



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

# **ISOLASI BAKTERI SELULOLITIK TERMOFILIK DAN PENENTUAN KONDISI OPTIMUM SELULASE Aif I RP**

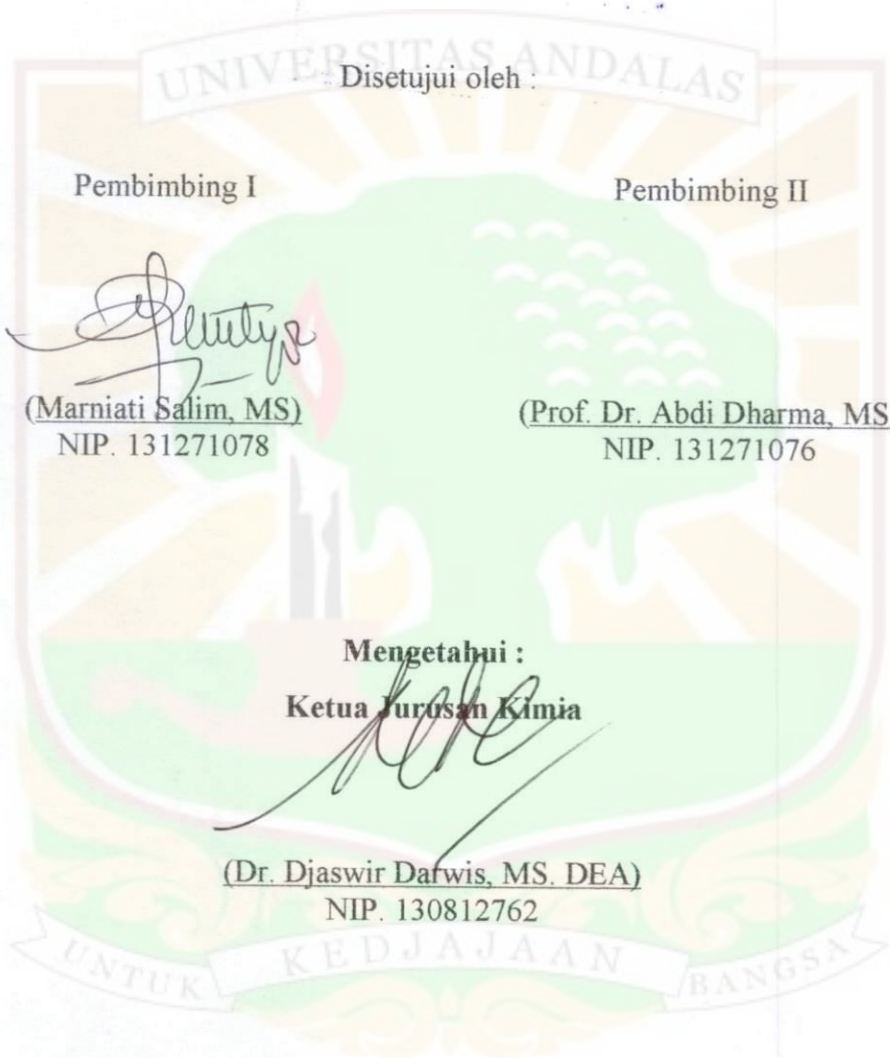
**SKRIPSI**



**DENI MULYA  
05132045**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2020**

**Isolasi Bakteri Selulolitik Termofilik dan Penentuan Kondisi Optimum Enzim Selulase Isolat *Aif I RP***, skripsi oleh Deni Mulya (05132045) sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata I) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.



## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur bagi Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan hasil penelitian ini dengan judul **"Isolasi Bakteri Selulolitik Termofilik dan Penentuan Kondisi Optimum Selulase Isolat *AlfIRP*"**

Skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Universitas Andalas Padang. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada : Kedua orang tua yang telah memberikan dorongan moril dan materil.

1. Ibu Marniati Salim, selaku pembimbing I yang telah memberikan waktu, bimbingan dan arahan dalam pelaksanaan penelitian.
2. Bapak Prof. Dr. H. Abdi Dharma, selaku pembimbing II yang telah memberikan waktu, bimbingan dan arahan selama penelitian.
3. Bapak Djaswir Darwis, M.S DEA selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas.
4. Ibu Dr. Upita Septiani selaku Koordinator Pendidikan Jurusan Kimia.
5. Ibu Prof. Dr. Sumaryati Syukur, MS selaku Kepala Laboratorium Bioteknologi.
6. Uni Fitriana Yanti, A.Md selaku Analis Laboratorium Bioteknologi.
7. *Cellulase Community*; Nur Ihsan Dwi Prasetyo, Yuliza Solta, Meffy Tessa Yosephsa dan Sherly Neldia yang telah bekerja-sama dalam melaksanakan penelitian.
8. Rekan angkatan 2005, khususnya sahabat-sahabat yang telah membantu dan memberikan dukungan selama penelitian.

Akhir kata penulis mohon maaf bila ada kesalahan dan kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu penulis menerima kritikan dan saran yang bermanfaat bagi perbaikan skripsi ini.

Padang, Januari 2010

Penulis

## ABSTRAK

### ISOLASI BAKTERI SELULOLITIK TERMOFILIK DAN PENENTUAN KONDISI OPTIMUM SELULASE ISOLAT *AIf I RP*

Oleh :

**Deni Mulya (05132045)**

Mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Andalas

Telah dilakukan penelitian tentang isolasi dan optimasi enzim selulase dari bakteri termofilik sumber air panas Rimbo Panti Pasaman. Dari 42 isolat tunggal yang tumbuh pada medium Trypton Agar, diperoleh 12 isolat yang memiliki potensi untuk menghasilkan enzim selulase. Ini terlihat dari zona bening yang dihasilkan disekitar koloni pada uji potensi dengan menggunakan medium dengan substrat CMC. Isolat *AIf I RP* merupakan isolat yang memiliki zona bening paling besar. Hasil fermentasi memperlihatkan bahwa isolat *AIf I RP* memiliki aktivitas enzim maksimum pada lama fermentasi selama 6 jam dengan nilai  $0,093 \mu\text{mol}/\text{menit}$  pada substrat CMC 2%. Kondisi optimum dilakukan dengan beberapa parameter yaitu suhu inkubasi, lama inkubasi dan konsentrasi substrat. Kondisi optimum enzim selulase yang dihasilkan oleh isolat *AIf I RP* adalah pada suhu inkubasi selama  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  dengan aktivitas enzim sebesar  $0,093 \mu\text{mol}/\text{menit}$ . Lama inkubasi maksimum adalah 55 menit dengan aktivitas enzim sebesar  $0,058 \mu\text{mol}/\text{menit}$ . Konsentrasi substrat maksimum adalah 3 % (b/v) dengan aktivitas sebesar  $0,040 \mu\text{mol}/\text{menit}$ . pH yang digunakan adalah 7,8. Nilai  $-1/K_M$  adalah  $-2,054$  sehingga nilai  $K_M$  diperoleh sebesar 0,487% dan nilai  $V_{\text{maks}}$  adalah  $0,048 \mu\text{mol}/\text{menit}$ .

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>KATA PENGANTAR</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRAK</b>	<b>ii</b>
<b>DAFTAR ISI</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR TABEL</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	<b>vii</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Enzim	4
2.1.1 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	6
2.2 Enzim Selulase	9
2.3 Fermentasi	10
2.4 Molekul Selulosa	10
2.5 Bakteri Termofilik	11
<b>BAB III. METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	13
3.2 Alat dan Bahan	13
3.2.1 Alat yang Digunakan	13
3.2.2 Bahan yang Digunakan	13
3.2.3 Persiapan Medium dan Reagen	13
3.3 Prosedur Kerja	15
3.3.1 Pengambilan Sampel	15

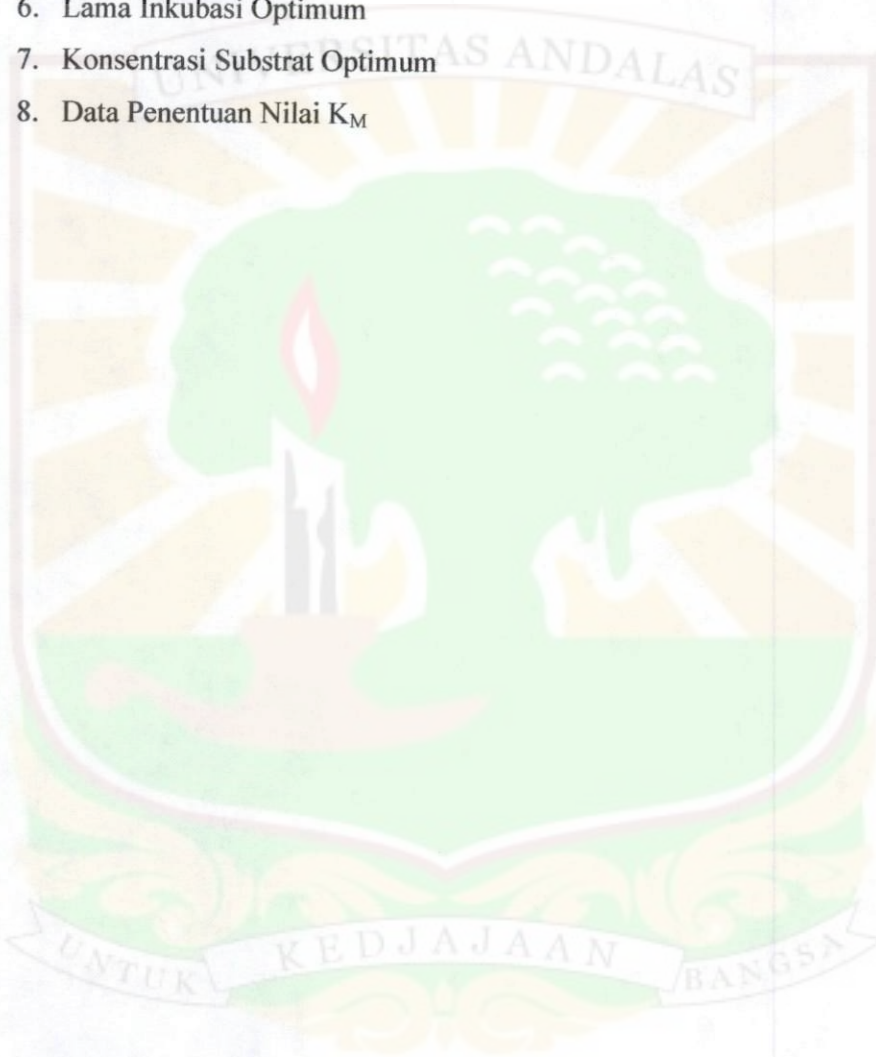
3.3.2	Penapisan Bakteri Termofilik	15
3.3.3	Uji Potensi Selulase	16
3.3.4	Fermentasi	16
3.3.5	Penentuan Aktivitas Selulase	16
3.3.6	Penentuan Kadar Glukosa	17
3.3.7	Penentuan Kondisi Optimum Enzim Selulase	17
3.3.7.1	Penentuan Suhu Inkubasi Optimum	17
3.3.7.2	Penentuan Lama Inkubasi Optimum	18
3.3.7.3	Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum	18
3.3.7.4	Penentuan Nilai Konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan $V_{maks}$	18
<b>BAB IV HASIL DAN DISKUSI</b>		
4.1	Penapisan Bakteri Termofilik	19
4.2	Potensi Selulase	19
4.3	Fermentasi	20
4.4	Aktivitas Enzim Selulase	20
4.5	Standar Glukosa	22
4.6	Kondisi Optimum Selulase	22
4.6.1	Suhu Inkubasi Optimum	22
4.6.2	Lama Inkubasi Optimum	23
4.6.3	Konsentrasi Substrat Optimum	24
4.7	Nilai Konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan $V_{maks}$	25
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>		
5.1	Kesimpulan	27
5.2	Saran	27
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>		28
<b>LAMPIRAN</b>		30

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Reaksi enzim dan substrat	5
2. Diagram energi reaksi kimia, dengan enzim (katalis) dan tanpa enzim	6
3. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim	7
4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim	8
5. Struktur selulosa	10
6. Potensi isolat <i>Aif IRP</i>	20
7. Kurva aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh isolat <i>Aif IRP</i> pada medium cair	21
8. Kurva pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase	23
9. Kurva pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase	24
10. Kurva Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Selulase	25
11. Kurva Lineweaver-Burk. Hubungan $1/\text{substrat}$ dengan $1/\text{aktivitas}$	26
12. Lokasi Pengambilan Sampel	32
13. Titik Pengambilan Sampel	32
14. Cara Pengambilan Sampel	33
15. Isolat <i>Aif IRP</i>	33

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Penapisan dan Penamaan Isolat	30
2. Lama fermentasi pada Substrat CMC	34
3. Lama fermentasi pada Substrat bekatul	35
4. Data Kurva Kalibrasi Standar Glukosa	36
5. Suhu Inkubasi Optimum	38
6. Lama Inkubasi Optimum	38
7. Konsentrasi Substrat Optimum	39
8. Data Penentuan Nilai $K_M$	41





## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Penapisan Bakteri Termofilik	30
2. Gambar tempat pengambilan sampel dan gambar isolat	32
3. Lama fermentasi optimum	34
4. Kalibrasi Standar Glukosa	36
5. Kondisi Optimum Enzim Selulase	38
6. Contoh Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase Kasar	40
7. Penentuan Nilai $K_M$ dan $V_{maks}$	41



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Dewasa ini industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri. Kesadaran masyarakat terhadap masalah lingkungan yang semakin tinggi serta adanya tekanan dari para ahli dan pecinta lingkungan menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri<sup>1</sup>. Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi tinggi, bersifat spesifik, dan tidak beracun<sup>2</sup>. Dunia industri sebagian besar prosesnya berlangsung dalam suhu tinggi. Untuk itu dituntut enzim yang digunakan adalah enzim yang tahan terhadap panas yang tinggi. Enzim ini biasanya dapat dihasilkan dari mikroorganisme termofil.

Mikroorganisme termofil dapat diisolasi dari berbagai sumber ; sumber air panas di darat dan di laut, tanah yang selalu terkena sinar matahari, bahan yang mengalami fermentasi seperti kompos, dan instalansi air panas<sup>3</sup>. Indonesia merupakan negara kepulauan yang banyak terdapat sumber air panas. Di Sumatera Barat sendiri banyak ditemukan sumber air panas yang tersebar di berbagai daerah seperti di Batu Sangkar, Koto Baru Agam, Sumani, Muara Labuh, Aie Angek Sijunjung, Koto Baru Solok dan Rimbo Panti Pasaman yang kesemuanya itu merupakan habitat mikroorganisme termofil yang dapat digunakan sebagai penghasil termoenzim, khususnya selulase<sup>4</sup>.

Selulase merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang luas. Industri pengguna selulase diantaranya adalah industri makanan, industri kertas dan lain-lain. Selulase termostabil merupakan jenis selulase yang paling banyak digunakan dalam industri karena enzim ini mampu digunakan pada suhu yang tinggi. Karena penggunaannya yang luas, selulase banyak di perdagangkan di dunia. Nilai perdagangan enzim dunia mencapai 3-4 miliar dolar per tahun, 4-5 juta dolar di antaranya dari pasar

Indonesia yang keseluruhannya diimpor dari negara-negara produsen enzim. Pasar yang luas dan sumber daya alam yang mendukung merupakan peluang berharga bagi pengembangan industri enzim di Indonesia<sup>5</sup>.

Mikroorganisme adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Sebagai sumber enzim, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim. Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Oleh karena itu, penggalian mikroorganisme indigenous penghasil selulase perlu dilakukan di Indonesia. Keragaman hayati yang tinggi memberikan peluang yang besar untuk mendapatkan mikroorganisme yang potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim<sup>5</sup>.

## **1.2 Perumusan masalah**

Banyak ditemukan sumber air panas di daerah Sumatera Barat, namun penggunaannya baru terbatas pada sektor wisata. Untuk itu perlu dikembangkan penggunaannya untuk bioteknologi. Dalam penelitian ini akan dibahas tentang :

1. Apakah terdapat bakteri termofilik penghasil enzim selulase dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman.
2. Bagaimanakah aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman.
3. Bagaimana kondisi optimum dari enzim selulase yang dihasilkan.

## **1.3 Tujuan Penelitian**

1. Mengisolasi bakteri termofil penghasil enzim selulase dari sumber air Panas Rimbo Panti Pasaman.
2. Menguji aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik yang didapatkan.
3. Menentukan kondisi optimum dari enzim yang didapatkan.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Dengan adanya penelitian ini, diharapkan semakin meningkatnya penggunaan sumber air panas untuk keperluan penelitian dan bioteknologi. Dengan meningkatnya penggunaan sumber air panas untuk bioteknologi, diharapkan Indonesia dapat memproduksi enzim secara besar-besaran dan sektor industri semakin banyak menggunakan enzim untuk proses produksinya yang ramah lingkungan menggantikan proses kimiawi yang berdampak buruk terhadap lingkungan.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2. 1. Enzim

Enzim adalah biokatalis yang dihasilkan oleh sel. Enzim sangat penting dalam kehidupan, karena semua reaksi metabolisme dikatalis oleh enzim. Jika tidak ada enzim, atau aktivitas enzim terganggu maka reaksi metabolisme sel akan terhambat hingga pertumbuhan sel juga terganggu<sup>6,7</sup>.

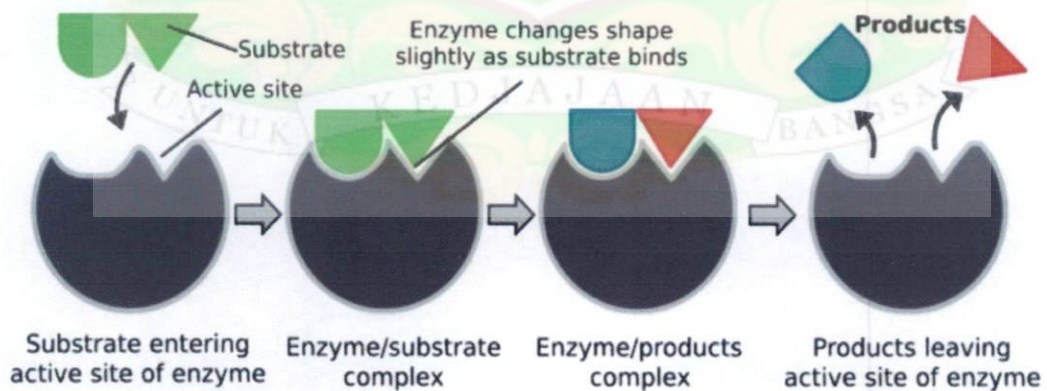
Klasifikasi enzim secara internasional dibagi dalam enam kelompok utama yaitu :

- a. Oksireduktase yaitu enzim yang mengkatalisis berbagai macam reaksi oksidasi-reduksi serta sering mempergunakan koenzim seperti NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FAD, atau lipoat sebagai akseptor hidrogen. Enzim yang termasuk golongan ini adalah dehidrogenase, oksidase, peroksidase dan reduktase.
- b. Transferase yaitu enzim yang mengkatalisis berbagai jenis transfer kelompok. Dalam metabolisme banyak langkah-langkah penting yang memerlukan transfer dari satu molekul lain dari kelompok amino, karboksil, metil, asil, glikosil, atau fosforil. Enzim yang termasuk golongan ini adalah aminotransferase, karnitin asil transferase, dan transkarboksilase.
- c. Hidrolase yaitu enzim yang mengkatalisis pembelahan ikatan antara karbon dan beberapa atom lain dengan adanya penambahan air. Enzim yang termasuk golongan ini adalah esterase, peptidase, amilase, fosfatase, urease, selulase, pepsin, tripsin dan kimotripsin.
- d. Liase yaitu enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan karbon-karbon, karbon-sulfur, dan karbon-nitrogen tertentu (tidak termasuk peptida). Enzim yang termasuk golongan ini adalah dekarboksilase, aldolase, sitrat liase dan dehidratase.
- e. Isomerase yaitu enzim yang mengkatalisis rasemase isomer optik dan geometrik dan reaksi oksidasi-reduksi intra molekular tertentu. Enzim yang termasuk golongan ini adalah epimerase, rasemase dan mutase.

- f. Ligase yaitu enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan antara karbon dan oksigen, sulfur, nitrogen dan atom-atom lain. Energi yang diperlukan untuk pembentukan ikatan sering didapatkan dari hidrolisis ATP. Enzim yang termasuk golongan ini adalah sintetase dan karboksilase<sup>8,9</sup>.

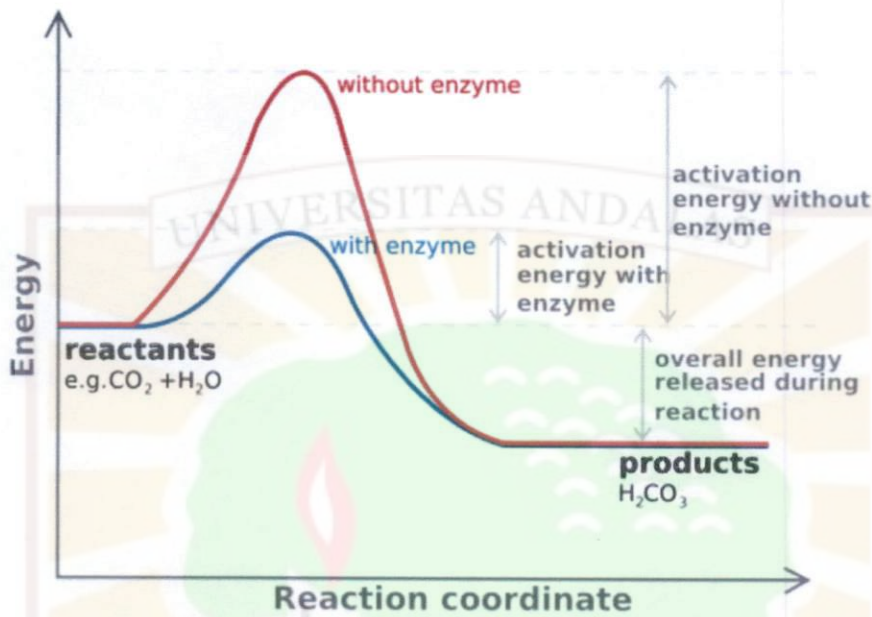
Enzim juga dapat dibedakan menjadi eksoenzim dan endoenzim berdasarkan tempat kerjanya. Eksoenzim ialah enzim yang aktivitasnya diluar sel. Endoenzim ialah enzim yang aktivitasnya didalam sel. Selain eksoenzim dan endoenzim, dikenal juga enzim konstitutif dan enzim induktif. Enzim konstitutif ialah enzim yang dibentuk terus-menerus oleh sel tanpa peduli apakah substratnya ada atau tidak. Enzim induktif (enzim adaptif) ialah enzim yang dibentuk karena adanya rangsangan substrat atau senyawa tertentu yang lain<sup>6,7</sup>.

Molekul yang membuat enzim bekerja disebut sebagai substrat. Rata-rata sel bakteri memiliki ribuan enzim, yang masing-masing enzim mengkatalis reaksi kimia khusus. Interaksi antara enzim dan substrat sangatlah khusus. Substrat terikat dengan enzim pada tempat yang disebut tempat aktif untuk membentuk kompleks enzim-substrat yang bersifat sementara dan menghasilkan energi aktivasi yang rendah untuk keperluan jalannya reaksi. Setelah periode aktif telah tercapai, kompleks enzim substrat terpisah menjadi produk dan enzim. Enzim tidak berubah selama reaksi berlangsung dan diakhir reaksi dapat bereaksi kembali dengan substrat lainnya.



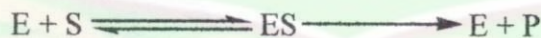
**Gambar 1.** Reaksi enzim dan substrat

Sebagai katalis, enzim tidak mengubah posisi kesetimbangan reaksi kimia. Biasanya reaksi akan berjalan ke arah yang sama dengan reaksi tanpa katalis. Perbedaannya adalah, reaksi enzimatik berjalan lebih cepat.



**Gambar 2.** Diagram energi reaksi kimia, dengan enzim (katalis) dan tanpa enzim

Enzim mempercepat jalannya suatu reaksi dengan menurunkan energi aktivasinya yaitu energi yang dibutuhkan untuk mengaktifkan reaktan sehingga menghasilkan produk. Mekanisme katalitik dari enzim dijelaskan menurut reaksi :



Dimana E adalah enzim, S: substrat, ES: kompleks antara enzim dengan substrat dan P adalah produk<sup>10</sup>.

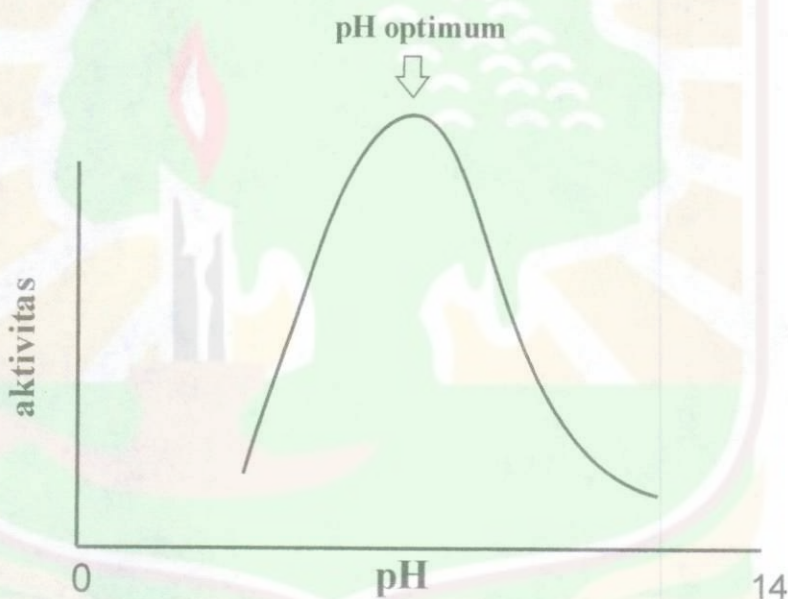
### 2.1.1 Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungannya. Laju katalisis enzim dapat dipengaruhi dengan mencolok bahkan hanya dengan perubahan-perubahan kecil dalam lingkungan kimianya dan di dalam batasan fisiologisnya,

dan perubahan-perubahan ini jelas berperan dalam pengontrolan dan pengaturan sistem enzim yang saling berhubungan yang diperlukan untuk sel-sel kehidupan. Faktor-faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim tersebut adalah pH, suhu, konsentrasi substrat, aktivator dan inhibitor<sup>11</sup>.

### 1. Pengaruh pH

Aktivitas enzim sangat berpengaruh terhadap pH. Enzim akan terdenaturasi jika pH terlalu ekstrim. pH optimal yang diperlihatkan oleh enzim-enzim berbeda-beda, contohnya pepsin yang ada dalam lingkungan asam dalam lambung, mempunyai pH optimum kurang lebih 1.5, sedangkan arginase, suatu enzim yang memecah asam amino arginin, optimum pada pH 9.7. Kebanyakan enzim mempunyai pH optimal antara pH 4 dan pH 8<sup>8</sup>.



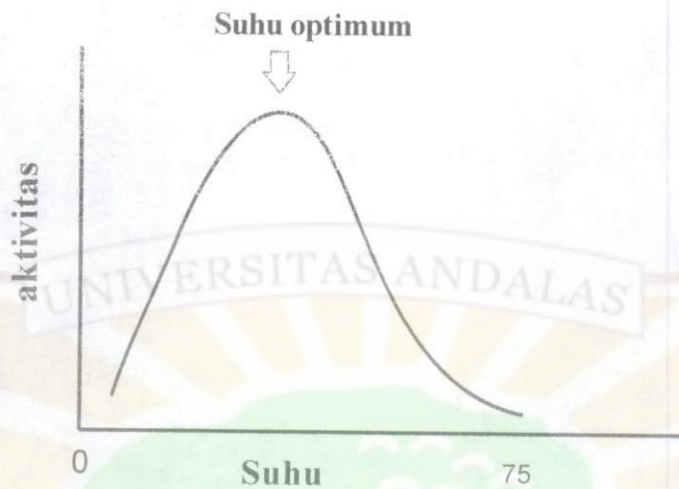
Gambar 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

### 2. Pengaruh suhu

Suhu memberikan pengaruh yang cukup besar dalam aktivitas enzim. Apabila enzim dipanaskan pada suhu lebih kurang diatas 50 °C kebanyakan tetapi tidak semua enzim akan mengalami perubahan strukturnya sehingga enzim terdenaturasi. Enzim akan bekerja secara maksimal pada suhu optimumnya. Jika



suhu diturunkan atau dinaikkan maka aktivitas enzim akan menurun secara signifikan<sup>8</sup>.



**Gambar 4.** Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

### **3. Pengaruh konsentrasi substrat**

Kecepatan reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Semakin tinggi konsentrasi substrat maka aktivitas enzim juga akan meningkat. Kenaikan ini hanya berlangsung sampai konsentrasi tertentu yang dinamakan konsentrasi optimum. Jika melewati batas optimum maka sisi aktif dari enzim akan dipenuhi oleh substrat yang ada sehingga enzim mengalami kejenuhan dan aktivitasnya menjadi menurun<sup>11</sup>.

### **4. Pengaruh aktivator**

Sebagian besar enzim membutuhkan komponen lain selain protein untuk menjalankan fungsinya. Komponen lain yang dibutuhkan enzim ini disebut dengan aktivator. Aktivator dapat mengaktifkan enzim-enzim yang belum aktif. Aktivator dapat berupa vitamin, ion-ion, koenzim dan gugus prostetik.

## 5. Pengaruh inhibitor

Inhibitor adalah senyawa yang dapat menghambat kerja enzim. Inhibitor ini antara lain adalah inhibitor kompetitif, non kompetitif, dan unkompetitif.

### 2. 2. Enzim Selulase

Selulase adalah enzim yang menguraikan selulosa (suatu polisakarida) menjadi glukosa. Enzim selulase ini termasuk ke dalam hidrolase karena dalam menghidrolisis substrat membutuhkan molekul air<sup>8</sup>. Dalam proses hidrolisis, enzim ini bekerja secara sinergis dengan enzim selulase lainnya. Secara umum, enzim selulase kompleks terdiri dari endo-  $\beta$ -1,4 glukonase, ekso-  $\beta$ -1,4 glukonase (selobiohidrolase) dan  $\beta$ -glukosidase<sup>12</sup>. Endo -  $\beta$ -1,4 glukonase dikenal dengan nama enzim CMC -ase karena enzim ini sangat aktif memutuskan turunan selulosa dapat larut (selulosa amort) seperti *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC) enzim ini menyerang secara acak, tidak menyerang selubiosa. Selobiohidrolase menyerang bagian kristalin dari selulosa tetapi tidak menyerang bagian amorf selulosa serta tidak menghidrolisis selubiosa<sup>13</sup>.

$\beta$ -glukosidase menghidrolisis selubiosa dan rantai pendek oligosakarida dan menghasilkan glukosa. Selulase lengkap yang digunakan untuk mengukur aktivitas campuran enzim menghidrolisis bahan yang mengandung selulosa dan menghasilkan glukosa sebagai produk akhir. Aktivitas selulase lengkap menggambarkan pengaruh sinergis antara enzim yang berbeda dan pengaruh hambatan dari produk akhir. Masing-masing dari ketiga enzim ini mempunyai karakteristik berbeda, demikian juga jumlahnya. Perbedaan sumber substrat akan menghasilkan jumlah atau bentuk masing-masing enzim yang berbeda<sup>13</sup>.

Mekanisme hidrolisis selulosa oleh selulase secara enzimatis terbagi menjadi dua tahap yaitu tahap aktivasi dan hidrolisis. Endoglukanase menyerang bagian amorf serat selulosa dan membuka jalan bagi kerja enzim selobiohidrolase. Kedua enzim ini bekerja sama membebaskan selubiosa dari serat selulosa. Baik endoglukanase maupun selobiohidrolase tidak mampu memecah selubiosa.

sehingga diperlukan enzim lain yaitu  $\beta$ -glukosidase yang menguraikan selubiosa menjadi glukosa. Selulosa alamiah sangat tahan terhadap hidrolisis enzimatis karena adanya struktural kristal dan lapisan lignin yang menyebabkan selulosa tahan terhadap serangan selulase<sup>14</sup>.

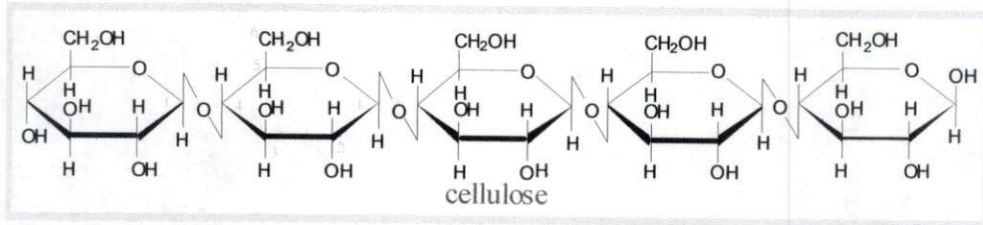
### **2.3 Fermentasi**

Fermentasi berasal dari kata latin yaitu *fervere* yang berarti mendidih. Selama fermentasi dihasilkan  $\text{CO}_2$  sehingga kondisinya menjadi anaerob. Definisi fermentasi ini diperluas yaitu reaksi oksidasi reduksi menggunakan sumber energi dan sumber karbon, nitrogen, dan lain-lain untuk membentuk senyawa yang mempunyai nilai ekonomi lebih tinggi serta terakumulasi dalam medium.

Produk fermentasi dapat digolongkan menjadi 4 jenis : produk biomassa, produk enzim, produk metabolit, produk transformasi. Fermentasi untuk menghasilkan produk berupa enzim, dilakukan dengan menumbuhkan mikroorganisme penghasil enzim kedalam medium. Medium yang digunakan mengandung semua nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme. Medium fermentasi dapat berupa medium padat dan medium cair. Medium cair lebih sering digunakan dalam fermentasi karena kondisinya mudah diatur, dan enzim dapat dihasilkan lebih cepat<sup>12</sup>.

### **2.4 Molekul Selulosa**

Selulosa adalah polimer glukosa yang dihubungkan dengan ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik. Selulosa merupakan komponen utama penyusun dari dinding sel tumbuhan yang menyebabkan dinding sel menjadi kaku. Selulosa mempunyai struktur kristalin dan amorf. Untuk menghidrolisis selulosa diperlukan enzim yang kompleks seperti selulase. Selulase kompleks mengandung dari endo-  $\beta$ -1,4 glukanase, selobiohidrolase dan  $\beta$ -glukosidase. Ketiga enzim ini akan bekerja sama menghidrolisis selulosa menjadi glukosa<sup>11</sup>.



**Gambar 5.** Struktur selulosa

Satu molekul selulosa tersusun dari 3000-10000 residu glukosa dengan rantai lurus.

## 2. 5. Bakteri Termofilik

Mikroorganisme termasuk bakteri mempunyai kemampuan adaptasi yang lebih baik terhadap lingkungannya dibandingkan dengan organisme multiseluler, sehingga mikroorganisme mampu hidup dan dapat ditemukan pada tempat-tempat ekstrim seperti suhu, salinitas dan pH yang relatif lebih tinggi atau lebih rendah dimana organisme lain tidak mampu bertahan di lingkungan tersebut. Mikroorganisme yang mampu hidup pada lingkungan yang ekstrim tersebut dinamakan mikroorganisme ekstrimofil dan enzim yang dihasilkannya dinamakan ekstrimoenzim. Bakteri termofil didefinisikan sebagai bakteri yang hidup pada suhu di atas 45 °C. Dari titik pandang terapan atau bioteknologi, bakteri termofil merupakan sumber enzim-enzim yang unik dengan sifat yang luar biasa, khususnya ketahanannya terhadap suhu tinggi. Contoh penerapan enzim termostabil adalah sebagai agen aktif dalam fermentasi bersuhu tinggi, proses pengolahan limbah dan proses pelarutan mineral<sup>15</sup>.

Berdasarkan suhu pertumbuhannya, bakteri termofil dapat dibedakan menjadi empat kelompok, yaitu :

- a. Bakteri termofil fakultatif dengan suhu pertumbuhan maksimum berkisar pada 50-65 °C, tapi bakteri ini masih dapat tumbuh pada suhu kecil dari 30 °C.
- b. Bakteri termofil obligat, dengan suhu pertumbuhan optimum berkisar pada 65-70 °C, dan tidak dapat hidup pada suhu kecil dari 40 °C.

- c. Bakteri termofil ekstrim, dengan suhu pertumbuhan maksimum besar dari  $70^{\circ}\text{C}$ , suhu pertumbuhan optimum besar dari  $65^{\circ}\text{C}$  dan suhu pertumbuhan minimum besar dari  $40^{\circ}\text{C}$ .
- d. Bakteri hiper termofil, dengan suhu pertumbuhan optimum berkisar antara  $80\text{-}110^{\circ}\text{C}$  dengan suhu minimum  $55^{\circ}\text{C}$ .

Selain sebagai sumber enzim termostabil, ada beberapa kelebihan lain penggunaan bakteri termofil dalam bioteknologi, diantaranya ; dapat menghasilkan berbagai senyawa kimia dalam jumlah relatif banyak dan waktu yang relatif singkat, menurunkan resiko kontaminasi, menekan biaya pendinginan dalam sistem produksi, menurunkan viskositas medium pertumbuhan, dan meningkatkan kelarutan berbagai molekul organik maupun anorganik<sup>16</sup>.



## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas yang dimulai pada bulan Februari sampai dengan Desember 2009.

#### 3.2. Alat dan Bahan

##### 3.2.1. Alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spectronic 20, pH meter, neraca, *incase* (ruang steril), *autoclave*, *centrifuge*, *orbital shaker*, termometer, *magnetic stirrer hot plate*, inkubator, dan peralatan gelas laboratorium.

##### 3.2.2. Bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel berupa air panas dari Sumber Air Panas Rimbo Panti, Medium Trypton pH 8,  $\text{CaCO}_3$ , Vitamin, Mineral, Medium cair fermentasi, Medium Reese-Mendels, Reagen Pospomolibdat, Reagen Nelson, Larutan Induk Glukosa 1000  $\mu\text{g/mL}$ , Buffer Pospat, Substrat CMC dan Bekatul, dan Congo Red 0,1 % (b/v) .

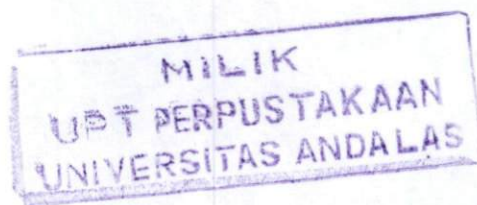
##### 3.2.3. Persiapan medium dan reagen

###### 1. Vitamin

Terdiri dari pirodoksin 0,01 g, asam nikotinat 0,05 g, tiamin 0,05 g, biotin 0,02 g, dilarutkan dalam 100 mL akuades.

###### 2. Mineral

Terdiri dari  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,3 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,05 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 g,  $\text{CoCl}_2$  0,01 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0,01 g dilarutkan dalam akuades 100 mL.



3. Medium Trypton pH 8.

Komposisi dari medium seleksi untuk bakteri termofilik adalah sebagai berikut, untuk volume 1 L; trypton 2 g, ekstrak khamir (yeast) 1 g,  $\text{CaCl}_2$  10 g, gelrite gelatin gum 5 g, bacto agar 15 g, NaCl 0,5 g, vitamin 1 % (v/v), dan mineral 1 % (v/v).

4. Medium cair fermentasi.

Terdiri dari 16 g pepton, 10 g ekstrak khamir (yeast), dan 5 g NaCl dilarutkan dengan akuades hingga volume 1 L.

5. Medium Mendels and Reese

Kandungan dari medium ini adalah untuk volume 1 L; ammonium sulfat 1,4 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g, urea 0,3 g,  $\text{CaCl}_2$  0,3 g, NaCl 0,1 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,7 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1,4 mg,  $\text{CoCl}_2$  2 mg, CMC 1,25 g, malt 3,75 g, bacto agar 15 g.

6. Reagen Pospomolibdat

Dilarutkan 70 g asam molybdat dengan 10 g Na-Tungstat dalam 700 mL NaOH 5 % (b/v). Selanjutnya dididihkan 40 menit untuk menghilangkan amoniak di dalam asam molibdat. Kemudian didinginkan dan ditambahkan 250 mL asam pospat 85 %. Reagen diencerkan hingga 1 L dengan akuades.

7. Reagen Nelson

Nelson A : Dilarutkan 12,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 10 g  $\text{NaHCO}_3$ , 12,5 g K-Na Tartarat, dan 100 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dalam 500 mL akuades.

Nelson B : Sebanyak 7,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam 50 mL akuades. Kemudian ditambahkan 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat.

Reagen Nelson dibuat dari 25 mL Nelson A ditambahkan 1 mL Nelson B dan diencerkan sampai volume 100 mL. Reagen Nelson digunakan dalam keadaan segar.

8. Larutan induk glukosa 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Larutan induk dibuat dengan melarutkan 1 g glukosa dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 1000 mL.

9. Buffer Pospat

Larutan A : Dilarutkan 2,78 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dalam labu ukur 100 mL.

Larutan B : Dilarutkan 5,365 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dalam labu ukur 100 mL.

Buffer Pospat dibuat dari 8,5 mL larutan A ditambahkan 91,5 mL larutan B. Kemudian campuran dilarutkan menjadi 200 mL.

10. Congo red 0,1 % (b/v)

Ditimbang 0,1 g congo red dilarutkan dengan alkohol 96 % dalam labu ukur 100 mL.

### 3.3. Prosedur Kerja

#### 3.3.1. Pengambilan Sampel

Bakteri termofilik diisolasi dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman Timur, Sumatera Barat. Pengambilan sampel dilakukan pada 4 lokasi, yaitu Lokasi 1 (pusat air mendidih sumber 1), Lokasi 2 (1 M dari Lokasi 1), Lokasi 3 (2 M dari Lokasi 1), dan Lokasi 4 (pusat air mendidih sumber 2). Untuk menjaga temperatur sampel air, sampel disimpan dalam termos untuk menghindari temperatur sampel turun secara drastis. Tempat pengambilan sampel dan teknik pengambilan sampel terdapat pada lampiran 2.

#### 3.3.2. Penapisan Bakteri Termofilik

Penapisan bakteri termofilik dari sampel air panas dilakukan dengan menggunakan medium seleksi bakteri termofilik, yaitu medium trypton pH 8. Medium diatur sampai pH = 8 dengan menambahkan  $\text{CaCO}_3$ . Sterilisasi medium dan alat-alat gelas menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi. Sebanyak 3 mL sampel air dituang ke dalam petridis dan kemudian dituangkan medium ke dalamnya. Petridis yang berisi medium dan sampel diinkubasi pada suhu di atas 50 °C selama 5 hari. Setiap koloni yang tumbuh dipisahkan dan ditumbuhkan pada medium seleksi yang baru untuk mendapatkan koloni tunggal pada setiap petridis. Pemisahan terus dilakukan sampai dihasilkan koloni tunggal pada masing-masing petridis.



### 3.3.3. Uji Potensi Selulase

Uji potensi selulase terhadap isolat-isolat tunggal hasil isolasi menggunakan medium yang mengandung CMC menggunakan *paper disc*. Aktivitas enzim ditunjukkan dengan kemampuan selulase mendegradasi CMC menjadi gula reduksi dan dapat diamati dengan terbentuknya halo (zona bening) dengan pewarnaan menggunakan Congo red. Isolat diinokulasikan ke medium yang mengandung CMC. Kemudian diinkubasi pada suhu 50 °C selama 1 minggu. Setelah itu, *paper disc* diangkat dari permukaan medium dan ditetesi permukaan medium dengan Congo red sampai semua permukaannya dibasahi Congo red 1 % (b/v). Dibiarkan selama 5 menit dan kemudian dilunturi dengan NaCl 1 M, maka akan terlihat halo pada daerah *paper disc*. Diukur diameter halo dan dibandingkan antara semua isolat.

### 3.3.4. Fermentasi

Medium fermentasi steril (medium cair) dibagi ke dalam 10 erlenmeyer masing-masing 100 mL. Selanjutnya ditambahkan suspensi isolat sebanyak 1 mL ke masing-masing erlenmeyer, tutup mulut erlenmeyer dengan kertas afo. Dilakukan *shaker* pada 100 rpm dengan variasi waktu fermentasi 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, dan 18 jam pada suhu 60 °C. Setiap 2 jam diambil satu erlenmeyer, disentrifugasi selama 10 menit. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk penentuan aktivitas enzim selulase.

### 3.3.5. Penentuan Aktivitas Enzim Selulase

Aktivitas selulase ditentukan dengan menggunakan metode Somogy-Nelson. Substrat yang digunakan adalah CMC dengan konsentrasi 2 % (b/v) dalam buffer asam pospat pH 7,8. Standar yang digunakan adalah glukosa.

Sebanyak 1 mL substrat ditambahkan 1 mL cairan kultur yang mengandung enzim selulase dan diinkubasi selama 50 menit pada suhu 50 °C. Kemudian dicelupkan pada air mendidih selama 5 menit untuk menghentikan aktivitas enzim. Selanjutnya campuran didinginkan hingga suhu kamar. Pada

campuran ini ditambahkan 1 mL reagen Nelson dan dipanaskan kembali dalam *water bath* selama 20 menit, kemudian didinginkan hingga mencapai suhu kamar. Setelah dingin, ditambahkan reagen pospomolibdat diaduk hingga homogen. Dengan segera ditambahkan akuades sebanyak 7 mL, dikocok dan didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 540 nm. Sebagai blanko digunakan akuades yang diberi perlakuan yang sama dengan sampel.

### **3.3.6. Penentuan Kadar Glukosa**

Kadar glukosa atau kadar gula reduksi ditentukan berdasarkan metode Somogy-Nelson dengan menggunakan larutan standar glukosa. Dari larutan induk glukosa dibuat deretan larutan standard dengan konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, dan 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Dipipet masing-masing 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL reagen Nelson, dipanaskan pada *water bath* selama 20 menit. Kemudian didinginkan sampai mencapai suhu kamar. Pada larutan ditambahkan 1 mL pospomolibdat, dikocok dan ditambahkan akuades sebanyak 7 mL. Larutan didiamkan selama 10 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang 540 nm. Untuk blanko digunakan akuades yang diberi perlakuan yang sama dengan larutan standar.

### **3.3.7. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Selulase**

Penentuan kondisi optimum ini meliputi beberapa parameter, yaitu suhu inkubasi, lama inkubasi, dan konsentrasi substrat.

#### **3.3.7.1. Penentuan Suhu Inkubasi Optimum**

Sebanyak 1 mL substrat CMC 2 % (b/v) dalam buffer pospat pH 7,8 ditambahkan 1 mL larutan enzim, kemudian diinkubasi selama 50 menit dengan variasi suhu 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60 °C. Setelah diinkubasi, dilakukan pengukuran aktivitas dengan metode Somogy-Nelson.

### **3.3.7.2. Penentuan Lama Inkubasi Optimum**

Sebanyak 1 mL substrat CMC 2 % (b/v) dalam buffer pospat pH 7,8, ditambahkan 1 mL larutan enzim. Kemudian diinkubasi pada suhu optimum dengan variasi lama inkubasi 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60 menit. Setelah diinkubasi, dilakukan pengukuran aktivitas dengan metode Somogy-Nelson.

### **3.3.7.3. Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum**

Sebanyak 8 buah tabung reaksi masing-masingnya dimasukkan 1 mL substrat CMC dengan variasi konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; dan 4,0 % (b/v) dalam buffer pospat pH 7,8. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan enzim dan diinkubasi pada suhu dan lama inkubasi optimum. Setelah diinkubasi, dilakukan pengukuran aktivitas dengan metode Somogy-Nelson.

### **3.3.8. Penentuan Nilai Konstanta Michelis-Menten ( $K_M$ ) dan $V_{maks}$**

Nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$  ditentukan melalui uji aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dengan substrat CMC pada pH, suhu, dan waktu inkubasi maksimum yang diperoleh pada penentuan kondisi optimum. Variasi konsentrasi substrat adalah 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; dan 4,0 % (b/v). Penentuan nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$  ini dilakukan berdasarkan grafik Lineweaver-Burk.

## BAB IV

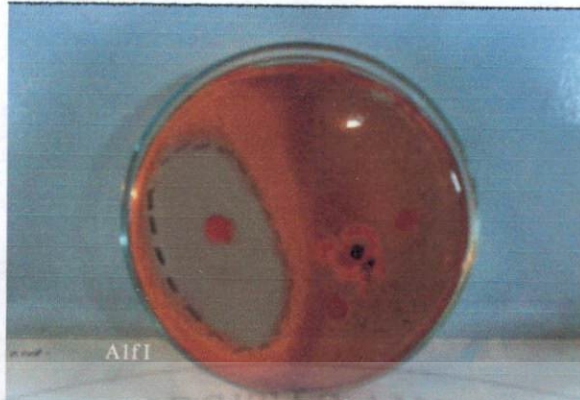
### HASIL DAN DISKUSI

#### 4.1. Penapisan Bakteri Termofilik

Penapisan isolat bakteri termofilik dilakukan pada medium trypton. Kemudian diinkubasi selama satu minggu pada suhu  $\pm 50$  °C. Setelah penanaman selama 1 minggu akan memperlihatkan permukaan yang berwarna putih yang merupakan koloni-koloni bakteri termofilik. Hal ini menunjukkan bahwa sumber air panas Rimbo Panti Pasaman yang memiliki suhu 90°C masih bisa menjadi habitat bagi mikroorganisme yang dapat digunakan dalam memproduksi enzim termostabil. Selanjutnya koloni yang tumbuh pada medium di pindahkan ke dalam medium baru (penapisan) sampai di dapatkan koloni tunggal. Hasil dari penapisan dan penamaan dari isolat dapat dilihat pada Lampiran 1. Isolat *A1f I RP* merupakan isolat yang berasal dari sumber I (pusat) dengan penapisan yang keempat (Lampiran 2).

#### 4.2. Potensi Selulase

Pengujian potensi selulase dilakukan dengan menggunakan medium yang mengandung CMC. Potensi selulase ditunjukkan dengan aktivitas degradasi CMC. Hal ini dapat diamati dengan terbentuknya halo (zona bening) saat dilakukan pewarnaan dengan congo red. Terbentuknya halo diakibatkan karena enzim ekstraseluler selulase mendegradasi CMC yang terdapat dalam medium menjadi glukosa. Untuk memperjelas zona bening yang dihasilkan dari degradasi enzim ini, maka digunakan pewarna yaitu Congo Red dengan konsentrasi 0,1 % (b/v). Dari hasil uji potensi ini diperoleh dua belas isolat yang memiliki potensi dalam menghasilkan enzim selulase. Dari semua isolat, yang memiliki halo yang paling besar atau potensi yang paling besar adalah isolat *A1f I RP* (Gambar 6) yang merupakan isolat yang di ambil dari pusat semburan sumber pertama. Karena alasan inilah peneliti mengambil isolat *A1f I RP* untuk diuji lebih lanjut mengenai aktivitas enzim yang dihasilkannya.



**Gambar 6.** Potensi isolat *AIFI RP*

#### **4.3. Fermentasi**

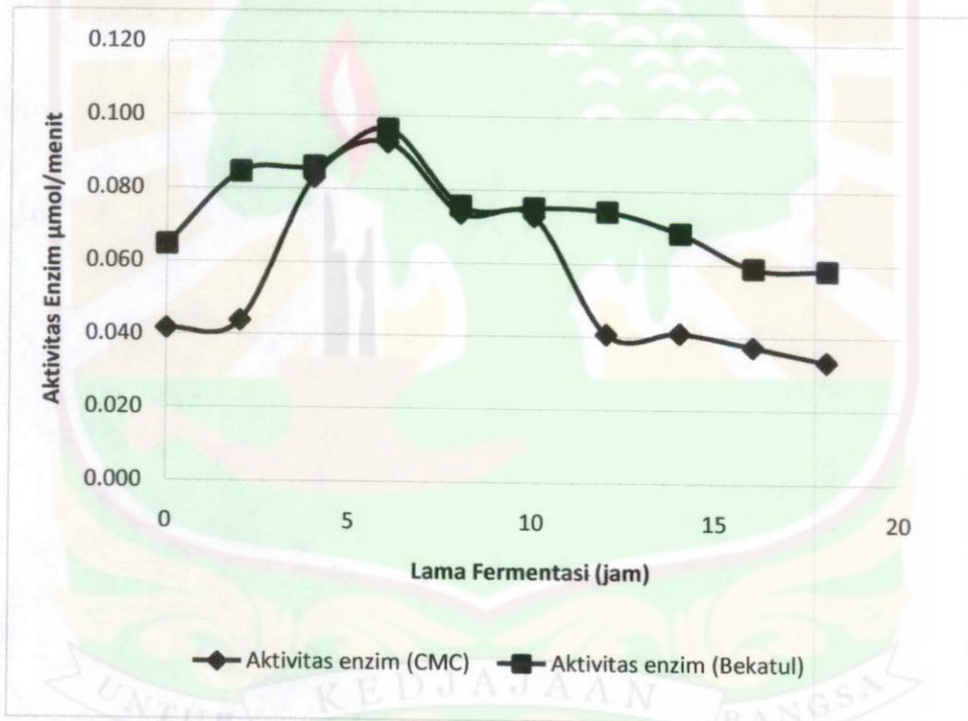
Produksi enzim selulase dari isolat *AIFI RP* menggunakan medium fermentasi steril (medium cair). Pada penelitian ini, lama fermentasi divariasikan dari 2 jam sampai 18 jam dengan rentang waktu dua jam. Selama fermentasi, campuran suspensi isolat dan medium di *shaker* pada kecepatan 100 rpm. Tujuannya agar enzim yang terdapat dalam isolat di sekresikan ke dalam medium. Setelah masa fermentasi, kemudian enzim yang dihasilkan diuji aktivitasnya dengan substrat CMC. Dari hasil pengujian aktivitas (Lampiran 3) maka didapatkan lama inkubasi yang optimum untuk aktivitas selulase adalah selama 6 jam. Dalam penelitian ini juga digunakan substrat bekatul sebagai substrat alami.

#### **4.4. Aktivitas Enzim Selulase**

Penentuan aktivitas enzim selulase dilakukan mulai dari waktu 0 sampai 18 jam dengan rentang waktu setiap 2 jam. Substrat yang digunakan dalam penentuan aktivitas ini ada dua yaitu CMC dan bekatul. CMC merupakan substrat murni selulosa dan bekatul adalah substrat alami. Pada Gambar 7 dapat dilihat bahwa pada waktu 0 sampai 4 jam aktivitas enzim selulase mengalami peningkatan yang signifikan. Baik dari substrat CMC dan bekatul, keduanya memperlihatkan pola aktivitas yang sama. Pada waktu fermentasi selama 6 jam enzim memperlihatkan aktivitasnya yang maksimum. Setelah melewati aktivitas optimum, enzim mulai mengalami penurunan aktivitasnya.

Penurunan aktivitas enzim ini terjadi karena enzim mulai mengalami lisis dan pemecahan sel. Pada saat pemecahan sel ini, enzim yang lain seperti protease juga dihasilkan, oleh karena itu aktivitas dari selulase menurun. Dari substrat yang digunakan, ternyata substrat bekatul memberikan aktivitas enzim yang lebih tinggi dari substrat CMC. Secara umum substrat alami seperti bekatul memiliki aktivitas lebih tinggi di bandingkan dengan substrat murni seperti CMC<sup>17</sup>. Hal ini diakibatkan karena pada substrat alami seperti bekatul endo-1,4- $\beta$ -glukanase, ekso-1,4- $\beta$ -glukanase dan  $\beta$ -1,4-glukosidase yang dihasilkan oleh isolat *AifI RP* yang bekerja secara sinergis. Sedangkan pada substrat CMC yang bekerja hanya endo-1,4- $\beta$ -glukanase (CMC-ase).

Dari hasil penentuan aktivitas diperoleh kondisi optimum pada 6 jam lama fermentasi. Kondisi ini akan digunakan untuk optimasi dari aktivitas enzim selulase dari isolat *AifI RP*.



**Gambar 7.** Kurva aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh isolat *AifI RP* pada medium cair. pH yang digunakan adalah 7,8 dengan suhu inkubasi 50 °C dan lama inkubasi 50 menit.

#### 4.5. Standar Glukosa

Penentuan standar glukosa ditentukan dengan metoda Somogy-Nelson secara spektrofotometri. Data-data dari hasil pembuatan kurva standar glukosa terdapat pada Lampiran 4. Kurva standar ini dibuat dengan mengukur absorban larutan standar pada panjang gelombang 540 nm, karena pada panjang gelombang tersebut didapatkan serapan maksimum larutan glukosa. Dengan menggunakan kurva ini dapat ditentukan kadar gula reduksi yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis substrat CMC oleh enzim selulase.

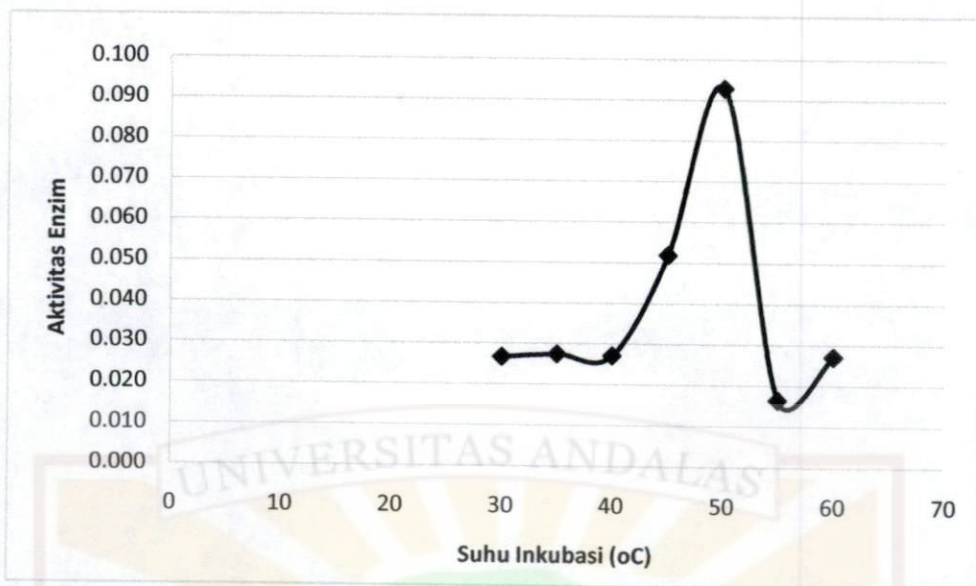
#### 4.6. Kondisi Optimum Enzim Selulase

Kondisi optimum enzim selulase dari isolat *Aif I RP* meliputi beberapa karakter yaitu suhu inkubasi, lama inkubasi dan konsentrasi substrat. Substrat yang digunakan untuk optimasi adalah CMC dengan lama fermentasi sesuai dengan lama fermentasi maksimum yaitu 6 jam. pH yang digunakan adalah pH sampel awal yaitu 7,8. Data dari aktivitas enzim pada masing-masing kondisi optimum dapat dilihat pada Lampiran 5.

##### 4.6.1. Suhu Inkubasi Optimum

Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh lingkungannya. Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kerja enzim. Enzim dapat hidup pada suhu tertentu. Jika suhu hidup enzim terlalu tinggi atau terlalu rendah (ekstrim), maka enzim tersebut akan terdenaturasi. Gambar 8 merupakan kurva aktivitas enzim yang dihasilkan oleh isolat *Aif I RP*. Data mengenai penentuan suhu optimum dapat dilihat pada Tabel 5.

Dari Gambar 8 dapat dilihat bahwa pada suhu 30 sampai suhu 40 °C enzim yang dihasilkan oleh isolat *Aif I RP* memiliki aktivitas yang relatif stabil. Pada fasa ini energi kinetik yang dibutuhkan masih sedikit. Pada suhu 45 °C aktivitas enzim mengalami kenaikan yang sangat cepat karena dengan naiknya suhu, energi kinetik juga meningkat reaksi antara substrat dan enzim menjadi lebih cepat. Enzim mencapai aktivitas maksimum pada suhu 50 °C dengan aktivitas enzim sebesar 0,093  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ .



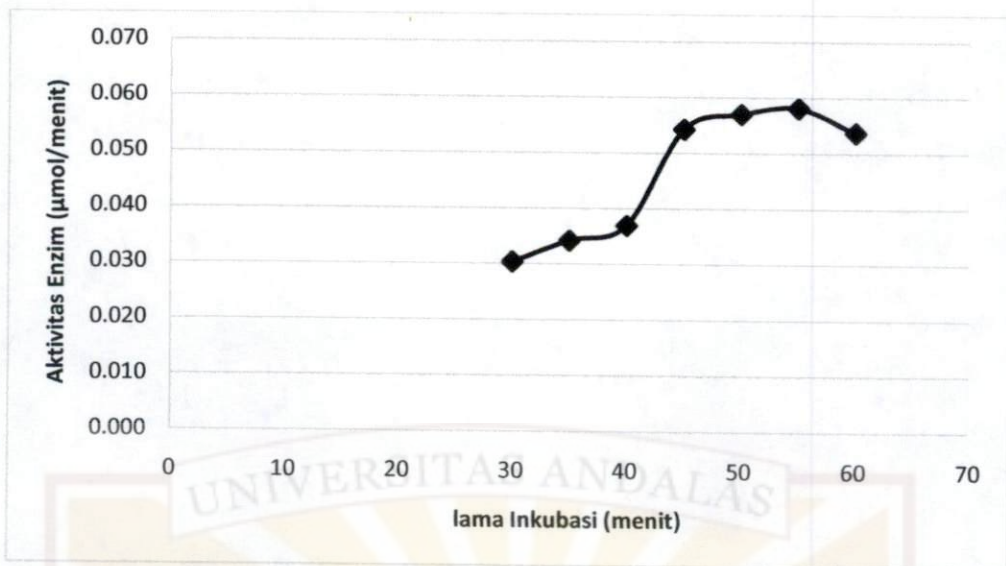
**Gambar 8.** Kurva pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase. pH yang digunakan adalah 7,8 dengan lama inkubasi selama 50 menit dan lama fermentasi 6 jam.

Enzim ini termasuk enzim yang termostabil karena memiliki kondisi optimum pada suhu antara 50 sampai 80 °C<sup>18</sup>. Jika suhu inkubasi diatas 50 °C enzim mengalami penurunan aktivitas. Hal ini terjadi karena enzim yang dihasilkan oleh isolat *AlfIRP* ini mengalami denaturasi sehingga enzim maupun substrat mengalami perubahan pada sisi aktifnya dan enzim kehilangan aktivitasnya. Pada saat suhu 60 °C aktivitas enzim kembali naik, hal ini karena sisi aktif dari substrat yang mengalami perubahan mampu dicerna oleh bagian lain oleh enzim selulase karena enzim selulase adalah enzim yang kompleks.

#### 4.6.2. Lama Inkubasi Optimum

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh lama inkubasi yaitu waktu yang dibutuhkan oleh enzim untuk bereaksi dengan substrat. Variasi lama inkubasi dimulai dari 30 menit sampai dengan 60 menit dengan rentang waktu 5 menit. Dari Gambar 9 dapat dilihat pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas enzim dari isolat *AlfIRP*. Data mengenai lama inkubasi optimum dapat dilihat pada Tabel 6.



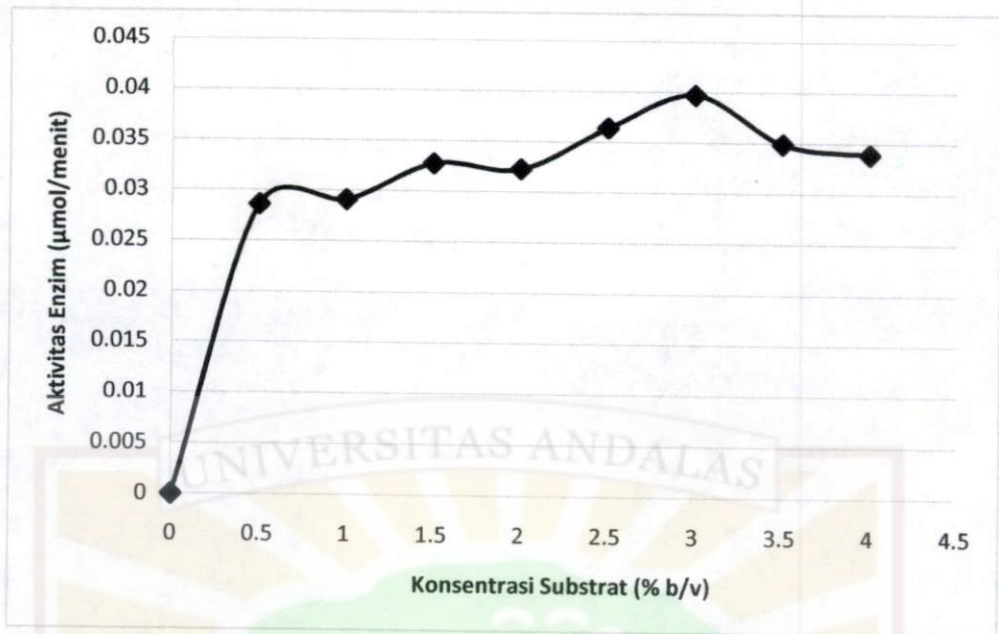


**Gambar 9.** Kurva pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase. pH yang digunakan adalah 7,8 dengan suhu inkubasi 50 °C dan lama fermentasi 6 jam.

Dari gambar 9 diatas dapat dilihat bahwa pada saat inkubasi selama 30 sampai 50 menit aktivitas enzim mengalami kenaikan. Ini disebabkan karena semakin lama kontak antara enzim dengan substrat maka semakin banyak substrat yang dihirolisis oleh enzim untuk menghasilkan produk berupa glukosa. Enzim mencapai kondisi optimumnya pada saat inkubasi selama 55 menit dengan aktivitas enzim sebesar 0,058 µmol/menit. Pada saat lama inkubasi diatas 55 menit maka enzim akan mengalami penurunan aktivitas hal ini terjadi karena substrat sudah mulai habis.

#### 4.6.3. Konsentrasi Substrat Optimum

Substrat yang digunakan pada penelitian ini yaitu CMC dengan konsentrasi 0% (b/v) sampai dengan 4 % (b/v). Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim selulase dari isolat *AIfIRP* dapat dilihat pada Gambar 10. Data mengenai konsentrasi substrat optimum dapat dilihat pada Tabel 7.



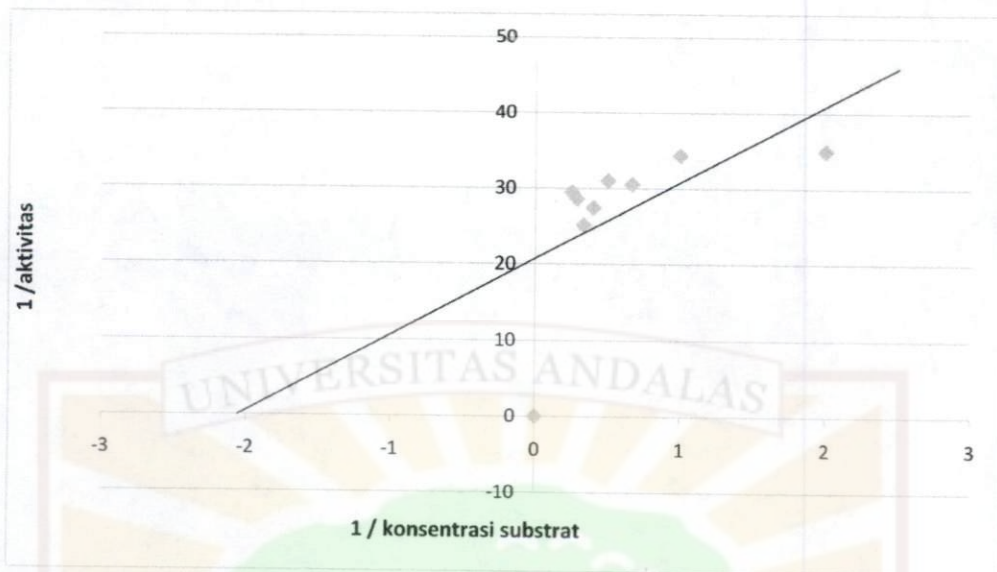
**Gambar 10.** Kurva Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Selulase. pH yang digunakan adalah 7,8 dengan suhu inkubasi 50 °C, lama inkubasi 55 menit dan lama fermentasi 6 jam.

Dari gambar 10 dapat bahwa pada waktu konsentrasi substrat 0,5 % sampai 2 % aktivitas enzim cenderung mengalami peningkatan. Hal ini disebabkan karena pada konsentrasi tersebut enzim mampu menghidrolisis substrat dengan cepat. Enzim mencapai aktivitas maksimum pada konsentrasi substrat 3 % dengan aktivitas sebesar 0,040 µmol/menit. Jika konsentrasi terus ditingkatkan diatas 3 % maka enzim akan mengalami kejenuhan dan aktivitas enzim terhambat oleh substrat CMC itu sendiri. Sehingga enzim tidak mampu lagi menghidrolisis substrat CMC dan mengalami penurunan aktivitas.

#### 4.7. Nilai Konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan $V_{maks}$

Karakter utama yang ditentukan dalam mempelajari sifat kinetik enzim adalah kecepatan katalitik maksimum ( $V_{maks}$ ) dan konsentrasi substrat pada saat kecepatan katalitik mencapai setengah maksimum ( $K_M$ )<sup>18</sup>. Berdasarkan hasil pengujian pengaruh substrat CMC terhadap aktivitas enzim dari isolat *AIf I RP*,

maka dapat diperoleh konstanta  $K_M$  dan  $V_{maks}$  dengan metoda Lineweaver-Burk seperti yang terlihat pada Gambar 11.



**Gambar 11.** Kurva Lineweaver-Burk. Hubungan 1/substrat dengan 1/aktivitas.

Nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$  diperoleh berdasarkan pemetaan data 1/substrat terhadap 1/aktivitas. Perpotongan pada sumbu 1/aktivitas merupakan nilai  $1/V_{maks}$  yaitu 20,716 sehingga nilai  $V_{maks}$  adalah 0,048  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ . Sedangkan nilai  $-1/K_M$  adalah -2,054 sehingga nilai  $K_M$  adalah 0,487 %. Data penentuan nilai  $V_{maks}$  dan  $K_M$  ini dapat dilihat pada Lampiran 7.

Nilai  $K_M$  yang didapatkan menunjukkan tingkat afinitas terhadap substrat. Semakin kecil nilai  $K_M$  semakin tinggi afinitasnya terhadap substrat, sehingga semakin rendah konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mencapai kecepatan reaksi katalitik maksimumnya ( $V_{maks}$ ).

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman terdapat isolat penghasil enzim selulase termostabil yaitu isolat *Alf I RP* yang di ambil dari pusat semburan Sumber 1.
2. Lama fermentasi maksimum yang didapatkan selama 6 jam dengan aktivitas enzim sebesar 0,093  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ .
3. Enzim selulase yang di hasilkan oleh isolat *Alf I RP* ini memiliki aktivitas selulase dengan optimasi : Suhu inkubasi sebesar 50 °C dengan aktivitas enzim sebesar 0,093  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ , Lama inkubasi selama 55 menit dengan aktivitas enzim sebesar 0,058  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ , Konsentrasi substrat sebesar 3 % (b/v) dengan aktivitas sebesar 0,040  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ .
4. Enzim selulase yang dihasilkan isolat *Alf I RP* mempunyai nilai  $K_M$  sebesar 0,487 % dengan  $V_{\text{maks}}$  0,048  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ .

#### 5.2. Saran

Dalam penelitian ini masih banyak terdapat kekurangan, maka untuk lebih melengkapi penelitian ini disarankan untuk melakukan variasi dari pH agar optimasinya lebih lengkap dan identifikasi dari isolat yang diperoleh agar diketahui jenis dari isolat tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Falch, E.A. 1991. *Industrial enzymes developments in production and application*. Biotech. Adv. 9:643-658
2. Aunstrup, K.O., O. Andressen, E.A. Falch, and T.K. Nielsen. 1979. *Production of microbial enzymes*. In. Pepples, H.J and D. Perlman (Eds.). *Microbial Technology*. Vol. 1. Academic Press Inc., New York.
3. Madigan, T., J.M. Martinko, and J. Parker. 2000. *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall International Inc., New Jersey.
4. Busman, 2002. *Amobilisasi Dan Isolasi Termoenzim Protease Dari Bakteri Termofil Isolat Sumber Air Panas Rimbo Panti*. Tesis Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas, Padang.
5. Akhdiya, A. 2003. *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termostabil*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.
6. Dwidjoseputro, 2002. *Dasar-dasar Mikrobiologi*.
7. Timotius, K.H, 1982, *Mikrobiologi Dasar*; Salatiga, Universitas Kristen Satya Wacana.
8. Montgomery, R., et al. 1993. *Biokimia*. Jilid 1. Edisi keempat. Hal 190-192. Gadjah Mada University Press.
9. Murray, Robert K dkk. 1995. *Biokimia Harper*. Edisi ke – 22. EGC.
10. Wirahadikusumah, M. 1981. *Biokimia*. Bandung : penerbit ITB.
11. Lehninger, A.L., 1993, *Dasar-Dasar Biokimia*, Tenawijaya M, Jilid I, Erlangga, Jakarta.
12. Da Silva, dkk. 2005. Production of Xylanase and CMCase on Solid State Fermentation in Different Residues By *Thermoascus auranticus* Miede. *Brazilian Journal of Microbiology* 36 : 235-241.
13. Saraswati, R,, dkk. 2007. *Metoda Analisis Biologi Tanah*. Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian, Bogor. Hal 219
14. Mandels, M., J. H. Medeiros, R. E. Andrewotti, & F. H. Bisset. 1981. *Enzymatic Hydrolysis of Cellulosa: evaluation of cellulase culture filtrate under use condition*. Biotech. Bioneg. 23: 2009-2026.

15. Rizal, Y. 2004 *Penapisan Bakteri Termofil Penghasil Enzim Protease Dari Sumber Air Panas Di Batu Sangkar*. Skripsi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas.
16. Lestari, P., 2000, *Eksplorasi Enzim Termostabil dari Mikroba Termofilik*, Hayati, Vol. 7, No. 1, Hlm. 21-25.
17. Meryandini, A. dkk. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik Dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara, sains*, vol. 13, no. 1, april 2009: 33-38
18. Richana, N. Dkk. 2008. Isolasi Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase serta Karakterisasi Enzimnya. *Jurnal AgroBiogen* 4(1):24-34

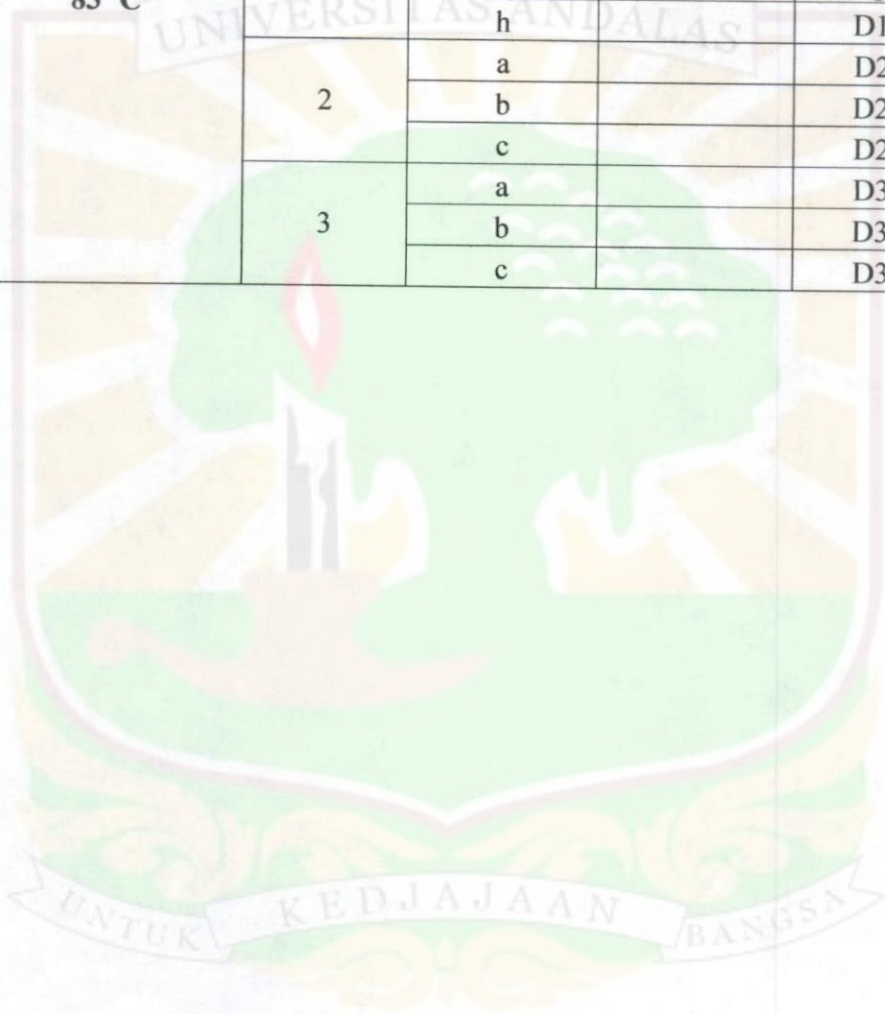


Lampiran 1. Penapisan Bakteri Termofilik

Tabel 1. Hasil Penapisan dan Penamaan Isolat

Sumber	Penapisan 1	Penapisan 2	Penapisan 3	Penapisan 4 / Nama Isolat
Sumber I (Pusat) (A) 97 °C	1	a		A1a RP
		b		A1b RP
		c		A1c RP
		d		A1d RP
		e		A1e RP
		f	I	A1f I RP
			II	A1f II RP
	2	g		A1g RP
	3	a		A2a RP
-			A3 RP	
1 meter dari pusat (B) 92 °C	1	-		B1 RP
	2	a	I	B2a I RP
			II	B2a II RP
		b	I	B2b I RP
			II	B2b II RP
	3	a		B3a RP
b			B3b RP	
2 meter dari pusat (C) 88 °C	1	a		C1a RP
		b		C1b RP
		c		C1c RP
		d		C1d RP
		e		C1e RP
		f		C1f RP
	2	a		C2a RP
		b		C2b RP
		c		C2c RP
	3	a		C3a RP
		b		C3b RP
		c		C3c RP
		d		C3d RP
		e		C3e RP

<b>Sumber II (D)</b>  <b>83 °C</b>	1	a		D1a RP
		b		D1b RP
		c		D1c RP
		d		D1d RP
		e		D1e RP
		f		D1f RP
		g	I	D1g I RP
			II	D1g II RP
	III		D1g III RP	
	h		D1h RP	
	2	a		D2a RP
		b		D2b RP
		c		D2c RP
3	a		D3a RP	
	b		D3b RP	
	c		D3c RP	





**Lampiran 2. Gambar tempat pengambilan sampel dan gambar isolat.**



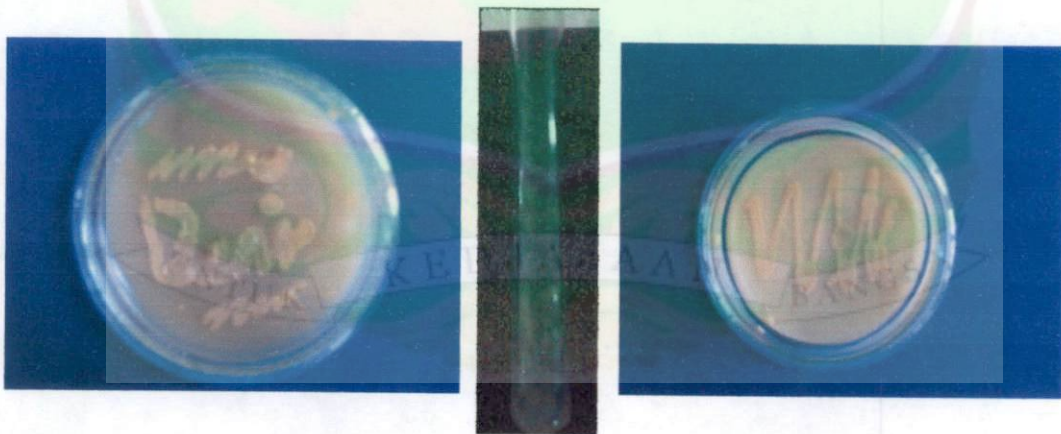
**Gambar 12. Lokasi Pengambilan Sampel**



**Gambar 13. Titik Pengambilan Sampel**



**Gambar 14.** Cara Pengambilan Sampel



**Gambar 15.** Isolat *A1f1*

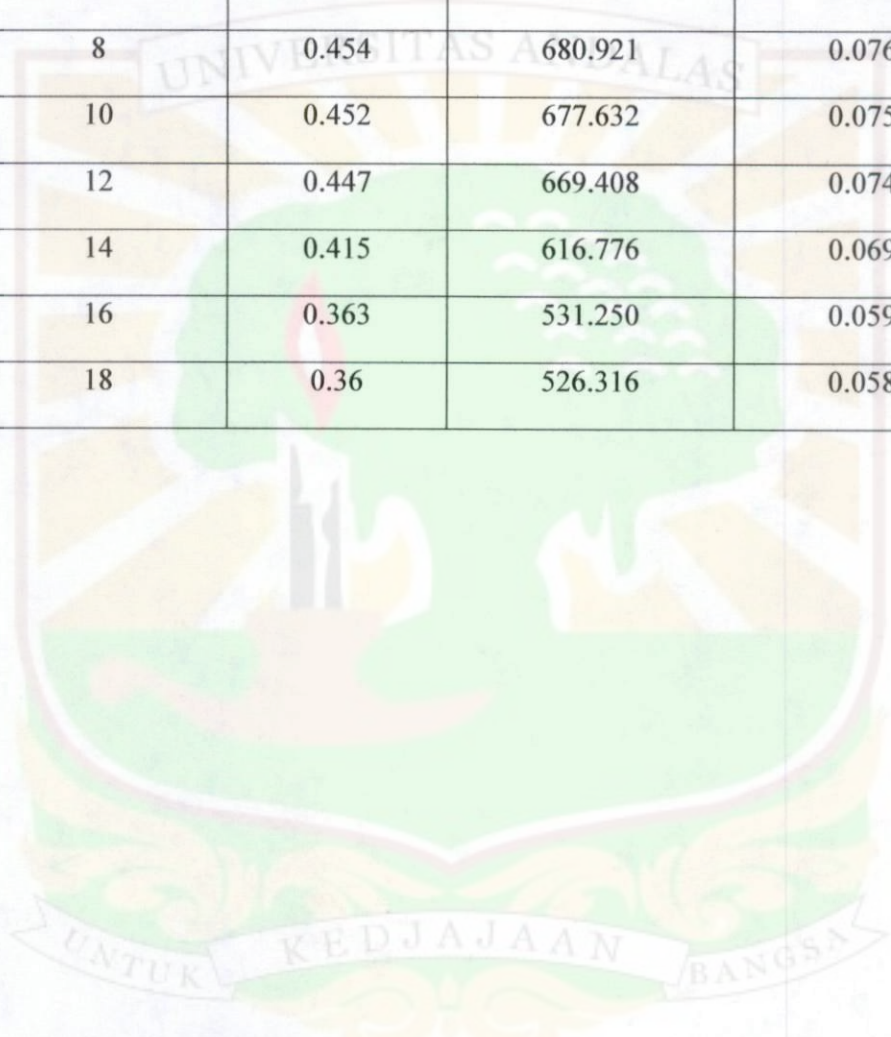
### Lampiran 3. Lama fermentasi optimum

**Tabel 2. Lama fermentasi pada Substrat CMC**

Waktu Fermentasi	Absorban	Kadar Gula Reduksi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas enzim ( $\mu\text{mol/menit}$ )
0	0.268	375	0.042
2	0.28	394.737	0.044
4	0.495	748.355	0.083
<b>6</b>	<b>0.548</b>	<b>835.526</b>	<b>0.093</b>
8	0.443	662.829	0.074
10	0.439	656.250	0.073
12	0.263	366.776	0.041
14	0.265	370.066	0.041
16	0.245	337.171	0.037
18	0.223	300.987	0.033

**Tabel 3. Lama fermentasi pada Substrat bekatul**

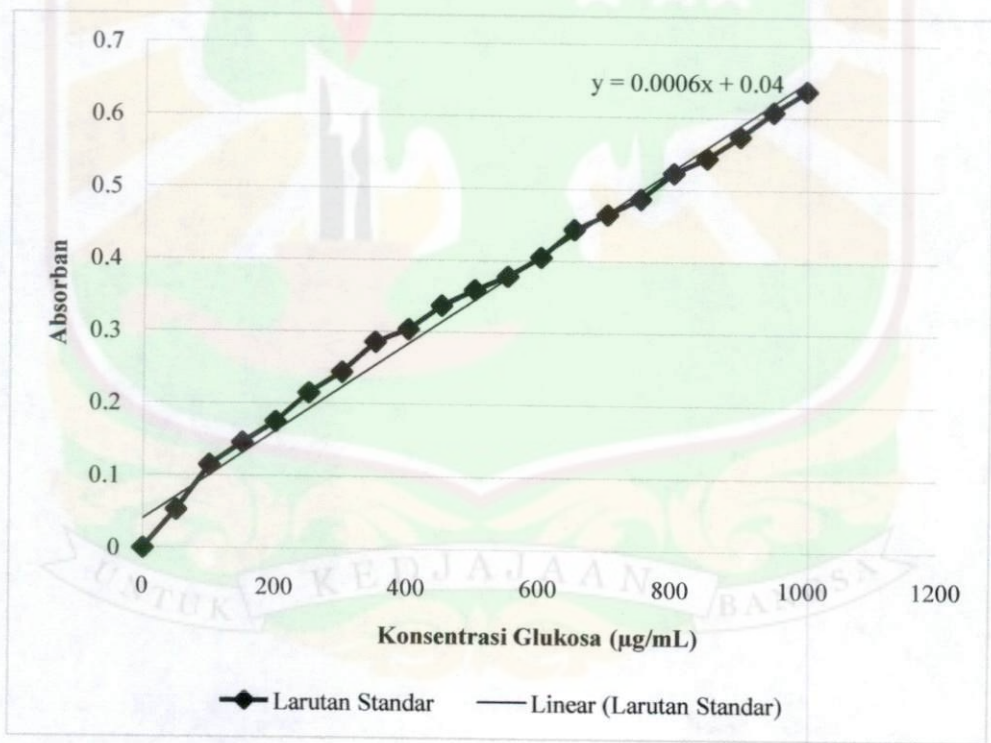
Waktu Fermentasi	Absorban	Kadar Gula reduksi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas enzim ( $\mu\text{mol/menit}$ )
0	0.394	582.237	0.065
2	0.503	761.513	0.085
4	0.512	776.316	0.086
<b>6</b>	<b>0.568</b>	<b>868.421</b>	<b>0.096</b>
8	0.454	680.921	0.076
10	0.452	677.632	0.075
12	0.447	669.408	0.074
14	0.415	616.776	0.069
16	0.363	531.250	0.059
18	0.36	526.316	0.058



**Lampiran 4. Kalibrasi Standar Glukosa**

**Tabel 4. Data Kurva Kalibrasi Standar Glukosa**

Konsentrasi (x)	Absorban (y)	Konsentrasi (x)	Absorban (y)
0	0	550	0.378
50	0.053	600	0.405
100	0.115	650	0.444
150	0.146	700	0.465
200	0.175	750	0.487
250	0.215	800	0.523
300	0.244	850	0.544
350	0.286	900	0.574
400	0.304	950	0.608
450	0.337	1000	0.637
500	0.359		



**Gambar 16. Kurva Kalibrasi Standar Glukosa**

Dari grafik tersebut terlihat bahwa hubungan antara absorban dengan glukosa cenderung linear mengikuti persamaan :

$$B = \frac{(n \cdot \Sigma xy) - (\Sigma x \cdot \Sigma y)}{n (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

$$B = 6,080 \times 10^{-4}$$

$$A = y - Bx = 0,040$$

Persamaan Regresi yang diperoleh adalah  $y = 0,040 + (6,080 \times 10^{-4})x$ .



## Lampiran 5. Kondisi Optimum Enzim Selulase

**Tabel 5. Suhu Inkubasi Optimum**

Suhu Inkubasi (°C)	Absorban	Kadar Gula Reduksi (µg/mL)	Aktivitas Enzim (µmol/menit)
30	0.186	240.132	0.027
35	0.19	246.711	0.027
40	0.188	243.421	0.027
45	0.324	467.105	0.052
<b>50</b>	<b>0.548</b>	<b>835.526</b>	<b>0.093</b>
55	0.13	148.026	0.016
60	0.188	243.421	0.027

**Tabel 6. Lama Inkubasi Optimum**

Lama Inkubasi (menit)	Absorban	Kadar Gula Reduksi (µg/mL)	Aktivitas Enzim (µmol/menit)
30	0.206	273.026	0.030
35	0.227	307.566	0.034
40	0.242	332.237	0.037
45	0.337	488.487	0.054
50	0.352	513.158	0.057
<b>55</b>	<b>0.358</b>	<b>523.026</b>	<b>0.058</b>
60	0.334	483.553	0.054

**Tabel 7. Konsentrasi Substrat Optimum**

Konsentrasi Substrat (% b/v)	Absorban	Kadar Gula Reduksi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas Enzim ( $\mu\text{mol/menit}$ )
0	0	0	0
0.5	0.212	282.895	0.029
1	0.215	287.829	0.029
1.5	0.237	324.013	0.033
2	0.234	319.079	0.032
2.5	0.259	360.197	0.036
<b>3</b>	<b>0.279</b>	<b>393.092</b>	<b>0.040</b>
3.5	0.25	345.395	0.035
4	0.244	335.526	0.034





### Lampiran 6. Contoh Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase Kasar

Aktivitas enzim selulase ditentukan dengan metode spektrofotometri menurut Somogy-Nelson. Kondisi penelitian adalah sebagai berikut : konsentrasi substrat 2 %, pH = 7,8, lama inkubasi 50 menit, dan suhu inkubasi 50 °C, didapatkan absorban sebesar 0,268. Dengan menggunakan kurva kalibrasi standar glukosa :

$$y = 0,040 + (6,080 \times 10^{-4})x$$

akan diperoleh konsentrasi glukosa = 375 µg/mL.

Untuk perhitungan aktivitasnya selama 50 menit adalah

$$\begin{aligned} \frac{\text{Kadar gula reduksi}}{\text{BM glukosa} \times \text{lama inkubasi}} &= \frac{375 \mu\text{g}}{180 \mu\text{g}/\mu\text{mol} \times 50 \text{ menit}} \\ &= 0,042 \mu\text{mol}/\text{menit} \end{aligned}$$

Lampiran 7. Penentuan Nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$

Tabel 8. Data Penentuan Nilai  $K_M$

Konsentrasi Substrat (% b/v)	Absorban	Kadar Gula Reduksi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas Enzim ( $\mu\text{mol/menit}$ )	1/[S]	1/V
0,5	0,212	282,895	0,029	2,000	34,995
1	0,215	287,829	0,029	1,000	34,395
1,5	0,237	324,013	0,033	0,667	30,554
2	0,234	319,079	0,032	0,500	31,027
2,5	0,259	360,197	0,036	0,400	27,485
3	0,279	393,092	0,040	0,333	25,185
3,5	0,25	345,395	0,035	0,286	28,663
4	0,244	335,526	0,034	0,250	29,506

Dari data diatas, dapat dibuat persamaan regresi untuk penentuan nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$  yaitu :

$$y = 20,716 + 10,087 x$$

dimana  $x = -1/K_M \longrightarrow y = 0$

$$x = - \frac{20,716}{10,087} = -2,054$$

$$K_M = - \frac{1}{-2,054} = 0,487\%$$

$$y = 1/V_{maks} \longrightarrow x = 0$$

$$y = 20,716 + 10,087 x \ 0$$

$$y = 20,716$$

$$V_{maks} = 1/20,716 = 0,048 \ \mu\text{mol/menit.}$$

MILIK  
UPT PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS ANDALAS