



TUGAS AKHIR - SB0141510

# MODIFIKASI ENZIMATIK BAHAN BERBASIS SELULOSA SEBAGAI SUBSTRAT POTENSIAL BIOETANOL

ASMA'UL KARIMA  
1512 100 043

Dosen Pembimbing  
Ir. Sri Nurhatika, M.P.  
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T.

Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2016



**TUGAS AKHIR - SB141510**  
**MODIFIKASI ENZIMATIK BAHAN BERBASIS**  
**SELULOSA SEBAGAI SUBSTRAT POTENSIAL**  
**BIOETANOL**

**ASMA'UL KARIMA**  
**1512 100 043**

**Dosen Pembimbing**  
**Ir. Sri Nurhatika, M.P.**  
**Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T.**

**JURUSAN BIOLOGI**  
**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut**  
**Teknologi Sepuluh Nopember**  
**Surabaya 2016**



**FINAL PROJECT - SB141510**  
**ENZYMATIC MODIFICATION OF CELLULOSE**  
**BASED MATERIALS FOR PROMISING**  
**SUBSTRATE OF BIOETHANOL PRODUCTION**

**ASMA'UL KARIMA**  
**1512 100 043**

**Advisor Lecturer**  
**Ir. Sri Nurhatika, M.P.**  
**Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T.**

**DEPARTMENT OF BIOLOGY**  
**Faculty of Matematic and Natural Science**  
**Institut Teknologi Sepuluh Nopember**  
**Surabaya 2016**

## LEMBAR PENGESAHAN


# LAPORAN TUGAS AKHIR MODIFIKASI ENZIMATIK BAHAN BERBASIS SELULOSA SEBAGAI SUBSTRAT POTENSIAL BIOETANOL

Oleh:

**ASMAUL KARIMA**  
**1512 100 043**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Ir. Sri Nurhatika, M.P.  Pembimbing I

Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T.  Pembimbing II

Surabaya, 30 Mei 2016

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi



**Dia Dewi Hidayati, M.Si**  
**NIP. 19691121 199802 2 001**

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, rasa syukur dipanjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Laporan Tugas Akhir dengan judul **Modifikasi Enzimatis Bahan Berbasis Selulosa Sebagai Substrat Potensial Bioetanol**. Penyusunan Laporan Tugas Akhir ini merupakan suatu syarat untuk pelaksanaan Tugas Akhir di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

Dalam penyusunan laporan ini, tidak lepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. rer. nat. Edwin Setiawan, M.Si selaku ketua sidang, Triono Bagus Saputro, S.Si, M. Biotech selaku penguji beserta Ir. Sri Nurhatika, M.P. dan Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T. selaku dosen pembimbing. Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada Ayahanda dan Ibunda, adik-adik serta keluarga atas doa dan kasih sayangnya. Penyusunan Laporan Tugas Akhir ini juga tidak lepas dari bantuan dan dukungan teman-teman seperjuangan angkatan 2012 terkhusus kepada Tria Ainur R, Indah Safitri, Lisma Shofarina, kawan-kawan Biomaterial dan Enzyme Research 2015/2016, angkatan B15 beserta seluruh pihak yang telah membantu.

Walaupun penulis menyadari masih banyak kekurangan, namun besar harapan Laporan Tugas Akhir ini dapat bermanfaat.

Surabaya, 30 Mei 2016

Asmaul Karima

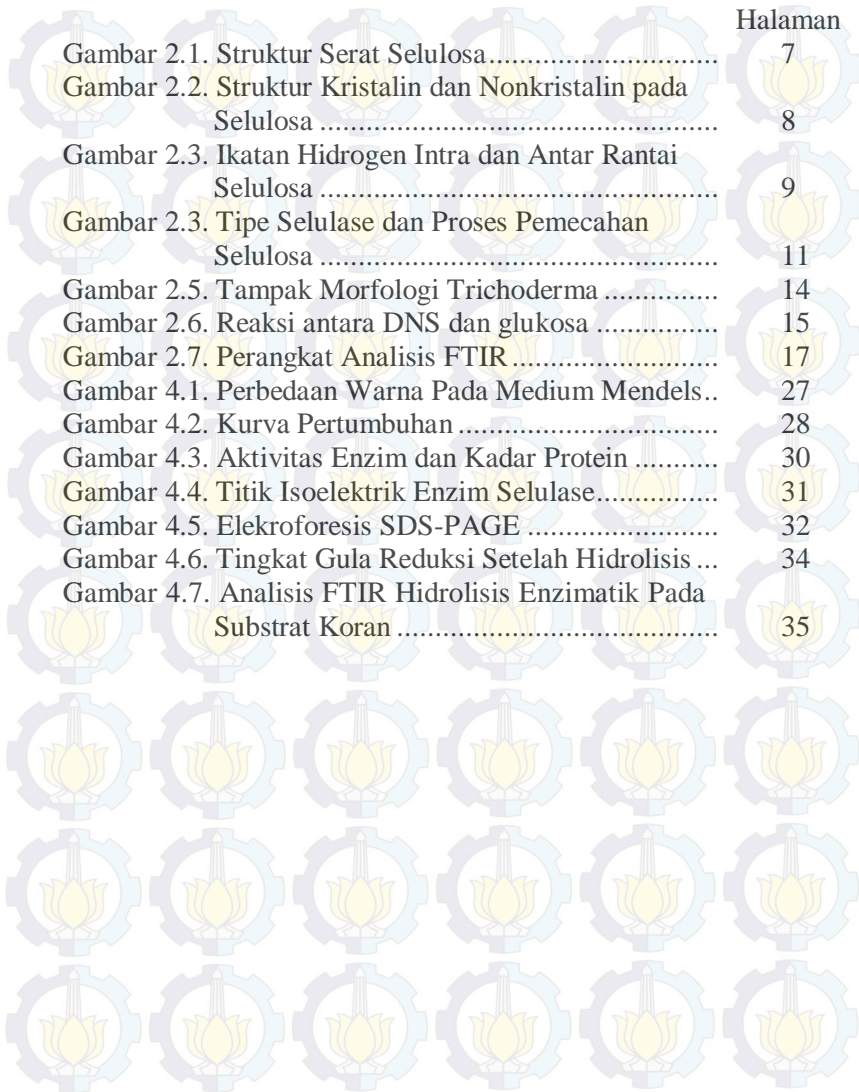
## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL INDONESIA.....	i
HALAMAN JUDUL INGGRIS .....	iii
HALAMAN PENGESAHAN .....	v
ABSTRAK .....	vii
<i>ABSTRACT</i> .....	ix
KATA PENGANTAR .....	xi
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	2
1.3. Batasan Masalah.....	2
1.4. Tujuan.....	3
1.5. Manfaat.....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Bioetanol.....	5
2.2. Definisi dan Sumber Selulosa .....	6
2.3. Mekanisme Degradasi oleh Selulase .....	10
2.4. Mikroorganisme Selulolitik .....	12
2.5. Analisis Gula Reduksi .....	14
2.6. Fourier Transform Infra Red (FTIR).....	16
<b>BAB III METODOLOGI</b>	
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian .....	19
3.2. Metode yang Digunakan .....	19
3.2.1. Produksi Selulase oleh <i>Trichoderma</i> sp.....	19
3.2.1.1. Preparasi Bubuk Jerami Padi .....	19
3.2.1.2. Peremajaan dan Aklimatisasi <i>Trichoderma</i> sp. ....	19
3.2.1.3. Preparasi Starter <i>Trichoderma</i> sp. ....	20
3.2.1.4. Produksi dan Isolasi Selulase .....	20
3.2.2. Purifikasi Selulase <i>Trichoderma</i> sp. ....	21

3.2.3. Karakterisasi Selulase.....	22
3.2.3.1. Uji Aktivitas Selulase .....	22
3.2.3.2. Uji Kandungan Protein .....	23
3.2.3.3. Titik Isoelektrik.....	24
3.2.3.4. Analisis Elektroforesis SDS-PAGE .....	24
3.3. Hidrolisis Enzimatik Pada Substrat Berselulosa ...	25
3.4. Analisis Gugus Fungsi.....	26
3.5. Analisis Data.....	26
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1. Produksi dan Isolasi Enzim.....	27
4.2. Purifikasi dan Karakterisasi Enzim .....	30
4.3. Tingkat Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzimatik	33
4.4. Analisis FTIR Hasil Modifikasi Enzimatik .....	34
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1. Kesimpulan .....	37
5.2. Saran.....	37
DAFTAR PUSTAKA .....	39
LAMPIRAN .....	51
BIODATA PENULIS .....	63

## DAFTAR GAMBAR

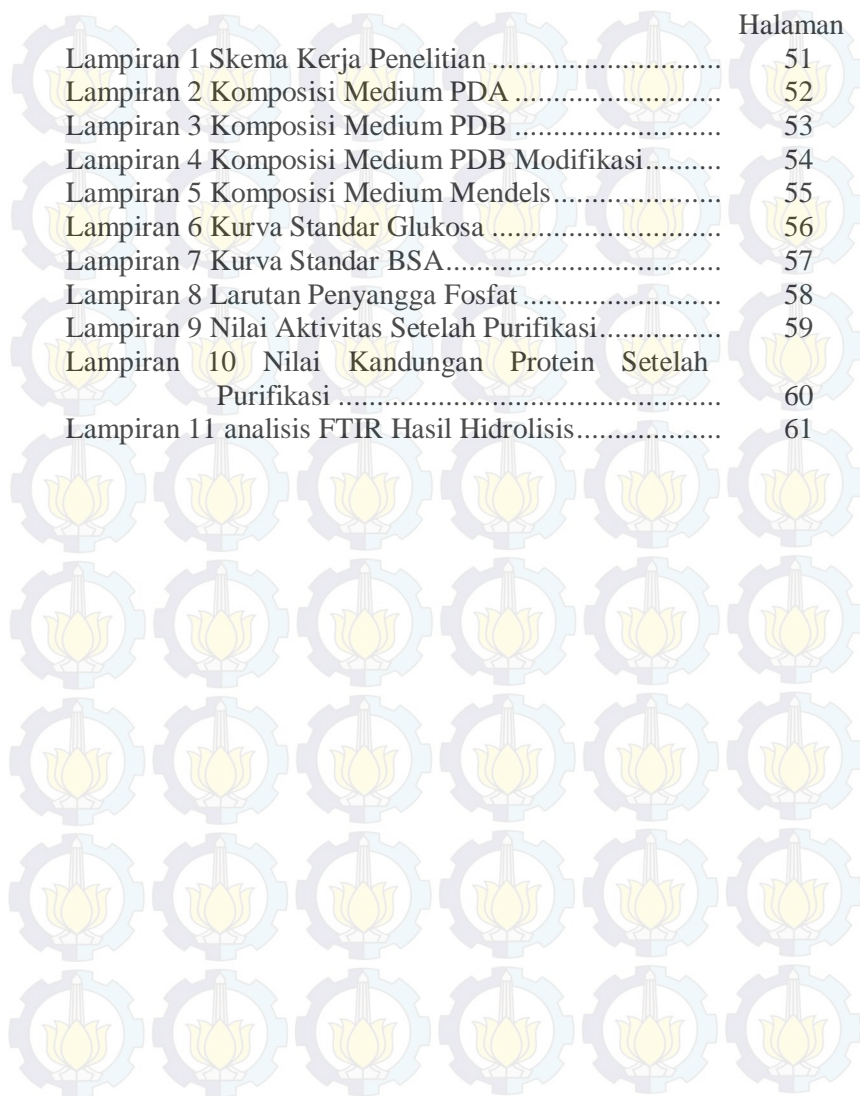
	Halaman
Gambar 2.1. Struktur Serat Selulosa.....	7
Gambar 2.2. Struktur Kristalin dan Nonkristalin pada Selulosa .....	8
Gambar 2.3. Ikatan Hidrogen Intra dan Antar Rantai Selulosa .....	9
Gambar 2.3. Tipe Selulase dan Proses Pemecahan Selulosa .....	11
Gambar 2.5. Tampak Morfologi Trichoderma .....	14
Gambar 2.6. Reaksi antara DNS dan glukosa .....	15
Gambar 2.7. Perangkat Analisis FTIR .....	17
Gambar 4.1. Perbedaan Warna Pada Medium Mendels..	27
Gambar 4.2. Kurva Pertumbuhan .....	28
Gambar 4.3. Aktivitas Enzim dan Kadar Protein .....	30
Gambar 4.4. Titik Isoelektrik Enzim Selulase.....	31
Gambar 4.5. Elektroforesis SDS-PAGE .....	32
Gambar 4.6. Tingkat Gula Reduksi Setelah Hidrolisis ...	34
Gambar 4.7. Analisis FTIR Hidrolisis Enzimatik Pada Substrat Koran .....	35





## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Skema Kerja Penelitian .....	51
Lampiran 2 Komposisi Medium PDA .....	52
Lampiran 3 Komposisi Medium PDB .....	53
Lampiran 4 Komposisi Medium PDB Modifikasi .....	54
Lampiran 5 Komposisi Medium Mendels .....	55
Lampiran 6 Kurva Standar Glukosa .....	56
Lampiran 7 Kurva Standar BSA .....	57
Lampiran 8 Larutan Penyangga Fosfat .....	58
Lampiran 9 Nilai Aktivitas Setelah Purifikasi .....	59
Lampiran 10 Nilai Kandungan Protein Setelah Purifikasi .....	60
Lampiran 11 analisis FTIR Hasil Hidrolisis .....	61



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Bioetanol (etil alkohol,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$  atau ETOH) merupakan biofuel cair yang berasal dari proses fermentasi dengan melibatkan mikroorganisme (Tiwari *et al.*, 2011; Hansen *et al.*, 2005). Bioetanol memiliki nilai oktan yang tinggi, tidak mudah meledak, dan kenaikan suhu lebih cepat sehingga mempercepat proses pembakaran (Balat *et al.*, 2008). Pemanfaatan biomassa berbasis selulosa memiliki kelebihan berupa biaya produksi yang murah, jumlah yang melimpah dan bersifat terbarukan (Fang *et al.*, 2014).

Konversi biomassa dalam produksi bioetanol terdiri dari 3 tahap yaitu *pre-treatment*, hidrolisis (sakarifikasi), dan fermentasi gula tereduksi. Tahapan sakarifikasi (hidrolisis) merupakan tahapan penting dalam menyediakan sumber karbon (Taherzadeh & Karimi, 2008). Sakarifikasi secara enzimatik dinilai lebih efektif dalam mendegradasi selulosa karena tidak menghasilkan residu yang bersifat korosif dan tidak membutuhkan proses penetralan senyawa toksikan. Pada umumnya enzim yang digunakan untuk hidrolisis selulosa adalah selulase (Gao *et al.*, 2008; Thongekkaew *et al.*, 2008; Jagtap & Rao, 2005).

Selulase (EC 3.2.1.4) dikenal dengan nama sistematis  $\beta$ -1,4 glukano-4-glukanohidrolase adalah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa. Sistem pemecahan selulosa menjadi glukosa melibatkan tiga jenis enzim selulase yaitu endo- $\beta$ -1,4-glukanase, ekso- $\beta$ -1,4-glukanase, dan  $\beta$ -glukosidase (Jagtap & Rao, 2005; Guo *et al.*, 2008; Goyal *et al.*, 1991; Reese *et al.*, 1950).

Selulosa dapat disakarifikasi dengan memanfaatkan enzim selulase yang diproduksi oleh beberapa mikroorganisme

meliputi bakteri, kapang, dan *actinomycetes* (Chellapdani & Himanshu, 2008; Kubicek *et al.*, 2008). Salah satu jenis kapang yang dapat memproduksi enzim selulase secara optimal yaitu genus *Trichoderma* sp. (Miettinen & Suominen, 2002; Sun *et al.*, 2002). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, *Trichoderma* sp. mampu tumbuh optimal pada suhu 32-35°C dan pH 6 dengan aktivitas enzim sebesar 8,2 U/ml dalam mendegradasi substrat (Wahyuningtyas *et al.*, 2013; Ok *et al.*, 2004).

Kompleksitas struktur kristalin pada selulosa merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi tingkat degradasi selulosa menjadi gula sederhana (Tahezadeh & Karimi, 2008). Pemanfaatan substrat berbasis selulosa dengan modifikasi enzimatik sebagai bahan baku pembuatan bioetanol masih relatif rendah. Sehingga dalam penelitian ini dilakukan hidrolisis enzimatik menggunakan selulase dari *Trichoderma* sp. pada substrat rumput laut, kertas koran, dan kertas saring Whatman no.1 sebagai bahan baku potensial dalam fermentasi bioetanol.

### **1.2. Rumusan Masalah**

Selulosa merupakan biopolimer yang ketersediannya melimpah di alam. Keberadaan selulosa di alam belum dimanfaatkan secara optimal. Oleh karena itu dalam penelitian ini dirumuskan permasalahan bagaimana memanfaatkan selulase yang diproduksi oleh *Trichoderma* untuk proses hidrolisis dari beberapa sumber substrat yang berbasis selulosa.

### **1.3. Batasan Masalah**

Batasan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mikroorganisme yang digunakan adalah isolat *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS.
2. Bahan berbasis selulosa yang digunakan dalam penelitian meliputi rumput laut (*Kappaphycus alvarezii*), kertas koran, dan kertas saring whattman no 1.
3. Penelitian dilakukan dalam skala laboratorium.

4. Analisis data dilakukan dengan menggunakan metode DNS dan FTIR.

#### **1.4. Tujuan**

Tujuan dari penelitian ini adalah mengukur gula reduksi dari beberapa bahan berbasis selulosa yang dihidrolisis menggunakan selulase dari isolat *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 sebagai substrat potensial dalam fermentasi bioetanol.

#### **1.5. Manfaat**

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai potensi selulase dari *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 dalam mendegradasi bahan berbasis selulosa sebagai substrat dalam fermentasi bioetanol.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Bioetanol**

Konsumsi energi bahan bakar fosil diperkirakan mengalami peningkatan hingga 54% pada tahun 2001 hingga 2025. Hal tersebut turut memberikan kontribusi terhadap polusi di lingkungan, sekitar 60% penyumbang terbesar efek gas rumah kaca berupa emisi CO<sub>2</sub> yang berasal dari pembakaran bahan bakar fosil (EIA, 1999; Brown *et al.*, 1998). Dalam menanggapi kekhawatiran terhadap kerusakan lingkungan tersebut, penggunaan bahan bakar alternatif seperti bioetanol yang memanfaatkan material biomassa merupakan solusi alternatif dalam upaya pengurangan terhadap pemakaian bahan bakar fosil dan berpotensi menjadi bahan bakar alternatif (Song *et al.*, 2013; Carere *et al.*, 2008; Levin *et al.*, 2004). Beberapa kelebihan bahan bakar bioetanol dibandingkan dengan bahan bakar petroleum yaitu umumnya meminimalisir produksi emisi karbondioksida, oksida nitrat, dan hidrokarbon serta memiliki nilai oktan lebih tinggi (Naik *et al.*, 2010; Wheals *et al.*, 1999).

Bioetanol merupakan alkohol yang diperoleh dari hasil fermentasi gula reduksi dengan melibatkan mikroorganisme dalam proses fermentasi (Tiwari *et al.*, 2011). Kriteria bahan yang dapat digunakan sebagai bahan baku bioetanol antara lain mengandung pati, karbohidrat maupun material berselulosa (Bailey & Ollis, 1986). Proses produksi bioetanol dari tanaman tebu atau gula bit dilakukan dengan mengkonversi gula secara langsung sedangkan produksi secara tidak langsung melalui material berbasis pati dari jagung, gandum, kentang, atau singkong, atau melalui selulosa dari biomassa (Wang, 2000). Pada generasi pertama, bioetanol diproduksi dari hasil pertanian yang memiliki harga tinggi dan masih dibutuhkan dalam skala global (Saxena *et al.*, 2009). Sedangkan pada generasi kedua, bioetanol diproduksi dari bahan lignoselulolitik karena relatif melimpah dan memiliki harga murah (Orozco *et al.*, 2013; Balat,

2011). Beberapa faktor yang menyebabkan bioetanol generasi kedua mahal adalah tingginya harga energy dan enzim yang dibutuhkan pada saat perlakuan awal dan hidrolisis pada proses sakarifikasi dan sulitnya fermentasi gula hexosa dan pentosa. Oleh karena itu, sakarifikasi merupakan tahapan penting untuk memecah gula kompleks menjadi gula sederhana seperti glukosa (Ellison *et al.*, 2013).

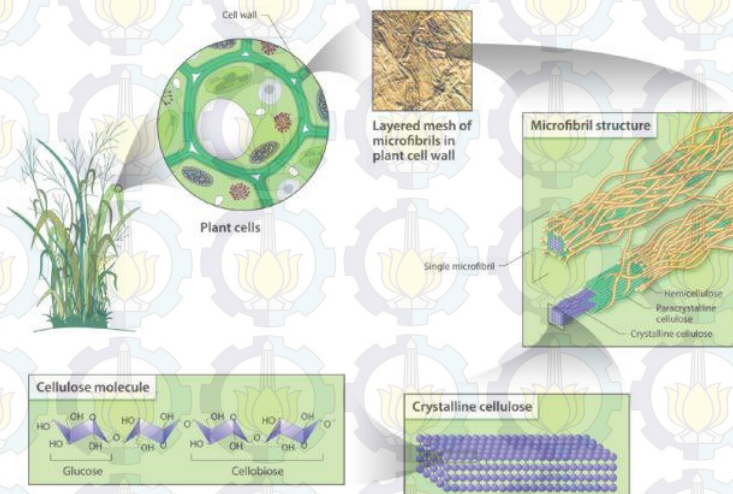
Secara umum tahapan dalam produksi bioetanol dari biomassa selulosa terdiri dari proses pretreatment, hidrolisis (sakarifikasi), fermentasi, dan destilasi. Pretreatment secara fisik maupun kimiawi diperlukan untuk menghilangkan rintangan dan membuat selulosa lebih mudah diakses pada proses hidrolisis. Pada tahap hidrolisis, terjadi konversi molekul gula kompleks menjadi gula sederhana yang akan digunakan dalam proses fermentasi (Zhu *et al.*, 2008). Mikroorganisme yeast berperan dalam proses fermentasi dengan mengubah komponen gula sederhana menjadi etanol, dan pada akhir fermentasi akan dilakukan destilasi untuk mendapatkan bioetanol (Hamelinck *et al.*, 2005; Sun & Cheng, 2002).

## 2.2. Definisi dan Sumber Selulosa

Selulosa adalah polimer berbentuk linear dan dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik dengan unit penyusunnya adalah glukosa (Karnchanatat *et al.*, 2008; Walker & Wilson, 1991). Keberadaan selulosa di alam ditemukan pada dinding sel tumbuhan terutama pada tangkai, batang, dahan, dan semua bagian berkayu dari jaringan tumbuhan. Kandungan selulosa pada tanaman tingkat tinggi sekitar 35-50% dari berat kering tanaman (Lynd *et al.*, 2002).

Selulosa tidak pernah ditemukan dalam keadaan murni di alam, tetapi selalu berasosiasi dengan polisakarida lain seperti lignin dan hemiselulosa sehingga membentuk kesatuan yang keras, kuat dan berfungsi untuk memberikan perlindungan, bentuk, dan penyangga terhadap sel dan jaringan (Lehninger, 1993). Susunan molekul selulosa pada tumbuhan berbentuk

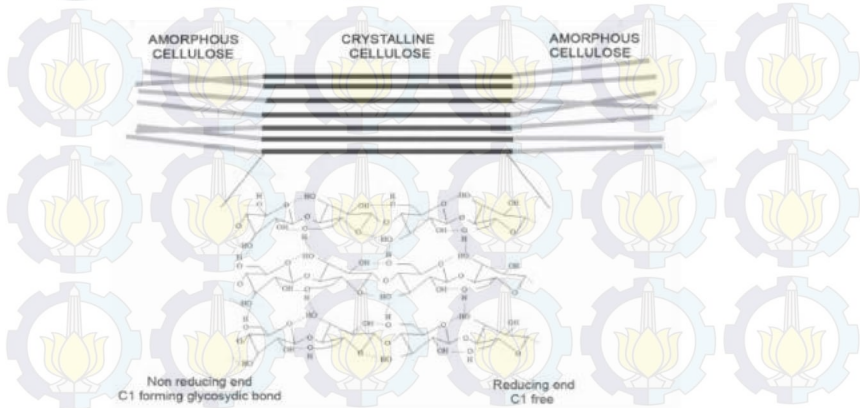
fibril-fibril terdiri atas beberapa molekul paralel yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik (Wuyep *et al.*, 2003; Banjo & Kuboye, 2000; Lynd *et al.*, 2002). Rantai-rantai selulosa akan bergabung menjadi satu kesatuan membentuk mikrofibril, bagian kristalin akan bergabung dengan bagian nonkristalin. Mikrofibril-mikrofibril akan bergabung membentuk fibril, selanjutnya gabungan fibril akan membentuk serat (Klemm, 2004). Fibril-fibril ini membentuk struktur kristal yang dibungkus oleh lignin. Komposisi kimia dan struktur yang demikian membuat kebanyakan bahan yang mengandung selulosa bersifat kuat dan keras. Sifat kuat dan keras yang dimiliki oleh sebagian besar bahan berselulosa membuat bahan tersebut tahan terhadap peruraian secara enzimatik dan secara alamiah peruraian selulosa berlangsung sangat lambat (Walker & Wilson, 1991; Ding & Himmel, 2006). Gambar 2.1. menunjukkan struktur serat selulosa.



**Gambar 2.1** Struktur Serat Selulosa

Selulosa memiliki struktur yang unik karena kecenderungannya membentuk ikatan hidrogen yang kuat. Ikatan hidrogen yang terbentuk sebesar 25 KJ/mol atau setara

dengan seratus kali lebih kuat dari ikatan Van der Waals yang hanya sekitar 0,15 KJ/mol, tetapi kurang dari sepersepuluh kekuatan ikatan kovalen (460 KJ/mol) (Wuyep *et al.*, 2003; Banjo & Kuboye, 2000). Kekuatan yang terbentuk dari ikatan hidrogen baik antar maupun intra menghasilkan struktur yang kuat sehingga menyulitkan penetrasi enzim maupun molekul kecil seperti air (Lynd *et al.*, 2002). Akan tetapi masih dimungkinkan adanya penetrasi molekul besar termasuk selulase pada daerah nonkristalin (amorf) (Gambar 2.2), sehingga pengurangan kristalinitas selulosa dan penghapusan lignin serta hemiselulosa merupakan tujuan penting untuk setiap proses pretreatment (Horn *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2010; Wu & Lee, 1997). Gambar 2.2 dibawah ini menunjukkan bagian kristalin dan nonkristalin pada struktur selulosa.

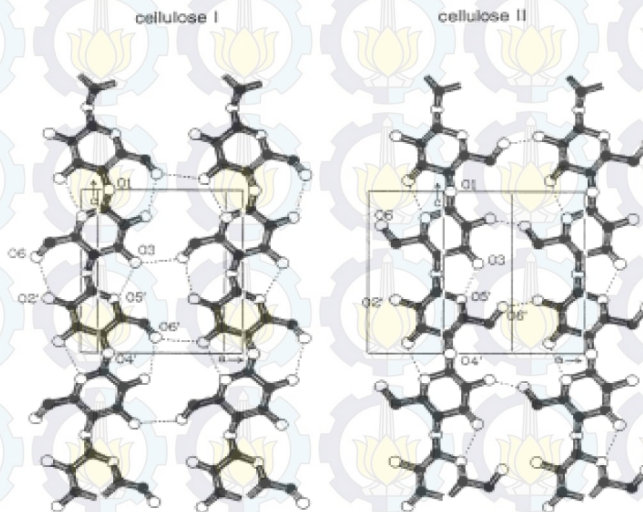


**Gambar 2.2** Struktur Kristalin dan Nonkristalin Pada Selulosa

Struktur selulosa merupakan polimer unit glukosa dihubungkan oleh ikatan hidrogen intramolekular yang terbentuk antara gugus hidroksil C3 pada unit glukosa dan atom O cincin piranosa yang terdapat pada unit glukosa terdekat, gugus hidroksil pada C2 dan atom O pada C6 unit glukosa tetangganya. Ikatan hidrogen antarmolekul terbentuk antara gugus hidroksil C6 dan



atom O pada C3 di sepanjang sumbu b (Gambar 2.3). Dengan adanya ikatan hidrogen serta gaya Van Der Waals yang terbentuk, maka struktur selulosa dapat tersusun secara teratur dan membentuk daerah kristalin. Di samping itu, juga terbentuk rangkaian struktur yang tidak tersusun secara teratur yang akan membentuk daerah nonkristalin atau amorf. Semakin tinggi *packing density*-nya maka selulosa akan berbentuk kristal, sedangkan semakin rendah *packing density* maka selulosa akan berbentuk amorf (Klemm, 2004). Gambar 2.3 menunjukkan ikatan hidrogen intra dan antar molekul.



**Gambar 2.3** Ikatan Hidrogen Intra dan Antar Rantai Selulosa

Peruraian selulosa menjadi produk-produk bernilai ekonomis yang lebih tinggi seperti glukosa dan etanol dapat dilakukan dengan jalan menghidrolisis selulosa menggunakan selulase sebagai biokatalisator atau dengan hidrolisis secara asam/basa (Hu *et al.*, 2008). Beberapa sumber selulosa di alam meliputi limbah pertanian, limbah agroindustri, limbah industri kertas, dan makro alga (rumput laut) (Fengel & Wegener, 1995).

*Eucheuma cottonii* atau yang disebut dengan *Kappaphycus alvarezii* merupakan salah satu jenis rumput laut yang tergolong dalam Rhodophyta (FAO, 2003). Secara umum komponen utama rumput laut tersusun atas polisakarida berupa karageenan yang terdapat didalam dinding sel. Struktur utama karageenan terdiri atas polisakarida berbentuk linear dengan unit penyusunnya berupa  $\alpha$  (1,3)-D-galaktosa-4-sulfat,  $\beta$  (1,4)-3,6-D-galaktosa anhidrat dan polisakarida sulfat (Ellis & Jacquier, 2009). Jimenez-Escrig dan Sanchez-Muniz (2000) menyebutkan bahwa *Kappaphycus alvarezii* terdiri dari kabohidrat dengan tipe yang berbeda yaitu terdiri dari floridean starch ( $\alpha$  -1,4 ikatan glukon), selulosa, xylan, dan mannan. Sumber lain dari selulosa salah satunya adalah kertas. Kertas koran merupakan salah satu jenis kertas yang banyak digunakan sebagai media massa cetak terdiri dari komponen holoselulosa (66,3%), lignin (16,3%), etanol-benzena ekstrak (2,24%) (Fang *et al.*, 2014). Sedangkan kertas saring whatman no.1 (selulosa) merupakan salah satu jenis kertas saring yang tersusun atas komponen 98%  $\alpha$  selulosa dengan sedikit unsur kimia resin.

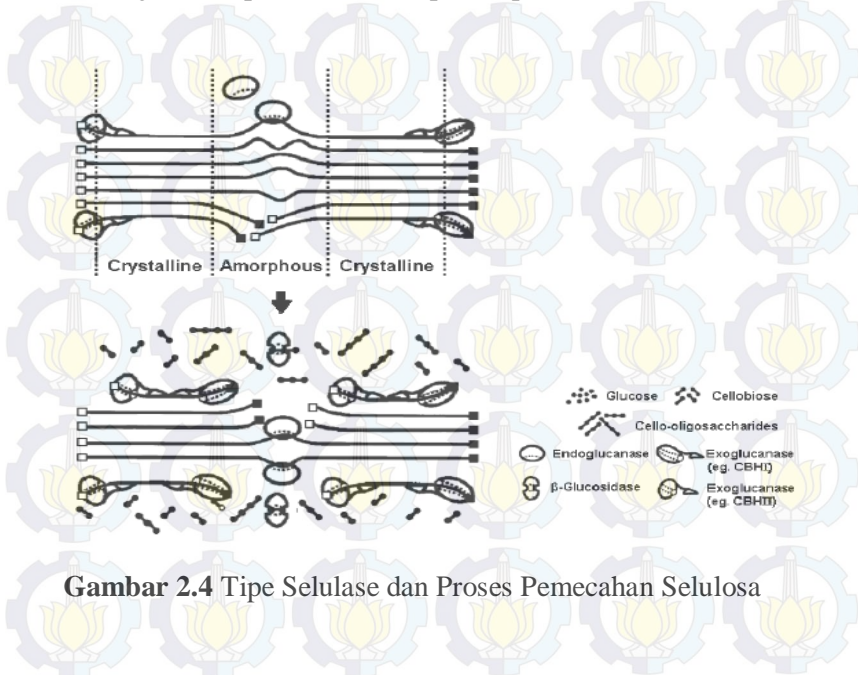
### 2.3. Mekanisme Degradasi oleh Selulase

Enzim adalah katalis biologis senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa ikut bereaksi dalam suatu reaksi kimia organik. Molekul awal yang disebut substrat akan dipercepat perubahannya menjadi molekul lain yang disebut produk. Jenis produk yang akan dihasilkan bergantung pada suatu kondisi/ zat yang disebut promoter. Enzim bekerja dengan cara bereaksi dengan molekul substrat untuk menghasilkan senyawa intermediat melalui suatu reaksi kimia organik yang membutuhkan energi aktivasi lebih rendah, sehingga percepatan reaksi kimia terjadi karena reaksi kimia dengan energi aktivasi lebih tinggi, membutuhkan waktu lebih lama (Palmer, 1995).

Selulase adalah salah satu jenis enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4 pada rantai selulosa menjadi gula sederhana, protein sel tunggal, makanan ternak,

etanol dan lain-lain (Chalal, 1983). Selulase merupakan enzim ekstraseluler yang terdiri atas kompleks endo- $\beta$ -1,4-glukonase (CMCase, Cx selulase endoselulase, atau *carboxymethyl cellulase*) dengan berat molekul antara 22-45 kDa, ekso  $\beta$ -1,4-glukonase (aviselase, selobiohidrolase, C1 selulase) memiliki berat molekul antara 50-64 kDa, dan  $\beta$ -1,4-glukosidase atau selobiase memiliki berat molekul mulai rentang 35-640 kDa (Onishi *et al.*, 1996; Sadana *et al.*, 1988; Sadana *et al.*, 1984).

Selulase atau enzim yang dikenal dengan nama sistematis  $\beta$ -1,4 glukano-4-glukano hidrolase adalah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa. Gambar 2.4 menunjukkan tipe selulase dan proses pemecahan selulosa.



**Gambar 2.4** Tipe Selulase dan Proses Pemecahan Selulosa

Tahap pertama, enzim endoglukonase menyerang daerah amorf dari selulosa secara acak dan membentuk oligosakarida dengan ujung-ujung rantai baru yang dapat memudahkan kerja eksoglukonase. Enzim eksoglukonase selanjutnya mengkatalisis hidrolisis ujung rantai sisa reduksi dan non reduksi dari selulosa dan menghasilkan produk berupa molekul selobiosa. Kerja sama kedua enzim ini menghasilkan unit-unit sakarida lebih kecil seperti selobiosa dan sellodextrin yang selanjutnya dihidrolisis oleh  $\beta$ -glukosidase membentuk gula sederhana seperti glukosa (Quiroz dan Folch, 2011). Hidrolisis parsial selulosa dengan struktur molekul glukukan linear menghasilkan berbagai oligosakarida termasuk selobiosa, cellotriose, dan cellotetrose. Sedangkan hidrolisis sempurna selulosa menggunakan asam sulfat maupun asam mineral lain akan menghasilkan monosakarida berupa glukosa (Segal, 1971; Bertran & Dale, 1986; Klass, 1998).

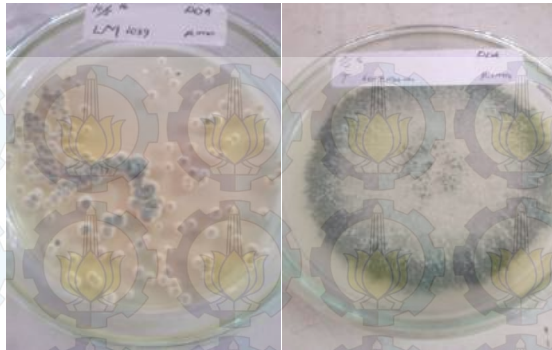
#### **2.4. Mikroorganisme selulolitik**

Mikroorganisme selulolitik memainkan peran penting dalam mendaur-ulang selulosa (Leschine, 1995). Beberapa mikroorganisme yang mampu mendaur ulang selulosa dengan menghasilkan enzim selulolitik antara lain bakteri, *actinomycetes*, dan kapang (Chellapdani & Himanshu, 2008; Kubicek *et al.*, 2008). Kelompok kapang merupakan salah satu dekomposer utama dari ekosistem alami dan mampu membentuk koloni di berbagai kondisi lingkungan. Di alam, kapang merupakan agen-agen kausatif utama dalam proses pembusukan kayu, kapas, kertas, dan lain-lain (Pinzari, 2006). Kelompok kapang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis selulosa melalui aktivitas selulase yang dimilikinya. Beberapa jenis kapang yang telah diteliti memiliki kemampuan dalam mendegradasi seresah dedaunan terdiri dari 30 strain termasuk dalam tujuh genus diantaranya *Gliocladium* (2 strain), *Gonatobotryum* (1 strain), *Syncephalastrum* (1 strain), *Paecilomyces* (2 strain), *Penicillium* (4 strain), *Aspergillus* (10 strain), dan *Trichoderma* (10 strain). Genus *Trichoderma* adalah salah satu kapang yang dikenal

mampu menghasilkan selulase dengan aktivitas enzimatik tinggi (Miettinen & Suominen, 2002; Sun *et al.*, 2010).

*Trichoderma* merupakan kapang subdivisi deuteromycotina, kelas hyphomycetes, ordo moniliaceae. Beberapa karakteristik morfologi genus *Trichoderma* antara lain termasuk dalam kapang berfilamen, memiliki konidiofor bercabang-cabang teratur, konidium berwarna hijau biru serta membentuk koloni yang pada awalnya berwarna putih, selanjutnya miselium akan berubah menjadi kehijau-hijauan dan selanjutnya akan berwarna hijau redup terutama pada bagian yang menunjukkan banyak terdapat konidia. *Trichoderma* termasuk dalam kapang selulolitik yang mampu menghasilkan enzim selobiohidrolase, endoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase yang bekerja secara sinergis dalam mendegradasi selulosa (Miettinen & Suominen, 2002; Deacon, 1997). Penelitian yang dilakukan oleh Beldman *et al.* (1985) mengungkapkan bahwa *Trichoderma viride* mampu menghasilkan 10 jenis enzim selulolitik yang bekerja secara sinergis dalam memecah material selulosa. Enzim-enzim tersebut terdiri dari 6 jenis Endoglukanase (Endo I;II;III;IV;V;VI), 3 jenis eksoglukanase (Exo I;II;III) dan 1 jenis  $\beta$ -glukosidase.

Kelompok kapang genus *Trichoderma* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 koleksi Laboraturium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA ITS yang diisolasi dari bioreaktor ITS dan tanah Wonorejo Pantai Timur Surabaya oleh peneliti sebelumnya. Beberapa pengujian kualitatif yang telah dilakukan menunjukkan bahwa isolat tersebut mampu menghasilkan enzim selulase dan xylanase, serta menghasilkan aktivitas protease (Astutik, 2010). Gambar 2.5 menunjukkan penampakan morfologi kedua isolaat *Trichoderma*.



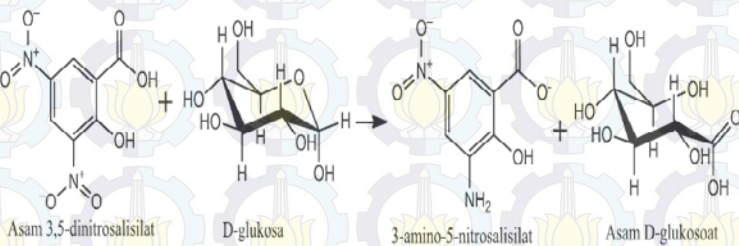
**Gambar 2.5** Tampak Morfologi *Trichoderma* sp. LM 1039 (kiri) dan *Trichoderma harzianum* (kanan)

### 2.5. Analisis Gula Reduksi

Analisis gula reduksi hasil proses hidrolisis dapat dilakukan menggunakan 2 cara yaitu analisis secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis gula reduksi secara kualitatif untuk mengidentifikasi keberadaan gula reduksi dalam sampel, sedangkan analisis gula reduksi secara kuantitatif untuk menentukan kadar gula reduksi pada sampel. Analisis gula reduksi secara kuantitatif dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain dengan metode Luff-Schoorl, Nelson-Somogyi, dan DNS (Adney & Baker, 1996). Metode DNS merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk menentukan kadar gula reduksi. Analisis menggunakan metode DNS menggunakan pereaksi dinitrosalisilat yang terdiri dari asam 3,5-dinitrosalisilat, NaOH,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , Na-K-tartarat, fenol, dan akuades. DNS merupakan senyawa aromatis yang dapat bereaksi dengan gula reduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, suatu senyawa yang mampu menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 540 nm (Adney & Baker, 1996). Semakin tinggi kadar gula reduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam 3-amino-5-

nitrosalisilat yang terbentuk, sehingga absorbansi sampel akan semakin tinggi.

Reaksi antara gula reduksi dengan DNS merupakan reaksi redoks pada gugus aldehyd gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu, DNS sebagai oksidator tereduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Reaksi ini berlangsung dalam suasana basa dan suhu tinggi sekitar 90-100 °C. Apabila di dalam suatu sampel terdapat gula reduksi, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi membentuk warna jingga kemerahan (Adney & Baker, 1996). Reaksi antara DNS dengan glukosa ditunjukkan oleh Gambar 2.6.



**Gambar 2.6** Reaksi antara DNS dan glukosa

Sampel yang telah direaksikan dengan DNS akan ditentukan kadar gula reduksinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrofotometer UV-Vis adalah alat untuk mengukur transmitan atau absorbansi suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrofotometer UV-Vis menggunakan dua buah sumber cahaya yang berbeda, yaitu sumber cahaya UV menggunakan lampu Hidrogen atau Deuterium dan sumber cahaya tampak menggunakan lampu Tungsten. Larutan sampel yang akan dianalisis diukur absorbansi sinar ultra violet atau sinar tampaknya. Konsentrasi larutan sampel yang dianalisis akan sebanding dengan jumlah sinar yang diserap oleh zat yang terdapat dalam larutan tersebut. Prinsip kerja spektrofotometer

UV-Vis ini didasarkan pada Hukum Lambert-Beer yang menyatakan hubungan antara absorbansi cahaya dengan konsentrasi zat dalam larutan.

## 2.6. Fourier Transform Infra Red (FTIR)

Radiasi gelombang elektromagnetik adalah energi yang dipancarkan menembus ruang dalam bentuk gelombang-gelombang atau paket-paket energi. Tiap tipe radiasi gelombang elektromagnetik (mulai dari radiasi gelombang radio hingga radiasi gamma) dicirikan oleh panjang gelombang ( $\lambda$ ) atau frekuensi ( $\nu$ ) dari gelombang tersebut. Ketika suatu radiasi gelombang elektromagnetik mengenai suatu materi, akan terjadi suatu interaksi yang berupa penyerapan energi (absorpsi) oleh atom-atom atau molekul-molekul dari materi tersebut (Carrilo *et al.*, 2004).

Absorpsi sinar ultraviolet dan cahaya tampak oleh suatu materi akan mengakibatkan tereksitasinya elektron dari tingkat energi (orbital) rendah ke tingkat-tingkat energi yang lebih tinggi. Pada absorpsi radiasi infra merah oleh suatu materi, radiasi yang diserap tersebut tidak cukup mengandung energi untuk mengeksitasi elektron, namun akan menyebabkan membesarnya amplitudo getaran (vibrasi) dari atom-atom yang terikat satu sama lain yang membentuk suatu ikatan molekul. Keadaan ini disebut dengan *vibrasi tereksitasi* (Corgié, 2011).

Salah satu metode spektroskopi yang sangat populer digunakan adalah metode spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infrared*), yaitu metode spektroskopi inframerah modern yang dilengkapi dengan teknik transformasi Fourier untuk deteksi dan analisis hasil spektrumnya. Spektroskopi inframerah berguna untuk identifikasi senyawa organik karena spektrumnya yang sangat kompleks yang terdiri dari banyak puncak-puncak. Selain itu, masing-masing kelompok fungsional menyerap sinar inframerah pada frekuensi yang unik (Hinterstoisser & Salmén, 2000; Persson *et al.*, 2011). Dalam hal ini metode spektroskopi yang digunakan adalah metode spektroskopi absorpsi, yaitu metode spektroskopi yang didasarkan atas perbedaan penyerapan



radiasi inframerah oleh molekul suatu materi. Absorpsi inframerah oleh suatu materi dapat terjadi jika dipenuhi dua syarat, yakni kesesuaian antara frekuensi radiasi inframerah dengan *frekuensi vibrasional* molekul sampel dan perubahan momen dipol selama bervibrasi (Chatwall, 1985). Gambar 2.7 menunjukkan perangkat FTIR.



**Gambar 2.7 Perangkat Analisis FTIR**

## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga bulan Mei 2016 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

### **3.2. Metode yang Digunakan**

Tahapan penelitian ini diawali dengan persiapan media kultur dan media aklimatisasi dilanjutkan dengan peremajaan *Trichoderma* sp. Tahap berikutnya merupakan proses isolasi dan produksi selulase pada substrat jerami padi. Setelah diperoleh enzim dengan aktivitas tertinggi, maka dilakukan karakterisasi enzim meliputi uji aktivitas selulase, uji kadar protein, titik isoelektrik dan SDS-PAGE. Selanjutnya *crude* enzim diaplikasikan pada substrat berbasis selulosa meliputi rumput laut, kertas koran, dan kertas saring whatman no 1, lalu diinkubasi pada suhu 50 °C selama 24 jam. Sampel hasil inkubasi dilakukan analisis gugus fungsi menggunakan FTIR dan kadar gula reduksi menggunakan metode DNS (Lampiran 1).

### **3.2.1 Produksi Selulase oleh *Trichoderma* sp.**

#### **3.2.1.1 Preparasi Bubuk Jerami Padi**

Preparasi bubuk jerami padi dilakukan dengan mencuci jerami padi dengan menggunakan air hingga bersih. Kemudian jerami padi dikeringkan anginkan selama 4-5 hari lalu dipotong-potong berukuran 2 cm. Jerami padi yang telah dipotong selanjutnya dihancurkan dan dihaluskan hingga membentuk bubuk. Bubuk jerami yang terbentuk selanjutnya dilakukan *pre-treatment* alkali dengan cara dikukus selama 10 menit.

#### **3.2.1.2 Peremajaan dan Aklimatisasi *Trichoderma* sp.**

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi,

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Peremajaan isolat *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 dilakukan dengan menggunakan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Lampiran 2) dan media *Potato Dextrose Broth* (PDB) (Lampiran 3).

Isolat *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 dikultur pada media yang mengandung selulosa supaya terkalimatisasi tumbuh dengan menggunakan selulosa sebagai sumber karbon. Aklimatisasi dilakukan dengan cara memindahkan 10 % kultur *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 dari media PDB dalam 200 ml media PDB termodifikasi (Lampiran 4). Kultur isolat dalam media PDB termodifikasi diinkubasi selama 7 hari menggunakan *rotary shaker* pada suhu ruang. Kemudian sebanyak 10 % kultur isolat dari media PDB temodifikasi dipindahkan kedalam 250 media Mendel's yang mengandung bubuk jerami padi (Lampiran 5) dan diinkubasi menggunakan *rotary shaker* pada suhu ruang selama 7 hari.

### **3.2.1.3 Preparasi Starter *Trichoderma* sp.**

Persiapan starter dibuat dengan cara memindahkan sebanyak 10 % kultur *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 dari media Mendel's lama kedalam 50 ml media Mendel's baru yang mengandung bubuk jerami padi. Kultur isolat dalam media Mendel's baru diinkubasi menggunakan *rotary shaker* pada suhu ruang selama 7 hari. Pertumbuhan *Trichoderma* sp. diamati setiap hari dengan cara mengukur biomassa kering kapang menggunakan *analitical balance*. Isolat *Trichoderma* sp. pada fase eksponensial digunakan sebagai starter dalam fermentasi cair untuk produksi selulase.

### **3.2.1.4 Produksi dan Isolasi Selulase**

Selulase diperoleh melalui teknik fermentasi oleh *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039. Produksi selulase dilakukan dengan menginokulasikan starter sebanyak 10 % dalam Erlenmayer yang mengandung 50 ml media fermentasi (media Mendels). Kultur diinkubasi menggunakan *rotary shaker*

pada suhu ruang ( $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ) hingga fase stasioner. Setelah tercapai fase stasioner, isolasi selulase dilakukan menggunakan metode sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu  $4^\circ\text{C}$  untuk memisahkan miselium fungi dan enzim. Hasil sentrifugasi pada bagian supernatan inilah yang merupakan ekstrak enzim kasar yang akan diamati aktivitas dan kandungan proteinnya, selanjutnya dilakukan pemurnian enzim dan karakterisasi enzim lainnya.

### 3.2.2 Purifikasi Selulase *Trichoderma* sp.

Purifikasi selulase dilakukan dengan cara penambahan ammonium sulfat padat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kedalam larutan enzim kasar selulase sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* dengan tingkat kejenuhan 0-30%, 30%-45%, 45%-60%, 60%-75%, dan 75%-90%. Pada tingkat kejenuhan 0-30% (fraksi I) ditambahkan sebanyak 2,40 gr  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tingkat kejenuhan 30%-45% (Fraksi II) ditambahkan sebanyak 1,78 gr  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tingkat kejenuhan 45%-60% (fraksi III) ditambahkan sebanyak 1,87 gr  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tingkat kejenuhan 60%-75% (fraksi IV) ditambahkan sebanyak 1,96 gr  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dan pada tingkat kejenuhan 75%-90% (fraksi V) ditambahkan sebanyak 2,07 gr  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Pada masing-masing tingkat kejenuhan, penambahan ammonium sulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dilakukan sedikit demi sedikit ke dalam 20 ml larutan enzim kasar sambil diaduk menggunakan kaca pengaduk. Setelah  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  larut, larutan enzim kasar dibiarkan selama satu jam pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Kemudian larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Supernatan hasil sentrifugasi digunakan untuk tahap fraksinasi selanjutnya. Sementara itu, fraksi protein yang mengendap (natan) dilarutkan dalam buffer fosfat (pH 7,0-7,2) (Lampiran 6). Fraksi-fraksi protein dalam ammonium sulfat yang diperoleh akan dilakukan karakterisasi meliputi aktivitas enzim, kandungan protein, titik isoelektrik dan berat molekul enzim (SDS-PAGE).

### 3.2.3 Karakterisasi Selulase

#### 3.2.3.1 Uji Aktivitas Selulase

Kurva standar glukosa dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 10 mg glukosa anhidrat ke dalam aquades 10 ml (Lampiran 7). Larutan yang diperoleh memiliki konsentrasi akhir 1 mg/ml, larutan ini menjadi larutan stock standar yang satuannya dikonversi menjadi  $\mu\text{M/ml}$ . Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat dengan penambahan akuades sehingga diperoleh variasi konsentrasi glukosa anhidrat. Pada masing-masing variasi konsentrasi glukosa anhidrat, diambil sebanyak 0,2 ml kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 1,8 ml akuades dan 3 ml reagen DNS. Tabung reaksi dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit agar terjadi reaksi antara glukosa dan DNS. Selanjutnya tabung didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Angka absorbansi DNS diukur pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm (Kodri *et al.*, 2013).

Pengujian aktivitas enzim selulase diukur menggunakan metode iqbal *et al.*, (2011) yang telah dimodifikasi. Larutan digesti yang terdiri dari 1,8 ml substrat CMC (*carboxymethyl cellulase*) 2% dalam buffer sitrat (pH 5 dengan konsentrasi 0,005 M), dan 0,2 ml supernatan (ekstrak kasar selulase) yang di inkubasi selama 30 menit pada suhu 50 °C di dalam *waterbath*. Setelah akhir waktu inkubasi, sampel diambil kemudian reaksi diterminasi dengan penambahan 3 ml reagen DNS, selanjutnya dipanaskan selama 5 menit dalam air mendidih hingga terjadi perubahan warna dan segera didinginkan. Aktivitas enzim diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Konversi kadar glukosa ke dalam unit aktivitas menggunakan rumus (Ghose, 1987):

$$IU = \frac{\mu\text{M glukosa}}{\text{ml} * \text{waktu}}$$

### 3.2.3.2 Uji Kandungan Protein

Metode Bradford (1967) merupakan salah satu metode pengukuran kadar protein dengan menggunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA). Prinsip metode ini adalah pembentukan ikatan antara zat warna *Coomassie Brilliant Blue G-250* dengan protein sehingga dapat diukur nilai *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm.

Reagen Bradford dibuat dengan melarutkan 200 mg *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 kedalam 10 ml etanol 95 % dan ditambahkan 20 ml asam fosfor 8,5 %. Kemudian larutan dilarutkan dengan akuades hingga volume akhir mencapai 200 ml.

Kurva standart protein dibuat dengan menimbang *Bovine Serum Albumin* (BSA) 10 mg dan dilarutkan dalam 10 ml akuades sehingga diperoleh konsentrasi (w/v). Larutan yang diperoleh memiliki konsentrasi akhir 1 mg/ml. Larutan ini menjadi larutan stock standar yang selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat dengan penambahan akuades sehingga diperoleh variasi konsentrasi dari larutan stok BSA. Pada masing-masing variasi konsentrasi, diambil sebanyak 0,1 ml dan ditambahkan 5 ml reagen Bradford. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Nilai absorbansi dibuat dalam bentuk kurva standar dengan persamaan  $y = ax+b$ , dimana y adalah nilai absorbansi dan x adalah nilai konsentrasi protein standar BSA (Lampiran 8).

Pengukuran kadar protein selulase dilakukan dengan cara mereaksikan sebanyak 0,1 ml larutan selulase dengan 5 ml reagen Bradford. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 595 nm. Kadar protein enzim dapat ditentukan berdasarkan persamaan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumine*) yang telah dibuat sebelumnya.

### 3.2.3.3 Titik Isoelektrik

Prinsip pada pengujian ini adalah pembentukan endapan kekeruhan paling cepat atau paling banyak merupakan titik isoelektrik (Burgess dan Thomson, 2002). Analisis dilakukan dengan mempersiapkan 6 tabung reaksi bersih dan kering, kemudian dimasukkan 1 ml selulase pada tiap tabung. Ditambahkan 1 ml larutan buffer asetat dari pH 3,4,5,6,7 dan 8 pada setiap tabung. Kemudian tabung dikocok dan dicatat derajat kekeruhannya setelah 0, 10 dan 30 menit. Diamati hasilnya pada tabung dengan pembentukan endapan maksimal. Selanjutnya semua tabung dipanaskan diatas penangas air dan diamati hasilnya.

### 3.2.3.4 Analisis Elektroforesis SDS-PAGE

Elektroforesis merupakan metode pemisahan fraksi campuran berdasarkan pergerakan partikel-partikel koloid yang bermuatan dibawah pengaruh medan listrik. Pergerakan molekul tersebut dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, muatan dan sifat biologi dan kimia molekul serta pengaruh voltase diantara elektroda. Pergerakan suatu partikel bermuatan pada medan listrik didefinisikan sebagai mobilitas (Renee *et al*, 1985). Prinsip SDS-PAGE adalah menentukan bobot molekul dan tingkat kemurnian suatu sampel.

Pembuatan gel merupakan langkah awal yang dilakukan dalam elektroforesis. Metode yang digunakan dalam pembuatan gel adalah metode Bollag dan Edelstein (1991). Bahan yang digunakan dalam membuat separating gel dicampur satu persatu dan pada akhir campuran ditambahkan dengan tertrametilen diamina (TEMED). Larutan tersebut diaduk dan dipipet perlahan kedalam plate kaca sampai 1,5 cm dari permukaan kaca lalu didiamkan sekitar 15-20 menit. Dalam proses ini diusahakan agar tidak terbentuk gelembung udara. Setelah gel memadat, campuran stacking gel dipipet perlahan ke dalam plate kaca lalu dengan segera dimasukkan sisir (10 sumuran) sebagai tempat memasukkan sampel.

Sampel dipanaskan pada suhu 100 °C selama 3 menit kemudian dicampurkan dengan buffer sampel dan dilakukan loading sampel ke dalam sumuran sebanyak 12 µl. Sedangkan Marker (silver staining) yang dimasukkan dalam sumuran sebanyak 10 µl. Sebelum running, dimasukkan buffer elektroforesis ke dalam chamber. Selanjutnya running elektroforesis dilakukan selama 1,5 jam pada tegangan 100 volt, 50 mA dalam kondisi dingin.

Setelah pemisahan, gel dilepas dari plate kaca lalu direndam dalam larutan fiksasi (25% metanol + 12% asam asetat) 24 selama 1 jam. Selanjutnya, gel tersebut direndam dalam larutan etanol 50% selama 20 menit dan larutan etanol 30% selama 2 x 20 menit. Setelah itu, gel tersebut direndam dalam larutan *enhancer* (larutan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) selama 1 menit. Gel kemudian dicuci dengan akuabides selama 3 x 2 menit. Setelah dicuci dengan akuabides, gel direndam dalam larutan staining *Coomassie Brilliant Blue* selama 30 menit lalu dibilas cepat dengan akuabides selama 2 x 20 detik. Kelebihan warna dihilangkan dengan larutan *destaining* (larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + formaldehida 37%) sampai diperoleh pita-pita protein yang jelas teramati dengan latar belakang yang relatif jernih. Reaksi dihentikan dengan menggunakan larutan fiksasi (Bollag dan Edelstein, 1991).

### **3.3. Hidrolisis Enzimatik Pada Substrat Berselulosa**

Substrat yang digunakan dalam sakarifikasi meliputi kertas koran, rumput laut, dan kertas whattman no. 1. Enzim selulolitik yang digunakan dalam sakrifikasi berasal dari fermentasi cair oleh *Trichoderma* sp. Modifikasi enzimatik pada substrat yang mengandung selulosa dilakukan dengan cara meraksikan secara langsung antara substrat selulosa dalam bentuk bubuk dengan *crude* enzim selulase. Sakarifikasi dilakukan dalam Erlenmayer 250 ml dengan memasukkan sebanyak 0,5 gr substrat berselulosa ditambahkan 0,5 ml *crude* enzim dalam 30 ml buffer sitrat 0,05 mol/L pH 5. Selanjutnya campuran tersebut diletakkan



inkubator shaker pada suhu 50 °C selama 18 jam. Pengukuran kadar gula tereduksi sampel dari proses sakarifikasi dilakukan setiap 6 jam selama 18 jam menggunakan metode DNS berdasarkan nilai absorbansi sampel di spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Miller, 1959).

#### **3.4. Analisis Gugus Fungsi**

FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi senyawa organik (Khopkar, 1990). Pengukuran gugus fungsi diawali dengan persiapan sampel. Substrat berbasis selulosa hasil modifikasi dikeringkan menggunakan oven. Selanjutnya sampel dimasukkan dalam instrument FTIR. Dilakukan pembacaan gugus fungsi pada range spektrum 400 hingga 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

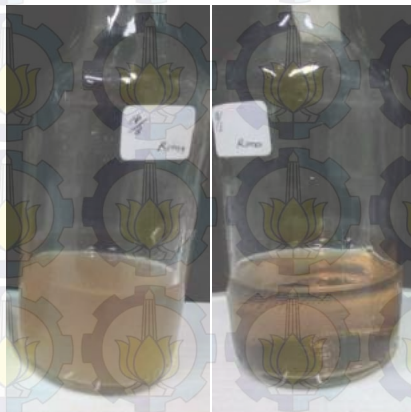
#### **3.5. Analisis Data**

Penelitian ini bersifat deskriptif kuantitatif. Parameter yang diamati adalah tingkat gula reduksi dari hasil hidolisis enzimatik pada tiga substrat meliputi kertas koran, rumput laut, dan kertas saring whatman dengan 3 kali pengulangan.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Produksi dan Isolasi Enzim

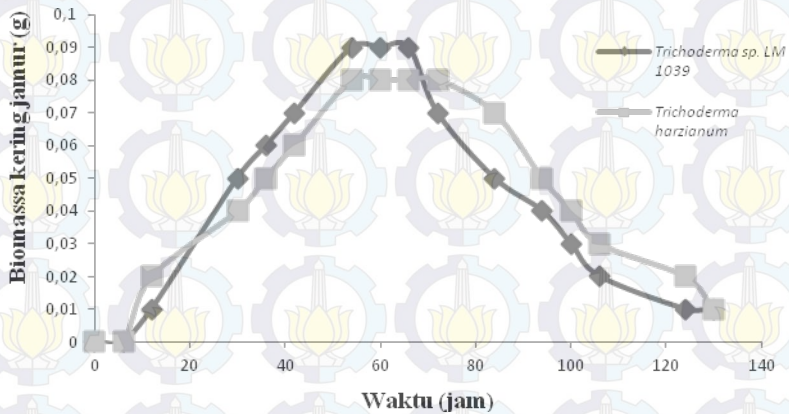
Produksi selulase dilakukan melalui teknik fermentasi oleh isolat *Trichoderma* sp. pada medium Mendels yang mengandung jerami padi sebagai sumber karbon berupa selulosa. Hasil dari fermentasi oleh isolat *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 pada medium Mendels menunjukkan adanya perubahan secara visual pada warna medium yang awalnya coklat keruh menjadi coklat bening setelah 3 hari inkubasi (Gambar 4.1). Gambar 4.1 menunjukkan perbedaan warna medium sebelum dan sesudah fermentasi.



**Gambar 4.1** Perbedaan Warna Pada Medium Mendels Sebelum Fermentasi (Kiri) dan Setelah Fermentasi (Kanan)

Isolasi enzim dilakukan setelah masa fermentasi. Kurva pertumbuhan diperlukan untuk mengetahui waktu yang tepat untuk isolasi enzim. Kurva pertumbuhan isolat *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 pada medium Mendels (Gambar 4.2) terdiri dari fase lag (adaptasi), fase eksponensial merupakan fase pertumbuhan optimal mikroorganismenya sebab ketersediaan jumlah nutrisi yang melimpah. Fase stasioner

merupakan keadaan yang dicirikan dengan jumlah pertumbuhan setara dengan jumlah kematian mikroorganismen akibat nutrisi dalam medium mulai menipis sehingga terjadi akumulasi produk sisa yang dapat menghambat pertumbuhan (Madigan *et al*, 2012).



**Gambar 4.2** Kurva Pertumbuhan *Trichoderma* sp. dalam 50 ml Medium Mendels

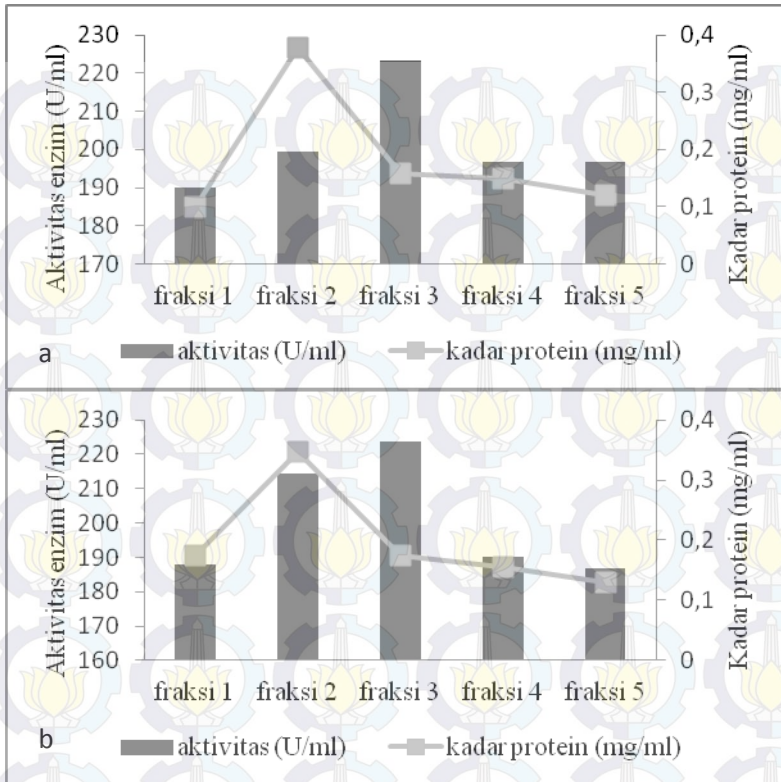
Pada Gambar 4.2 tampak bahwa fase lag dimulai dari jam ke-0 hingga jam ke-6 dan berlangsung singkat karena inokulum *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 yang digunakan sebagai starter telah teraklimatisasi dalam medium yang mengandung selulosa. Fase eksponensial dimulai pada jam ke-6 hingga jam ke-54. Pada fase ini terjadi pertumbuhan isolat secara pesat dengan memanfaatkan satu-satunya sumber karbon berupa selulosa yang dihidrolisis menggunakan enzim selulase. Pada jam ke-54 hingga jam ke-66 isolat *Trichoderma* memasuki fase stasioner yang menunjukkan bahwa tingkat pertumbuhan dan kematian isolat seimbang sehingga tidak terdapat pertumbuhan mikroorganismen. Pada fase ini selulase mulai diproduksi karena selulase merupakan metabolit sekunder yang akan diinduksi dan

diproduksi bila tersedia substrat spesifik berupa kompleks selulosa selain itu hal ini diduga berkaitan dengan pengaktifan CCR (*carbon catabolite repression*) yang merupakan pengontrol ekspresi gen pengkode enzim selulase pada isolat *Trichoderma*. Pengaktifan CCR tersebut akan menghasilkan enzim ekstraseluler yang akan menghidrolisis selulosa guna memenuhi kebutuhan karbon yang semakin menipis (Foreman *et al.*, 2003; Ilman *et al.*, 1969). Ketika kultur telah memasuki fase stasioner, isolasi enzim dilakukan sebab enzim selulase terakumulasi secara maksimal di dalam media kultur. Hal ini sesuai dengan pernyataan Foreman *et al.* (2003) bahwa produksi enzim selulase meningkat ketika memasuki fase stasioner. Isolasi enzim dilakukan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit sehingga dihasilkan supernatan yang merupakan ekstrak kasar selulase yang bebas dari sel mikroba.

Formulasi medium untuk menentukan profil pertumbuhan *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 pada Gambar 4.1 di atas menggunakan jerami padi sebagai sumber karbon. Hal ini menjadi penting karena diharapkan *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 dapat teradaptasi dengan ketersediaan sumber karbon dalam bentuk polimer panjang (Willey *et al.*, 2008). Menurut Rolfe *et al.* (2012) bahwa mikroorganisme akan memanfaatkan sumber karbon yang tersedia dilingkungan sekitarnya ketika sumber karbon utamanya tidak tersedia.

#### **4.2. Purifikasi dan Karakterisasi Enzim**

Pemurnian selulase menggunakan garam amonium sulfat dengan konsentrasi bertingkat bertujuan untuk memisahkan protein tertentu berdasarkan tingkat kelarutannya (*Salting out*) (Juan, 1990). Hasil purifikasi selulase pada isolat *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 dapat diamati pada Gambar 4.3.



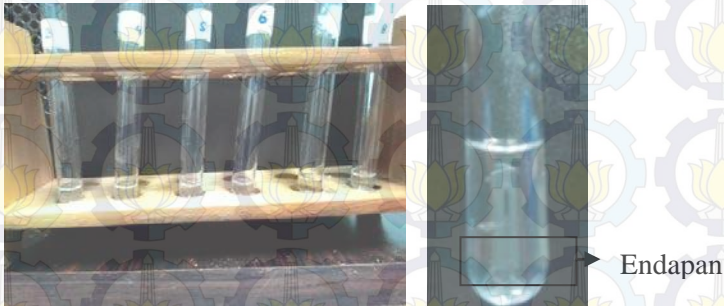
**Gambar 4.3** Aktivitas Enzim dan Kadar Protein Isolat a). *Trichoderma sp. LM 1039* b). *Trichoderma harzianum*

Pada Gambar 4.3 dapat dilihat bahwa nilai aktivitas spesifik selulase tertinggi dari isolat *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma sp. LM 1039* tercapai pada fraksi ke 3 yaitu sebesar 223,84 U/ml dan 223,334 U/ml. Hal ini menunjukkan bahwa protein selulase terkonsentrasi pada fraksi tersebut dan selaras dengan tujuan purifikasi yaitu untuk meningkatkan kemampuan protein fungsional sehingga aktifitasnya semakin tinggi.

Untuk mengkonfirmasi hasil purifikasi protein selulase, maka dilakukan karakterisasi dengan uji kandungan protein, titik

isoelektrik dan SDS-PAGE. Kadar protein tertinggi yang diperoleh melalui uji Bradford setelah purifikasi terdapat pada fraksi ke-2 yaitu sebesar 0,347 mg/ml pada isolat *Trichoderma harzianum* dan 0,378 mg/ml pada isolat *Trichoderma* sp. LM 1039.

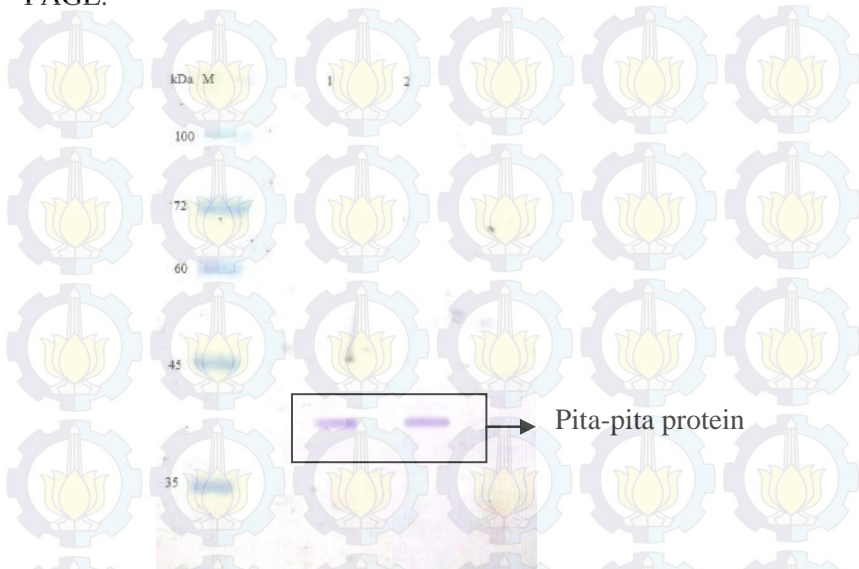
Titik isoelektrik merupakan kondisi molekul protein mempunyai muatan positif dan negatif yang sama sehingga saling menetralkan atau bermuatan nol (Tsigos & Bouriotis, 1995). Titik isoelektrik selulase yang terpurifikasi tercapai pada pH 5 yang mencirikan karakter selulase akan terkoagulasi pada rentang pH 3,5 - 5,5 (Chandra *et al.*, 2009). Berdasarkan hal tersebut, maka diduga bahwa asam amino dalam protein enzim dominan bermuatan negatif. Gambar 4.4 menunjukkan adanya koagulasi yang menandakan titik isoelektrik enzim selulase.



**Gambar 4.4** Titik Isoelektrik Enzim Selulase

Pengujian konfirmasi selanjutnya terkait selulase adalah pengujian berat molekul menggunakan SDS-PAGE. SDS-PAGE merupakan salah satu metode PAGE yang digunakan untuk analisa campuran protein secara kualitatif. Prinsip penggunaan metode ini adalah migrasi komponen akrilamid dengan N.N' bisakrilamid. Metode ini sering digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein disamping untuk memonitor pemurnian protein (Wilson & Walker, 2000). Gambar 4.5 berikut

menunjukkan pita-pita protein selulase hasil elektroforesis SDS-PAGE.



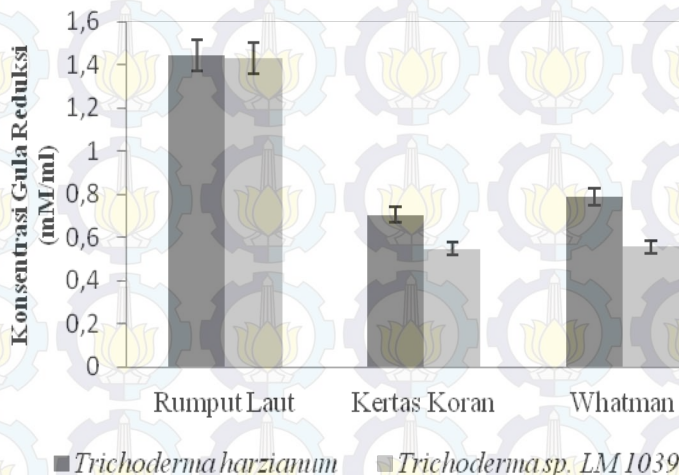
**Gambar 4.5** Elektroforesis SDS-PAGE Pada Fraksi Protein 45-60 % (M) Marker, (1) *Trichoderma harzianum*, dan (2) *Trichoderma* sp. LM 1039

Berdasarkan Gambar 4.5 terdapat 1 pita protein yang terlihat dengan jelas dari hasil elektroforesis SDS-PAGE. Pita protein tersebut terletak pada rentang 35 kDa hingga 45 kDa dengan berat molekul sebesar 40,36 kDa. Sehingga diduga bahwa besar berat molekul tersebut merupakan berat molekul salah satu kompleks selulase yaitu endoglukanase. Hal ini sesuai dengan pernyataan yang menyatakan bahwa endoglukanase V (EG V) memiliki berat molekul sebesar 40 kDa (Hassan & El-Adway, 2011).

### 4.3. Tingkat Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzimatik

Gula reduksi hasil dari proses hidrolisis enzimatik dianalisis menggunakan metode *3-5-dinitrosalicylic acid* (DNS) (Miller, 1959). Hasil pengukuran gula reduksi selama hidrolisis enzimatik menggunakan crude enzim isolat *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 pada berbagai substrat ditunjukkan oleh Gambar 4.6.

Berdasarkan Gambar 4.6, tampak bahwa konsentrasi gula reduksi tertinggi yang dihasilkan selama hidrolisis enzimatik terdapat pada substrat rumput laut. Hidrolisis enzimatik pada substrat rumput laut menghasilkan konsentrasi gula reduksi tertinggi yaitu sebesar 1,4 mM/ml dibandingkan pada substrat kertas koran dan kertas saring whatman yang hanya sebesar 0,5 mM/ml dan 0,7 mM/ml. Hal ini dimungkinkan disebabkan oleh perbedaan kristalinitas dari substrat selulosa, selain itu diduga dipengaruhi oleh faktor sisi aktif (*active site*) enzim yang terikat pada substrat (Davies & Hanrissat, 1995).



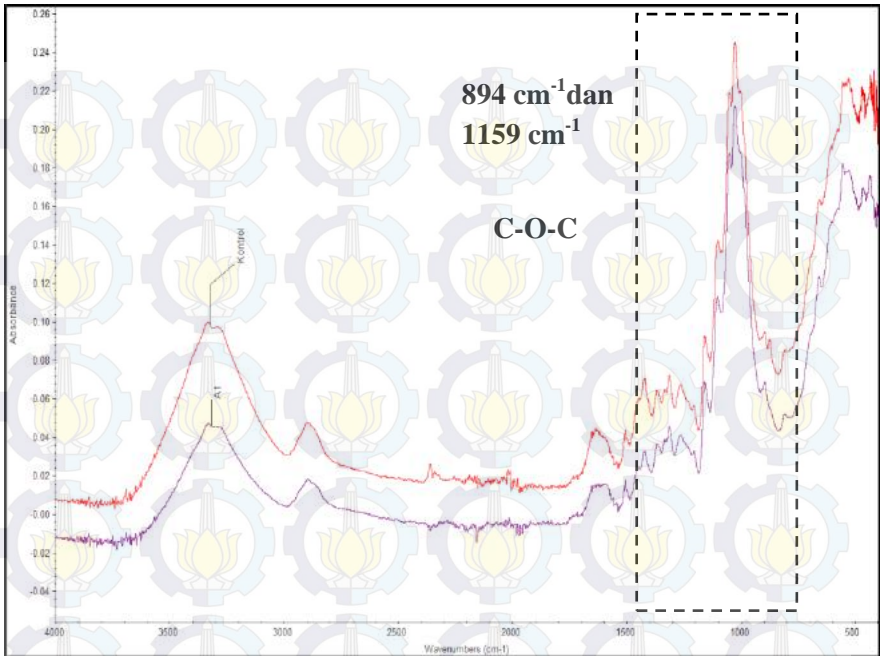
**Gambar 4.6** Tingkat Gula Reduksi Setelah Hidrolisis Enzimatik



#### 4.4. Analisis FTIR Hasil Modifikasi Enzimatis

FTIR merupakan salah satu teknik analisis kualitatif yang berfungsi untuk mengetahui perubahan komponen modifikasi dan analisis gugus fungsi senyawa organik. Hasil analisis FTIR setelah hidrolisis enzimatis pada beberapa substrat selulosa ditunjukkan oleh Gambar 4.7.

Berdasarkan Gambar 4.7, tampak bahwa terjadi perubahan pada intensitas panjang gelombang  $894\text{ cm}^{-1}$  yang ditandai dengan penguatan *peak* antara kontrol dengan sampel. Hal ini sesuai dengan penelitian yang menyebutkan bahwa hasil hidrolisis secara enzimatis terdeteksi terjadi perubahan pada *peak* di rentang panjang gelombang 1500 hingga  $894\text{ cm}^{-1}$ . Hidrolisis secara enzimatis menyebabkan terjadinya pemutusan pada gugus eter (C-O-C) di rantai polimer selulosa (Ciolacu *et al.*, 2011; Dai & Fan, 2011).



**Gambar 4.7** Analisis FTIR Hidrolisis Enzimatis pada Substrat Koran

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

*Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 mampu menghasilkan selulase yang memiliki aktivitas spesifik sebesar 223,89 U/ml dan 223,334 U/ml dengan kadar protein tertinggi sebesar 0,347 mg/ml dan 0,378 mg/ml. Hasil uji karakterisasi enzim, kedua isolat memiliki titik isoelektrik pada pH 5 sehingga protein enzim didominasi oleh asam amino bermuatan negatif dengan berat molekul 40,36 kDa. Penggunaan *crude* selulase dari kedua isolat dalam hidrolisis enzimatis pada beberapa substrat berselulosa menunjukkan bahwa kadar gula reduksi tertinggi terdapat pada substrat rumput laut yaitu 1,4 mM/ml. Sedangkan hasil analisis FTIR pada substrat yang termodifikasi menunjukkan adanya perubahan *peak* pada  $894\text{ cm}^{-1}$  yang mengindikasikan gugus eter (C-O-C).

#### 5.2. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu pemilihan strain merupakan hal yang sangat penting untuk dapat memproduksi selulase dengan aktivitas yang tinggi. Selain itu diperlukan suatu inducer untuk memaksimalkan dalam produksi enzim.

## DAFTAR PUSTAKA

Adney, J., dan Baker, J. 1996. Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP). **Department of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy**. DE-AC36-99-GO10337.

Bailey, J.E., dan Ollis, D.F. 1986. **Biochemical Engineering Fundamentals**, 2<sup>nd</sup> ed. New York : Mc Graw Hill publication.

Balat, M. 2011. Production of Bioethanol from Lignocellulosic Materials via the Biochemical Pathway: A Review. **Energy Convers. Manage.** 52, 858–875.

Banjo, N., dan Kuboye, A. 2000. Comparison of the Effectiveness of some Common Agroindustrial Wastes in Growing Three Tropical Edible Mushrooms. **Proceedings of the Internal Conference on Biotechnology: Commercialization and Food Saffly**, Nigeria, 161-168.

Beldman, G., Searle, V.L., Rombouts, M. F., Voragen, F.G. 1985. The Cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, Characterization and Comparison of all Detectable Endoglucanases, Exoglucanases and Beta- Glucosidases. **Eur. J. Biochem.** 146: 301-308.

Bertran, M., dan Dale, B. 1986. Determination of Cellulose Accessibility by Differential Scanning Calorimetry. **J. Appl. Polym. Sci.**, 32, 4241-4253.

Bollag, D., dan Edelstein, S.J. 1991. **Protein Methods**. New York : John Wiley and Sons.

Brown, M.A., Levine, M.D., Romm, JPRAH, dan Koomey, J.H. 1998. Engineering-Economic Studies of Energy Technologies to

Reduce Greenhouse Gas Emissions: Opportunites and Challenges. **Annual review of energy environment**, 23, 31-39.

Carere, Carlo R., Sparling, Richard, Cicek, Nazim, dan Levin, D.B. 2008. Third Generation Biofuels via Direct Cellulose Fermentation. **Int. J. Mol. Sci** 9: 1342-1360.

Carrilo, F., Colom, X., Suñol, J.J., dan Saurina, J. 2004. Structural FTIR analysis and thermal characterization of lyocell and viscose-type fibres. **Eur. Polym. J.** 40: 2229-2234.

Chandra, M., Kalra, A., Sharma, P.K., Sangwan, R.S. 2009. Cellulase Production by Six *Trichoderma* spp. Fermented on Medicinal Plant Processing. **J Ind Microbiol Bioethanol** 36:605-609.

Chatwall, G. 1985. **Spectroscopy Atomic and Molecule**. Bombay : Himalaya Publishing House.

Chellapdani, P., dan Himanshu, M. 2008. Production of Endoglucanase by the Native Strains of *Streptomyces* Isolates in Submerged Fermentation. **Braz. J. Microbiol.**, 39, 122-127.

Ciolacu, D., Cilolacu, F., dan Popa, V.I. 2011. Amorphous Cellulose-Structure and Characterization. **Cellulose Chem. Technol.**, 45 (1-2), 13-21.

Corgié, S.C., Smith, H.M., dan Walker, L.P. 2011. Enzymatic transformations of cellulose assessed by quantitative high-throughput Fourier transform infrared spectroscopy (QHT-FTIR). **Biotechnol. Bioeng.** 108: 1509-1520.

Dai, D., dan Fan, M. 2011. Investigation of the Dislocation of Natural Fibres by Fouriertransform Infrared Spectroscopy. **Spectroscopy, Vol.55, No.2, pp. 300-306.**

Davies, G., dan Henrissat, B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure** 3(9), 853-859.

Deacon, J.W. 1997. **Modern Micology**. New York: Blackwell Science.

Ding, S., dan Himmel, M. 2006. The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. **J Agric Food Chem.**, 54, 597-606.

EIA. 1998. **Annual energy outlook. 1999 with projections to 2020**, in DOE/EIA-0383. Energy Information Administration, Department of Energy, Washington, DC, USA.

Ellis, A., dan Jacquier, J.C. 2009. Manufacture of Food Grade K-Carrageenan Microspheres. **J. Food Engineering**, vol. 94, no.3/4, pp. 316-320, 2009.

Elliston, A., Collins, S.R.A., Wilson, D.R., Roberts, I.N., Waldron, K.W., 2013. High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification dan fermentation of waste-paper. **Bioresour. Technol.** 134, 117–126

Fang, C.W., Shu, S.H., dan Ing, L.S. 2014. Sequential Hydrolysis of Waste Newspaper and Bioethanol Production from the Hydrolysate. **Bioresource Technology** 167 (2014) 159–168.

FAO. 2003. **A Guide to Seaweed Industry**. FAO Fisheries Technical Paper 441. FAO, Rome.

Foreman, P.K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N.S., Goedegebuur, F., Houfek, T.D., England, G.J., Kelley, A.S., Meerman, H.J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares, H.A., Teunissen, P.J., Yao, J., dan Ward, M. 2003. Transcriptional Regulation of Biomass Degrading Enzymes in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. **The Journal of Biological Chemistry** Vol.278, No. 34, pp.31988-31997.

Fressenden. 1997. **Kimia Organik Jilid 1 Edisi 3**. Jakarta : Erlangga.

Gao, J *et al.* 2008. Production and Characterization of Cellulolytic Enzymes from The Thermoacidophilic Fungal *Aspergillus Terreus* M11 Under Solidstate Cultivation of Corn Stover. **Bioresource Technology**, 99,7623-7629.

Ghose, T.K. 1987. Measurement of Cellulase Activities. **Pure Appl Chem** 59 (2): 257-268.

Goyal, A., Ghosh, B., dan Eveleigh, D. 1991. Characterisation of Fungal Cellulases. **Biores. Technol.**, 36, 37 50.

Guo, R., Ding, M., Zhang, S., Xu, G., dan Zhao, F. 2008. Molecular Cloning and Characterization of Two Novel Cellulase Genes from The Mollusc *Ampullaria crossean*. **J. Comp. Physiol.**, 178:209–215.

Guo, R., Ding, M., Zhang, S.L., Xu, G.L., dan Zhao, F.K. 2008. Molecular Cloning and Characterization of Two Novel Cellulase Genes from The Mollusc *Ampullaria Crossean*. **J Comp Physiol**;178(2):209–15.

Hamelinck, C.N., Van, H.G., dan Faaij. 2005. Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Techno-Economic Performance in Short-Middle- and Long-Term. **Biomass and bioenergy**, p.384-410.

Hansen, A.C., Zhang, Q., dan Lyne, P.W. 2005. Ethanol–Diesel Fuel Blends—A Review. **Bioresource Technology** 96: 277–285.

Harmita, 2006. **Analisis Fisika Kimia Jakarta** : Departemen Farmasi FMIPA-UI

Hassan, M.M., dan El-Adway, M. \A. 2011. Isolation and Molecular Characterization of some *Trichoderma spp.* with High

Cellulase Enzyme Activities. **Arab J. Biotech.**, Vol. 14, No. (2) :155-166.

Hinterstoisser, B., dan Salmén, L. 2000. Application of Dynamic 2D FTIR to Cellulose. **Vibrational Spectroscopy**, Vol.22, No.1-2, pp. 111-118.

Horn,S.J., Vaaje, K.G., Westereng,B., dan Eijsink V.G. 2012. Novel Enzymes for The Degradation of Cellulose. **Biotechnol Biofuels** 5(1):45.

Hu, G., Hetmann, J.A., dan Rojas, O.J. 2008. Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark and forest residu. **Bioresources** 3(1), 270-291.

Ilmen, M., Thrane, C., dan Penttilä, M. 1996. The Glucose Repressor Gene *Cre1* of *Trichoderma*: Isolation and Expression of a Full-Length and a Truncated Mutant Form. **Molecular and General Genetics**, Vol.251, No. 4, pp. 451-460.

Iqbal, H.M.N., Ahmed, I., Zia, M.A., dan Irfan, M. 2011. Purification and Characterization of The Kinetic Parameters of Cellulase Produced from Wheat Straw by *Trichoderma Viride* Under SSF and its Detergent Compatibility. **Advances In Bioscience Dan Biotechnology**, 2: 149-156.

Jagtap, S., and Rao, M. 2005. Purification and Properties of a Low Molecular Weight 1,4-Beta-D-Glucanglucohydrolase Having One Active Site for Carboxy Methylcellulose and Xylan from an Alkalothermophilic *Thermomonospora sp.* **Biochem. Biophysiol. Res. Com.**, 329:111-116.

Jagtap, S., dan Rao, M. 2005. Purification and Properties of a Low Molecular Weight 1,4-Beta-D-Glucan Glucohydrolase Having One Active Site for Carboxymethyl Cellulose and Xylan From an Alkalothermophilic *Thermomonospora sp.* **Biochem Res Commun** 329(1):111-6.



Jimenez A., dan Sanchez, F.J. 2000. Dietary Fibre from Edible Seaweeds: Chemical Structure, Physicochemical Properties and Effects on Cholesterol Metabolism. **Nutrition Research**, 20, 585–598.

Juan, A.A. 1990. **Separation Processes in Biotechnology**. New York : Marcel Dekker.

Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piapukiew, J., dan Whally, A.J.S . 2008. A Novel Thermosable Endoglucanase from The Wood-Decaying Fungus *Daldinia Eschscholzii*. **Enz. Microb. Tech.**,42:404-413.

Khopkar, S.M. 1990. **Konsep Dasar Kimia Analitik, Terjemahan Basic Concepts of Analytical Chemistry**. Jakarta.: Penerbit Universitas Indonesia.

Klass, L. 1998. **Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemicals**. California : Academic Press.

Klemm, D., Schmauder, H.P., dan Heinze, T. 2004. **Cellulose**. In: Steinbüchel A, editor. **Biopolymers Volume 6 Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes Münster**. Germany: Wiley-VCH.

Kodri, Argo, B.A., dan Yulianingsih, R. 2013. Pemanfaatan Enzim Selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatis Jerami Padi dengan *Pretreatment* Microwave. **Jurnal Bioproses Komoditas Tropis** Vol. 1 No. 1, April 2013.

Kosmulski, M. 2009. **Surface Charging and Points of Zero Charge**. United States of America : CRC Press.

Kubicek, C.P., Komon M., dan Druzhinina, I.S. 2008. Fungal Genus *Hypocrea* *Trichoderma*: from Barcodes to Biodiversity. **Journal of Zhejiang University Science**, 9, 753-763.

Lehninger, A.L. 1993. **Dasar - dasar biokimia. Jilid 1, 2, 3.** (Alih bahasa oleh; M. Thenawidjaja). Jakarta : Erlangga.

Lehninger, A.L. 1993. **Dasar - dasar biokimia. Jilid 1, 2, 3.** (Alih bahasa oleh; M. Thenawidjaja). Jakarta : Erlangga.

Leschine, SB. 1995. Cellulose Degradation in Anaerobic Environments. **Annu Rev Microbiol**, 49:399–426.

Levin, D.B., Pitt, L., dan Love, M. 2004. Biohydrogen Production, Prospects and Limitations to Practical Application. **International Journal of Hydrogen Energy** 2004, 29(2), 173-185.

Levin, D.B., Sparling, R. Islam, R., Cicek, N. 2006. Hydrogen Production by *Clostridium Thermocellum* 27405 from Cellulosic Biomass Substrates. **International Journal of Hydrogen Energy**, 31(11), 1496-1503.

Lynd L., Weimer, P., Van zyl, P., dan Pretorius. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 66, 506-577.

Madigan, M. T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., dan Clark, D.P. 2012. **Brock : Biology of Microorganisms Thirteenth Edition.** United States of America : Pearson Education Inc.

Mandels, M., Danreotti, R., dan Roche, C. 1976. Measurement of Saccharifying Cellulase. **Biotechnol Bioeng Symp** 6:21-33.

Miettinen-Oinonen, A., dan Suominen, P. 2002. Enhanced Production of *Trichoderma reesei* Endoglucanases and Use of The New Cellulose Preparations in Producing the Stone Washed Effect on Denim Fabric. **Appl Environ Microbiol** 68(8):3956–64.

Miettinen-Oinonen, J. 2004. Three Cellulases from *Melanocarpus Albomyces* for Textile Treatment at Neutral pH. **Enzyme Microb. Technol.**, 34, 332-341.

Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, vol. 31, no. 3, pp. 426-428.

Monserrate, E., Leschine, S.B., dan Canale-Parola, E. 2001. *Clostridium hungatei* sp. Nov., a Mesophilic, N<sub>2</sub>-fixing Cellulolytic Bacterium Isolated from Soil. **International Journal of Systematics, Evolution and Microbiology**, 51, 123-132.

Mosier, N.S., Ladisch, C.M., dan Ladisch, M.R. 2002. Characterization of Acid Catalytic Domains for Cellulose Hydrolysis and Glucose Degradation. **Biotechnol Bioeng** 79(6):610-618.

Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K., dan Dalai, A.K. 2010. Production of First and Second Generation Biofuels: A Comprehensive Review. **Renew Sustain Energy Rev** 14:578-597.

Ok, J.S., Ji, H.K., Sun, P., Young, J.S. 2004. Characterization and molecular cloning of a novel endoglucanase from *Trichoderma* sp. C-4. **Appl Microbiol Biotechnol** (2004) 66: 63-70.

Onishi, N., dan Tanaka, T. 1996. Purification and Properties of a Galacto- and Gluco-oligosaccharide-Producing *Beta*-glucosidase from *Rhodotorula minuta* IFO879. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 82:439-43.

Orozco, A.M., Al-Muhtaseb, A.H., Rooney, D., Walker, G.M., dan Ahmad, M.N.M. 2013. Hydrolysis Characteristics and Kinetics of Waste Hay Biomass as a Potential Energy Crop for

Fermentable Sugars Production Using Autoclave Parr Reactor System. **Ind. Crop. Prod.** 44: 1-10.

Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., dan Johnson, D.K. 2010. Cellulose Crystallinity Index: Measurement Techniques and Their Impact on Interpreting Cellulase Performance. **Biotechnol Biofuels**, 3:10.

Persson, S., Sørensen, I., Moller, I., Willats, W., dan Pauly M. 2011. **Dissection of Plant Cell Walls by High-Throughput Methods.** In: Ulvskov P, Ed. **Annual Plant Reviews: Plant Polysaccharides, Biosynthesis and Bioengineering.** Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

Pinzari, F., Pasquariello, G., dan Mico, A.D. 2006. Biodeterioration of Paper: A SEM Study of Fungal Spoilage Reproduced Under Controlled Conditions. **Macromol. Symp**, 238: 57-66.

Punnapayak, H., Kuhirun, M., dan Thanonkeo, P. 1999. **Cellulolytic Fungi and The Bioconversion of Fiber from Agave Sisalana** *Science Asia*., 25, 133-136.

Quiroz-Castañeda R, Martinez-Anaya C, Cuervo-Soto L, Segovia L, Folch-Mallol J. Loosenin. 2011. A Novel Protein with Cellulose-Disrupting Activity from *Bjerkandera Adusta*. **Microbial Cell Factories** 10 (1) : 8.

Rabinovich, M., Melnik, M., dan Bolobova, A. 2002. Microbial Cellulases: A review. **Appl. Biochem. Microbiol.**, 38, 305-321.

Reese, E.T., Siu, R.G.H., dan Levinson, S.H. 1950. The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivatives and its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis. **J. Bacteriol.**, 59: 485-497.

Renee, R., dan Joan, M. 1985. **Basic Biochemical Methods.** Singapore : Brisbane-Toronto.

Rolfe, M.D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D.S., Alston, M., Stringer, M.F., Betts, R. P., Baranyi, J., Peck, M. W., dan Hinton, J.C.D. 2012. Lag Phase is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. **Journal of Bacteriology** p. 686–701.

Sadana, J., dan Patil, R. 1988. 1,4-beta-D-glucan Cellobiohydrolase from *Sclerotium rolfsii*. **Methods in Enzymology** 160: 307–14.

Sadana, J., Lachke, A., dan Patil, R. 1984. Endo-(1-4)-beta-D-Glucanases from *Sclerotium rolfsii* – Purification, Substrate Specificity, and Mode of Action. **Carbohydrate Research** 133:297–312.

Saloheimo, M. 2002. Enzymatic Properties and Intracellular Localization of the Novel *Trichoderma reesei*  $\beta$ -glucosidase BGLII (Cel1A). **Appl. Environ. Microbiol.**, 68, 4546-4553.

Saloheimo, M., Nakari-setälä, T., Tenkanen, M., dan Penttilä, M. 1997. cDNA Cloning of a *Trichoderma reesei* Cellulase and Demonstration of Endoglucanase Activity by Expression in Yeast. **Eur. J. Biochem.**, 249, 584-591.

Saxena, R.C., Adhikari, D.K., dan Goyal, H.B., 2009. Biomass-Based Energy Fuel Through Biochemical Routes: A Review. **Renew. Sustain. Energy Rev.** 13, 167–178.

Segal, L. 1971. **Cellulose and Cellulose Derivatives**. New York : Wiley.

Song, L., Zeng, Y., Zhang, X., dan Yu, H. 2013. The Promoting Effects of Manganese on Biological Pretreatment with *Irpex Lacteus* and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. **Bioresource Technol.** 135: 89–92.

Sun, Y., dan Cheng, J. 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. **Bioresource Technol.**, 83, 1-11.

Taherzadeh dan Karimi. 2008. Review Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production . **Int. J. Mol. Sci.** 9. 1621-165.

Thongekkaew, J., Hiroko, I.H., Masaki, K., dan Iefuji, H. 2008. An Acidic and Thermostable Carboxymethyl Cellulose from The Yeast *Cryptococcus* Sp. S-2: Purification, Characterization and Improvement of its Recombinant Enzyme Production by High Cell-Densityfermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expression Purif**;60(2):140–6.

Tiwari, K.L., Jadhav, S.K., dan Tiwari, S. 2011. Studies of Bioethanol Production from some Carbohydrate Source by Gram Positive Bacteria. **Journal of Sustainable Energy & Environment** 2: 141-144.

Tjerneld, F. 2002. **Degradation of cellulose.** <<http://www.biokem.lu.se/tjerneld/html/cellulase.htm>>. 20 Mei 2016.

Tribak, M., Ocampo, J.A., dan Garcia, R.I. 2002. **Production of Xyloglucanolytic Enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus*.** *Mycologia.* 3: 404-410.

Tsigos, I., dan Bouriotis, V. 1995. Purification and Characterization of Chitin Deasetilase from *Colletotrichum lindemuthianum*. **J Biol Chem**, 270: 26286 -26291.

Wahyuningtyas, P., Argo, B.D., dan Nugroho, A. 2013. Studi Pembuatan Enzim Selulase Dari Mikrofungi *Trichoderma Reesei* Dengan Substrat Jerami Padi Sebagai Katalis Hidrolisis

Enzimatik Pada Produksi Bioetanol. **Jurnal Bioproses Komoditas Tropis**. Vol. 1 No.1.

Walker, L.P., dan Wilson, D.B. 1991. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: An Overview. **Bioresource. Technol.**, 36.3-14.

Wang, M. 2000. **Greet 1.5—transportation fuel-cycle model**. <<http://greet.anl.gov/publications.html> [cited]>. 20 Mei 2016.

Wheals, A.E., Basso, Luiz C., Denise, M., Alves, G., dan Henrique, A. 1999. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, 17, 482-487.

Wu, Z., dan Lee, Y. 1997. Ammonia Recycled Percolation as a Complementary Pretreatment to the Dilute-Acid Process. **Appl. Biochem. Biotech.**, 65, 21-34.

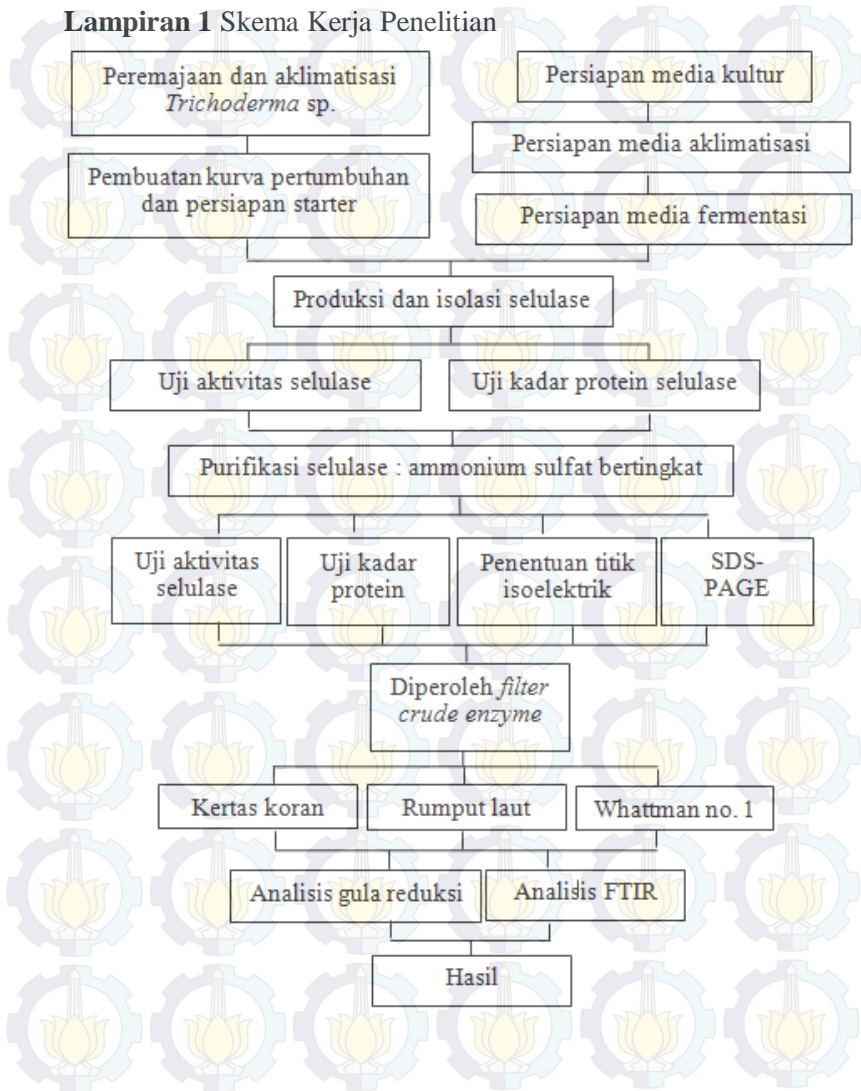
Wuyep, P., Khan, A., dan Nok, A. 2003. Production and Regulation of Lignin Degrading Enzymes from *Lentinus squarrosulus* (mont) Singer and *Psathyrella atroumbonata* Pengler. **Afr. J. Biotechnol.**, 2, 444-447.

Yasmin, Salwee., Mattoo, R.L., dan Nehvi, F.A. 2013. Isolation, Characterization and Molecular weight determination of Cellulase from *Trichoderma viride*. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 12(28), pp. 4512-4518.

Zhu, J.Y., Wang, G.S., Pan, X.J., dan Gleisner, R. 2008. The of af and Key Barriers in Lignocellulosic Ethanol Production: A Technological Perspective. **International Conference on Biomass energy technologies**.

## DAFTAR LAMPIRAN

### Lampiran 1 Skema Kerja Penelitian





## Lampiran 2 Komposisi Medium PDA

Pembuatan medium PDA dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. PDA bubuk sebanyak 39 gr dilarutkan dalam 1 liter akuades, ditambahkan dengan chloramphenicol sebanyak 0,02 gr. Kemudian medium dipanaskan hingga larut sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*.
2. Medium disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm.
3. Setelah disterilkan, medium dituangkan dalam cawan petri steril di dalam meja kerja *Laminar Air Flow* dan dibiarkan hingga memadat.

### Lampiran 3 Komposisi Medium PDB

Pembuatan medium PDB dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. PDA bubuk sebanyak 24 gr dilarutkan dalam 1 liter akuades kemudian medium dipanaskan hingga larut sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*.
2. Medium dimasukkan dalam Erlenmeyer dan ditutup dengan sumbat. Kemudian medium disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 1,5 atm.

#### Lampiran 4 Komposisi Medium PDB Modifikasi

Pembuatan medium PDB modifikasi dilakukan dengan cara sebagai berikut:

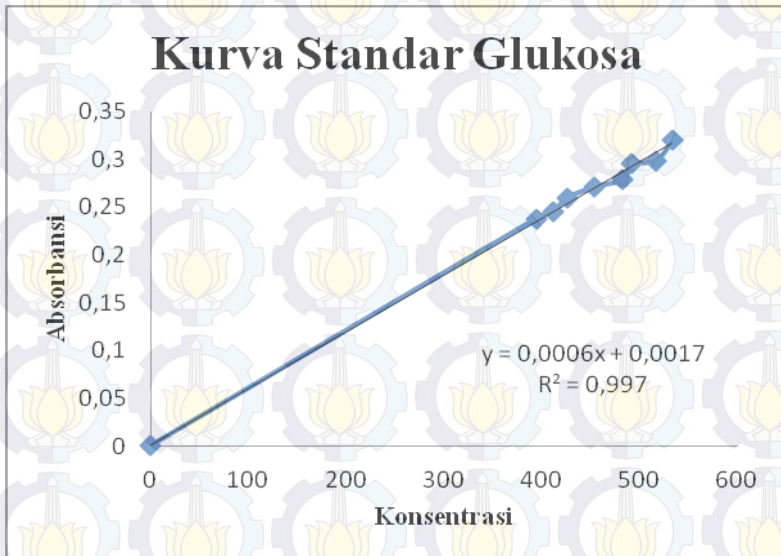
1. PDA bubuk sebanyak 12 gr dan dicampurkan dengan bubuk CMC sebanyak 12 gr. Campuran medium dilarutkan dalam 1 liter akuades kemudian medium dipanaskan hingga larut sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*.
2. Medium PDB modifikasi dimasukkan dalam Erlenmayer dan ditutup dengan sumbat. Kemudian medium disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm.

**Lampiran 5** Komposisi Medium Mendels (Medium Produksi Selulase) untuk 1 L

No	Bahan	Jumlah
1	Jerami padi	10 gr/lt
2	Urea	0,3 gr/lt
3	Malt extract	0,75 gr/lt
4	Yeast	0,25 gr/lt
5	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,3 gr/lt
6	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 gr/lt
7	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,3 gr/lt
8	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 gr/lt
9	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg/lr
10	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,6 mg/lt
11	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,4 mg/lt
12	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 mg/lt

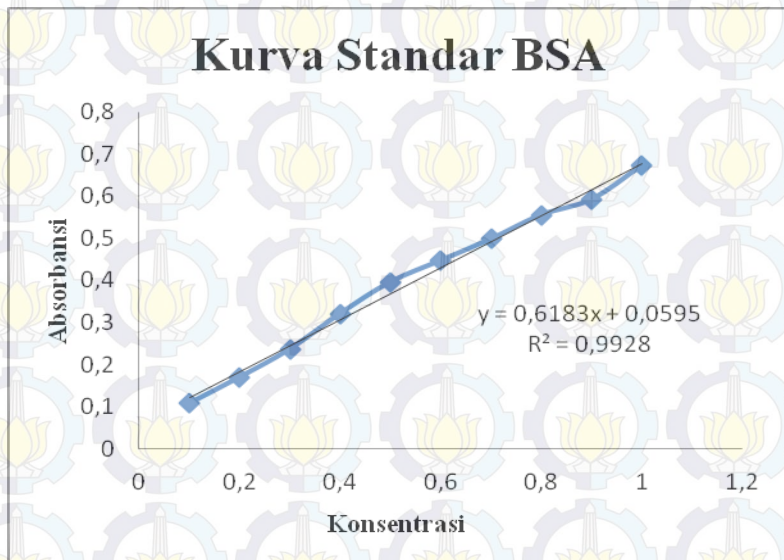
**Lampiran 6 Kurva Standar Glukosa**

Konsentrasi ( $\mu\text{M/ml}$ )	Absorbansi
0	0
394	0,238
411	0,245
426	0,26
454	0,271
483	0,279
491	0,295
516	0,298
533	0,32



**Lampiran 7 Kurva Standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)**

Konsentrasi (mg/ml)	Absorbansi
0,1	0,108
0,2	0,17
0,3	0,237
0,4	0,321
0,5	0,396
0,6	0,447
0,7	0,498
0,8	0,555
0,9	0,592
1	0,672



**Lampiran 8 Larutan Penyangga Fosfat (pH 7,0-7,2)**

Pembuatan Larutan Penyangga Fosfat (pH 7,0-7,2) dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Stok buffer basa  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,067 M dibuat dengan cara melarutkan 9,5 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dalam 1 liter akuades.
2. Stok buffer asam  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,067 M dibuat dengan cara melarutkan 9,2 gram  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dalam 1 liter akuades.
3. Larutan penyangga fosfat pH 7,0-7,2 dibuat dengan mencampurkan buffer basa  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,067 M sebanyak 61 ml dan buffer asam  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,067 M sebanyak 39 ml lalu dilarutkan dalam 900 ml akuades.

**Lampiran 9** Nilai Aktivitas Enzim Setelah Purifikasi Amonium Sulfat

	<i>Trichoderma harzianum</i>			Rata2 abs	Aktivitas ( $\mu\text{M/ml}$ )	<i>Trichoderma</i> sp. LM 1039			Rata2 abs	Aktivitas ( $\mu\text{M/ml}$ )
	a	b	c			a	b	c		
fraksi 1	0,339	0,337	0,339	0,3383	187,78	0,35	0,34	0,339	0,342	190,001
fraksi 2	0,395	0,385	0,381	0,387	214,45	0,4	0,41	0,381	0,395	199,446
fraksi 3	0,414	0,402	0,398	0,4047	223,89	0,41	0,4	0,398	0,402	223,334
fraksi 4	0,345	0,343	0,339	0,3423	190	0,36	0,36	0,353	0,354	196,668
fraksi 5	0,336	0,339	0,335	0,3367	186,67	0,36	0,36	0,354	0,355	196,668



**Lampiran 10** Nilai Kandungan Protein Setelah Purifikasi Amonium Sulfat

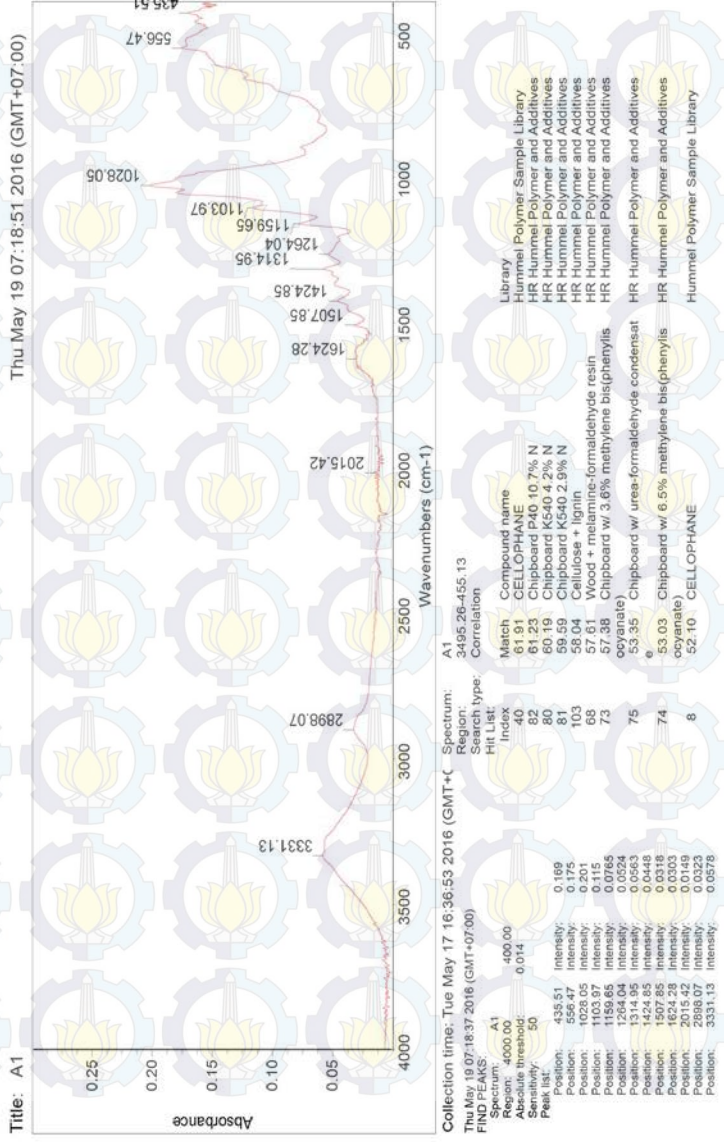
	<i>Trichoderma harzianum</i>			rata2 abs	Kadar Protein (mg/ml)	<i>Trichoderma sp. LM 1039</i>			rata2 abs	Kadar Protein (mg/ml)
	a	b	c			a	b	c		
fraksi 1	0,071	0,071	0,071	0,071	0,174	0,028	0,025	0,022	0,025	0,099
fraksi 2	0,17	0,182	0,182	0,178	0,347	0,195	0,198	0,198	0,197	0,378
fraksi 3	0,074	0,063	0,076	0,071	0,174	0,061	0,062	0,063	0,062	0,159
fraksi 4	0,056	0,062	0,062	0,06	0,156	0,056	0,057	0,057	0,056	0,150
fraksi 5	0,042	0,043	0,044	0,043	0,129	0,037	0,037	0,039	0,037	0,119

# Lampiran 11 Analisis FTIR Hasil Hidrolisis

## 1. Substrat Kertas Koran Kontrol



## 2. Substrat Koran Hasil Hidrolisis



## BIODATA PENULIS



Asma'ul Karima yang akrab disapa dengan nama Rima dilahirkan di Banyuwangi pada tanggal 11 Januari 1994 sebagai anak ke dua, pasangan Bunadin dan Sapinah. Penulis menggemari olahraga volly dan bulu tangkis semenjak usia 12 tahun. Pendidikan formal penulis dimulai dari pendidikan dasar di Sekolah Dasar Negeri 1 Alasmalang dan melanjutkan pendidikan di SMP N 1

Singojuruh lalu di SMA N 1 Rogojampi. Ketertarikannya pada dunia Biologi mulai terlihat dengan pilihan penulis mengambil kelompok kelas IPA. Ketertarikan dalam dunia biologi juga dibuktikan dengan keikutsertaan penulis dalam Olimpiade Sains Nasional di Banyuwangi. Pada tahun 2012 penulis lulus dari SMA Negeri 1 Rogojampi. Pada tahun yang sama penulis lulus seleksi masuk ITS melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri Tulis. Penulis memilih Jurusan Biologi FMIPA ITS. Pada tahun ini penulis sedang menjalani masa-masa semester akhir dalam study S1 dengan mengerjakan proyek penelitian Tugas Akhir sebagai salah satu syarat kelulusan di Jurusan Biologi, ITS Surabaya.