktivitas yang diperoleh adalah 0,018728 Unit/mL.

# Lampiran 7: Perhitungan Statistik

# L.7.1 Data dan Uji Statistik Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim

	Analisis Enzim							
TT	Ulangan			Total	rata-rata			
pН	1	2	3	Total	rata-rata			
5	0.00928	0.0079	0.00698	0.02416	0.00805			
6	0.02081	0.02134	0.0209	0.06305	0.02102			
7	0.00523	0.00813	0.00482	0.01818	0.00606			
8	0.02333	0.02062	0.02121	0.06516	0.02172			
9	0.00432	0.00502	0.00407	0.01341	0.00447			
	J	lumlah	0.18396	0.06132				

UNIANOVA AE BY pH ulangan /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /POSTHOC=pH(TUKEY) /CRITERIA=ALPHA(0.05) /DESIGN=pH ulangan.

# Univariate Analysis of Variance

[DataSet0]

**Between-Subjects Factors** 

Between-Subjects Factors				
		Value Label	N	
рН	5	pH 1	3	
	6	pH 2	3	
	7	pH 3	3	
	8	pH 4	3	
	9	pH 5	3	
Ulangan	1	ulangan I	5	
	2	ulangan II	5	
	3	ulangan III	5	

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.001 <sup>a</sup>	6	.000	107.689	.000
Intercept	.002	1	.002	1710.307	.000
рН	.001	4	.000	160.899	.000
Ulangan	3.347E-6	2	1.673E-6	1.269	.332
Error	1.055E-5	8	1.319E-6		
Total	.003	15			
Corrected Total	.001	14			

a. R Squared = .988 (Adjusted R Squared = .979)



# Post Hoc Tests pH

# **Multiple Comparisons**

 $\mathsf{AE}$ 

Tukey HSD

	<del>-</del>	Mean Difference			95% Confide	ence Interval
(I) pH	(J) pH	(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
pH 1	pH 2	0129633 <sup>*</sup>	.00093777	.000	0162031	0097236
	pH 3	.0019933	.00093777	.296	0012464	.0052331
	pH 4	0136667 <sup>*</sup>	.00093777	.000	0169064	0104269
	pH 5	.0035833*	.00093777	.031	.0003436	.0068231
pH 2	pH 1	.0129633*	.00093777	.000	.0097236	.0162031
	pH 3	.0149567 <sup>*</sup>	.00093777	.000	.0117169	.0181964
	pH 4	0007033	.00093777	.938	0039431	.0025364
	pH 5	.0165467 <sup>*</sup>	.00093777	.000	.0133069	.0197864
pH 3	pH 1	0019933	.00093777	.296	0052331	.0012464
	pH 2	0149567 <sup>*</sup>	.00093777	.000	0181964	0117169
	pH 4	0156600 <sup>*</sup>	.00093777	.000	0188998	0124202
	pH 5	.0015900	.00093777	.486	0016498	.0048298
pH 4	pH 1	.0136667*	.00093777	.000	.0104269	.0169064
	pH 2	.0007033	.00093777	.938	0025364	.0039431
	pH 3	.0156600 <sup>*</sup>	.00093777	.000	.0124202	.0188998
	pH 5	.0172500 <sup>*</sup>	.00093777	.000	.0140102	.0204898
pH 5	pH 1	0035833 <sup>*</sup>	.00093777	.031	0068231	0003436
	pH 2	0165467 <sup>*</sup>	.00093777	.000	0197864	0133069
	рН 3	0015900	.00093777	.486	0048298	.0016498
	pH 4	0172500 <sup>*</sup>	.00093777	.000	0204898	0140102

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1.32E-006.

 $<sup>^{\</sup>ast}.$  The mean difference is significant at the 0.05 level.

# **Homogeneous Subsets**

ΑE

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

		Subset				
рН	N	1	2	3		
pH 5	3	.0044700				
pH 3	3	.0060600	.0060600			
pH 1	3		.0080533			
pH 2	3			.0210167		
pH 4	3			.0217200		
Sig.		.486	.296	.938		

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1.32E-006.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.
- b. Alpha = 0.05.

# L.7.2. Data dan Uji Statistik Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim

Analisis Enzim						
Suhu		Ulangan	Total	rata-		
Sullu	1	2	3	TOLAT	rata	
30	0.02022	0.02037	0.02005	0.06064	0.02021	
37	0.02222	0.02208	0.02161	0.06591	0.02197	
40	0.02065	0.02051	0.02069	0.06185	0.02062	
50	0.01873	0.05704	0.01901			
	Ju	0.24544	0.08181			

UNIANOVA AE BY suhu ulangan /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /POSTHOC=suhu(TUKEY) /CRITERIA=ALPHA(0.05)

/DESIGN=suhu ulangan.

# Univariate Analysis of Variance

[DataSet1]

**Between-Subjects Factors** 

	•				
		Value Label	N		
Suhu	30	suhu 1	3		
	37	suhu 2	3		
	40	suhu 3	3		
	50	suhu 4	3		
Ulangan	1	ulangan I	4		
	2	ulangan II	4		
	3	ulangan III	4		

## **Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable:AE

Dependent variable.At					
	Type III Sum of				
Source	Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.339E-5 <sup>a</sup>	5	2.679E-6	18.563	.001
Intercept	.005	1	.005	34791.772	.000
Suhu	1.337E-5	3	4.458E-6	30.897	.000
Ulangan	1.807E-8	2	9.033E-9	.063	.940
Error	8.657E-7	6	1.443E-7		
Total	.005	12			
Corrected Total	1.426E-5	11			

a. R Squared = .939 (Adjusted R Squared = .889)

# Post Hoc Tests suhu

# **Multiple Comparisons**

ΑE

Tukey HSD

		Mean Difference			95% Confidence Interval	
(I) suhu	(J) suhu	(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
suhu 1	suhu 2	0017567 <sup>*</sup>	.00031015	.005	0028303	0006830
	suhu 3	0004033	.00031015	.595	0014770	.0006703
	suhu 4	.0012000*	.00031015	.032	.0001264	.0022736
suhu 2	suhu 1	.0017567*	.00031015	.005	.0006830	.0028303
	suhu 3	.0013533 <sup>*</sup>	.00031015	.019	.0002797	.0024270
	suhu 4	.0029567*	.00031015	.000	.0018830	.0040303
suhu 3	suhu 1	.0004033	.00031015	.595	0006703	.0014770
	suhu 2	0013533 <sup>*</sup>	.00031015	.019	0024270	0002797
	suhu 4	.0016033*	.00031015	.008	.0005297	.0026770
suhu 4	suhu 1	0012000 <sup>*</sup>	.00031015	.032	0022736	0001264
	suhu 2	0029567 <sup>*</sup>	.00031015	.000	0040303	0018830
	suhu 3	0016033 <sup>*</sup>	.00031015	.008	0026770	0005297

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1.44E-007.

# **Homogeneous Subsets**

ΑE

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

		Subset		
Suhu	N	1	2	3
suhu 4	3	.0190133		
suhu 1	3		.0202133	
suhu 3	3		.0206167	
suhu 2	3			.0219700
Sig.		1.000	.595	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1.44E-007.

 $<sup>^{\</sup>ast}.$  The mean difference is significant at the 0.05 level.

ΑE

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

		Subset		
Suhu	N	1	2	3
suhu 4	3	.0190133		
suhu 1	3		.0202133	
suhu 3	3		.0206167	
suhu 2	3			.0219700
Sig.		1.000	.595	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1.44E-007.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.
- b. Alpha = 0.05.



# L.7.3 Data dan Uji Statistik Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim

Analisis Enzim							
KS		Ulangan	Total	rata-			
K3	1	2	3	TOtal	rata		
1	0.01972	0.01873	0.01994	0.05839	0.01946		
1.5	0.02037	0.0194	0.02069	0.06046	0.02015		
2	0.02108	0.02012	0.02179	0.06299	0.02099		
2.5	0.02172	0.02158	0.023	0.0663	0.0221		
3	0.02211	0.02083	0.0225	0.06544	0.02181		
	J	0.31358	0.10451				

NEW FILE

DATASET NAME DataSet2 WINDOW=FRONT.

UNIANOVA AE BY KS ulangan

/METHOD=SSTYPE(3)

/INTERCEPT=INCLUDE

/POSTHOC=KS (TUKEY)

/CRITERIA=ALPHA(0.05)

/DESIGN=KS ulangan.

# Univariate Analysis of Variance

[DataSet2]

**Between-Subjects Factors** 

		Value Label	N
KS	1.0	KS 1	3
	1.5	KS 2	3
	2.0	KS 3	3
	2.5	KS 4	3
	3.0	KS 5	3
Ulangan	1	ulangan I	5
	2	ulangan II	5
	3	ulangan III	5

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Source	Squales	ui	Mean Square	<u>'</u>	oly.
Corrected Model	2.005E-5 <sup>a</sup>	6	3.342E-6	48.481	.000
Intercept	.007	1	.007	95094.450	.000
KS	1.471E-5	4	3.679E-6	53.363	.000
Ulangan	5.338E-6	2	2.669E-6	38.717	.000
Error	5.515E-7	8	6.894E-8		
Total	.007	15			
Corrected Total	2.060E-5	14			

a. R Squared = .973 (Adjusted R Squared = .953)



# **Post Hoc Tests**

# KS

# **Multiple Comparisons**

ΑE

Tukey HSD

	<u>-</u>	Mean Difference			95% Confidence Interval	
(I) KS	(J) KS	(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
KS 1	KS 2	0006900	.00021438	.069	0014306	.0000506
	KS 3	0015333 <sup>*</sup>	.00021438	.001	0022740	0007927
	KS 4	0026367 <sup>*</sup>	.00021438	.000	0033773	0018960
	KS 5	0023500 <sup>*</sup>	.00021438	.000	0030906	0016094
KS 2	KS 1	.0006900	.00021438	.069	0000506	.0014306
	KS 3	0008433 <sup>*</sup>	.00021438	.026	0015840	0001027
	KS 4	0019467 <sup>*</sup>	.00021438	.000	0026873	0012060
	KS 5	0016600 <sup>*</sup>	.00021438	.000	0024006	0009194
KS 3	KS 1	.0015333 <sup>*</sup>	.00021438	.001	.0007927	.0022740
	KS 2	.0008433*	.00021438	.026	.0001027	.0015840
	KS 4	0011033 <sup>*</sup>	.00021438	.006	0018440	0003627
	KS 5	0008167 <sup>*</sup>	.00021438	.031	0015573	0000760
KS 4	KS 1	.0026367 <sup>*</sup>	.00021438	.000	.0018960	.0033773
	KS 2	.0019467 <sup>*</sup>	.00021438	.000	.0012060	.0026873
	KS 3	.0011033 <sup>*</sup>	.00021438	.006	.0003627	.0018440
	KS 5	.0002867	.00021438	.679	0004540	.0010273
KS 5	KS 1	.0023500 <sup>*</sup>	.00021438	.000	.0016094	.0030906
	KS 2	.0016600 <sup>*</sup>	.00021438	.000	.0009194	.0024006
	KS 3	.0008167 <sup>*</sup>	.00021438	.031	.0000760	.0015573
	KS 4	0002867	.00021438	.679	0010273	.0004540

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 6.89E-008.

<sup>\*.</sup> The mean difference is significant at the 0.05 level.

# **Homogeneous Subsets**

ΑE

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

		Subset		
KS	N	1	2	3
KS 1	3	.0194633		
KS 2	3	.0201533		
KS 3	3		.0209967	
KS 5	3			.0218133
KS 4	3			.0221000
Sig.		.069	1.000	.679

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

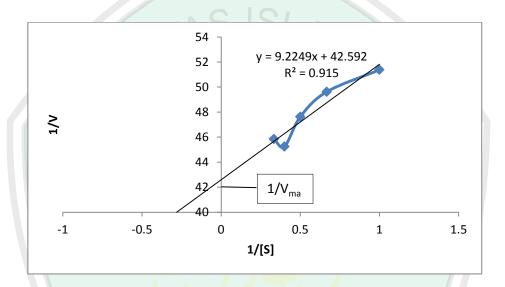
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 6.89E-008.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.
- b. Alpha = 0.05.

# Lampiran 8: Nilai $V_{maks}$ dan $K_{M}$

AE (unit/mL) KS		1/V	1/[S]	
0.01946	1	51.37525157	1	
0.02015	1.5	49.62007422	0.666666667	
0.02099	2	47.6282015	0.5	
0.02210	2.5	45.248966	0.4	
0.02181	3	45.83990858	0.333333333	



$$Y = 9,2249x + 42.592$$

$$b = \frac{1}{V_{max}}$$
 maka  $V_{max} = \frac{1}{42,592} = 0.0235$  Unit

$$a = \frac{\kappa_M}{v_{max}} \; maka \; K_M = a \; x \; V_{max}$$

$$= 9,2249 \times 0,0235$$

# Lampiran 9: Dokumentasi



Pembuatan reagen DNS



Peremajaan Bacillus circulans



Bakteri dalam CMC cair 1 % sebelum 24 jam



Bakteri dalam CMC cair 1 % sesudah 24 jam



Analisis enzim secara kuantitatif Metode DNS



Analisis enzim secara kualitatif dengan *Congo red* 



# Karakterisasi pH, Suhu dan Konsentrasi Substrat pada Enzim Selulase Kasar yang Diproduksi oleh Bacillus circulans

Olaka Dagadako karrati (4000000)

Oleh: Rosyida Irawati (10630059)

# **Latar Belakang**

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalis. Salah satu bakteri penghasilkan enzim selulase adalah Bacillus circulans yang dapat diisolasi dari tanah, air laut ataupun air rawa Enzim selulase memiliki kondisi optimum yang berbeda tergantung darimana enzim dihasilkan. Oleh karena itu, penentuan karakteristik meliputi pH, suhu dan konsentrasi substrat optimum pada enzim hasil produksi Bacillus circulans perlu dikaji lebih lanjut.

# Metodologi

# Bahan

Bakteri Bacillus circulans, media Carboxy Methyl Cellulose (CMC) agar dan Cair, Congo red 1 %,reagen Dinitrosalicylic Acid (DNS)

# Metode

- Uji Kualitatif
- Kurva Pertumbuhan Bakteri dan Aktivitas Selulase
- Karakterisasi Enzim Selulase

# Hasil

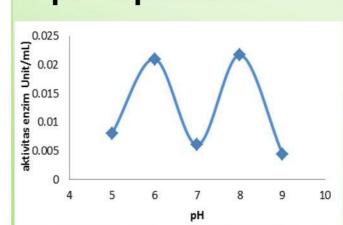
# **Uji Kualitatif**



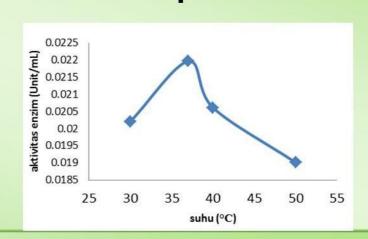
Hasil uji kualitatif memperlihatkan adanya zona bening di sekitaran biakan bakteri yang menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus circulans* mampu menghasilkan enzim selulase. Hasil uji kualitatif menghasilkan indeks selulolitik sebesar 1,43.

# Karakterisasi

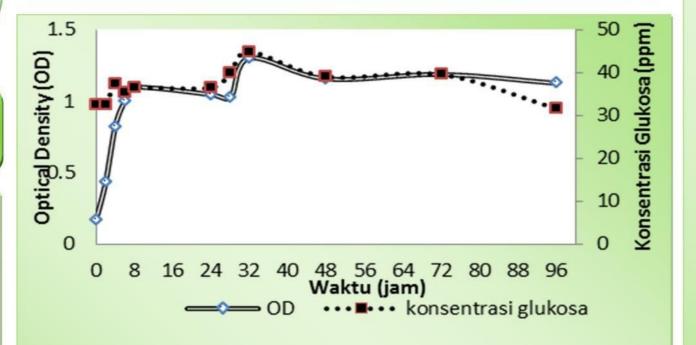
# . pH Optimum



. Suhu Optimum



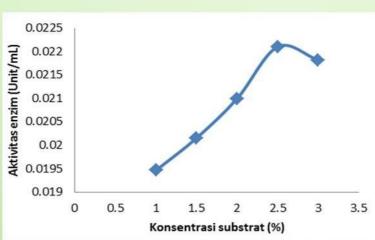
# Pertumbuhan Bakteri dan AktivitasSelulase



Pada jam 32 nilai densitas optik dan produktivitas gula reduksi dari bakteri *Bacillus circulans* 1,301 dan 44,8243 ppm. Tingkat konsentrasi gula reduksi tertinggi menunjukkan bahwa pada kondisi tersebut bakteri memproduksi banyak enzim. Sehingga, hasil tertinggi dari kurva pertumbuhan digunakan sebagai waktu panen enzim.

pH 8 dengan aktivitas enzim sebesar 2,17 x 10<sup>-2</sup> Unit/mL

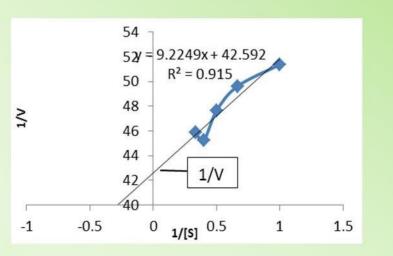
# Konsentrasi Substrat Optimum



Konsentrasi substrat 2,5 % dengan aktivitas enzim sebesar 2,21 x 10<sup>-2</sup> Unit/mL.

Suhu 37 °C dengan aktivitas enzim sebesar 2,19 x 10<sup>-2</sup> Unit/mL.

# . V<sub>maks</sub> dan K<sub>M</sub>



V<sub>maks</sub> sebesar 0,0235 Unit/mL dan K<sub>M</sub> sebesar 0,2166 %.

**Kesimpulan**: Enzim berkarakteristik pada pH 8, suhu 37 °C dan , konsentrasi substrat 2,5 % (2,17 x 10<sup>-2</sup>; 2,19 x 10<sup>-2</sup> dan 2,21 x 10<sup>-2</sup>) Unit/mLdan nilai V<sub>maks</sub> dan K<sub>M</sub> sebesar 0,0235 Unit/mL dan 0,2166 %.