

# Modifikasi Enzimatik Bahan Berbasis Selulosa Sebagai Substrat Potensial Bioetanol

Asmaul Karima, Sri Nurhatika dan Endry Nugroho Prasetyo  
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh  
Nopember (ITS)  
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia  
e-mail: endry@bio.its.ac.id

**Abstrak**— Selulosa merupakan biopolimer D-glukosa dengan memiliki ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik yang keberadaannya melimpah di alam namun memiliki struktur yang tak larut dan sukar dihidrolisis. Hidrolisis secara enzimatik bahan berbasis selulosa menghasilkan komponen gula sederhana. Pada penelitian ini, selulase diproduksi dari *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039. Karakterisasi hasil purifikasi enzim menunjukkan aktivitas tertinggi yaitu sebesar 233,89 U/ml dengan kadar protein 0,174 mg/ml pada isolat *Trichoderma harzianum* dan pada *Trichoderma* sp. LM 1039 sebesar 223,334 U/ml dengan kadar protein 0,159 mg/ml. Analisis titik isoelektrik dan SDS-PAGE menunjukkan titik isoelektrik enzim berada pada pH 5 yang menandakan asam amino penyusun protein dominan bermuatan negatif dengan berat molekul sebesar 40,36 kDa. Hasil hidrolisis enzimatik *crude* enzim pada substrat rumput laut, kertas koran dan kertas saring whatman no.1 menunjukkan bahwa gula reduksi tertinggi hingga terendah yaitu sebesar 1,43-1,44 mM/ml (rumpun laut), 0,54-0,70 mM/ml (kertas koran), dan 0,55-0,78 mM/ml (whatman). Hasil analisis FTIR pada kertas koran menunjukkan bahwa pada  $894\text{ cm}^{-1}$  terjadi perubahan terhadap gugus eter (C-O-C) di rantai selulosa.

**Kata Kunci**— Selulase, Selulosa, *Trichoderma* sp.

## I. PENDAHULUAN

BIOETANOL (etil alkohol,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$  atau ETOH) merupakan biofuel cair yang berasal dari proses fermentasi dengan melibatkan mikroorganisme [1] [2]. Pemanfaatan biomassa berbasis selulosa dalam produksi bioetanol memiliki kelebihan meliputi biaya produksi yang murah, jumlah yang melimpah dan bersifat terbaharukan [3]. 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 [4]. Sakarifikasi secara enzimatik dinilai lebih efektif dalam degradasi 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 [5] [6] [7].

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 [5] [7] [8] [9].

Selulosa dapat disakarifikasi dengan memanfaatkan enzim selulase yang diproduksi oleh beberapa mikroorganisme meliputi bakteri, kapang, dan *Actinomyces* [10] [11]. Salah satu jenis kapang yang dapat memproduksi enzim selulase secara optimal yaitu genus *Trichoderma* sp. [12] [13]. 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 [14] [15].

Kompleksitas struktur kristalin pada selulosa merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi tingkat degradasi selulosa menjadi gula sederhana [4]. Pemanfaatan substrat berbasis selulosa dengan modifikasi enzimatis sebagai bahan baku pembuatan bioetanol masih relatif rendah. Sehingga dalam penelitian ini dilakukan hidrolisis enzimatis menggunakan selulase dari *Trichoderma* sp. pada substrat rumput laut, kertas koran, dan kertas saring Whatman no.1 sebagai bahan baku potensial dalam fermentasi bioetanol.

## II. METODOLOGI

### A. 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.

### B. 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.

### C. 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) dan media *Potato Dextrose Broth* (PDB).

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. Kultur isolat dalam media PDB termodifikasi diinkubasi selama 7 hari menggunakan *rotary shaker* pada suhu ruang. Kemudian sebanyak 10 % kultur isolat dari media PDB termodifikasi dipindahkan kedalam 250 ml media Mendel's yang mengandung bubuk jerami padi dan diinkubasi menggunakan *rotary shaker* pada suhu ruang selama 7 hari.

### D. 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 *analytical balance*. Isolat *Trichoderma* sp. pada fase eksponensial digunakan sebagai starter dalam fermentasi cair untuk produksi selulase.

### E. 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 Erlenmeyer yang mengandung 50 ml media fermentasi (media Mendel's). 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.

### F. 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). Fraksi-fraksi protein dalam ammonium sulfat yang diperoleh akan dilakukan karakterisasi meliputi aktivitas enzim, kandungan protein, titik isoelektrik dan berat molekul enzim (SDS-PAGE).

### G. Uji Aktivitas Selulase

Kurva standar glukosa dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 10 mg glukosa anhidrat ke dalam aquades 10 ml. 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 aquades 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 aquades 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 [16]. Pengujian aktivitas enzim selulase diukur menggunakan metode [17], yang telah dimodifikasi. Larutan digesti yang terdiri dari 1,8 ml substrat CMC (*carboxymethyl cellulose*) 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  $50^\circ\text{C}$  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 [18].

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

### H. 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. 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.

#### I. Titik Isoelektrik

Prinsip pada pengujian ini adalah pembentukan endapan kekeruhan paling cepat atau paling banyak merupakan titik isoelektrik [19]. 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

#### J. 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 [20]. 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 [21]. 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 [21].

#### K. Hidrolisis Enzimatik Pada Substrat Berselulosa

Substrat yang digunakan dalam sakarifikasi meliputi kertas koran, rumput laut, dan kertas whatman 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 [22].

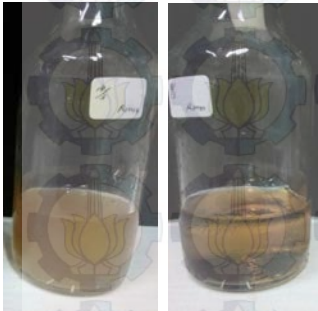
#### L. Analisis Gugus Fungsi

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  $\text{cm}^{-1}$ .

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

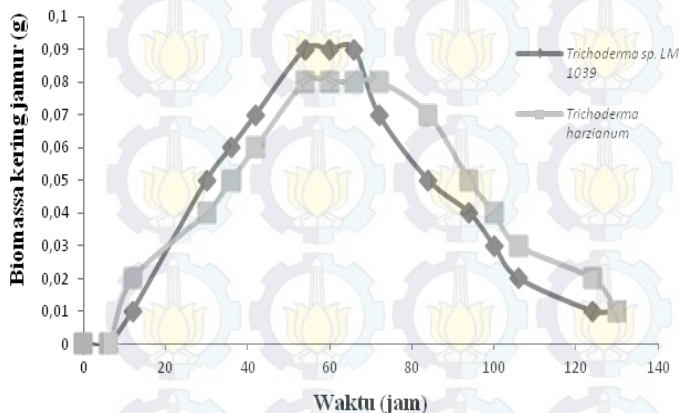
#### A. Produksi dan Isolasi Enzim

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 mikroorganisme sebab ketersediaan jumlah nutrisi yang melimpah. Fase stasioner merupakan keadaan yang dicirikan dengan jumlah pertumbuhan setara dengan jumlah kematian mikroorganisme akibat nutrisi dalam medium mulai menipis sehingga terjadi akumulasi produk sisa yang dapat menghambat pertumbuhan [23].



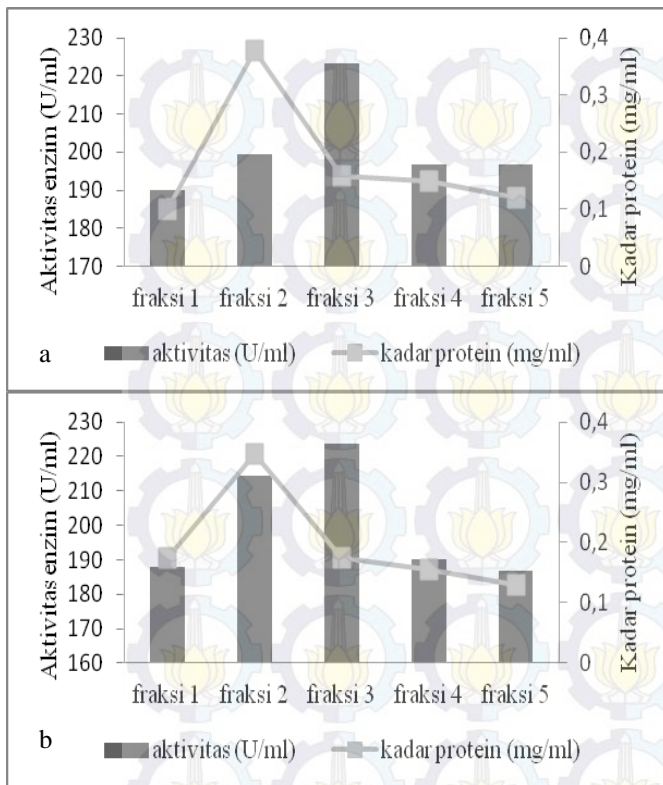
**Gambar 4.2** Kurva Pertumbuhan *Trichoderma* sp. dalam 50 ml Medium Mendels

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 mikroorganisme. 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 [24] [25]. Ketika kultur telah memasuki fase stasioner, isolasi enzim dilakukan sebab enzim selulase terakumulasi secara maksimal di dalam media kultur. Hal ini sesuai dengan pernyataan [24] 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. Menurut [26] bahwa mikroorganisme akan memanfaatkan sumber karbon yang tersedia dilingkungan sekitarnya ketika sumber karbon utamanya tidak tersedia.

#### B. Purifikasi dan Karakterisasi Enzim

Pemurnian selulase menggunakan garam amonium sulfat dengan konsentrasi bertingkat bertujuan untuk memisahkan protein tertentu berdasarkan tingkat kelarutannya (*Salting out*) [27]. Hasil purifikasi selulase pada isolat *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma* sp. LM 1039 dapat diamati pada Gambar 4.3.

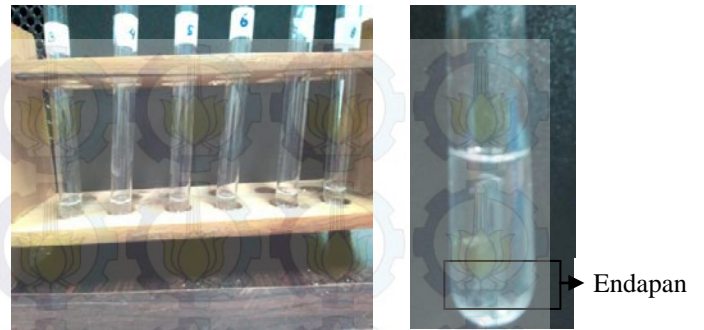


**Gambar 4.3** Aktivitas Enzim dan Kadar Protein Isolat a). *Trichoderma sp. LM 1039* b). *Trichoderma harzianum*

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.

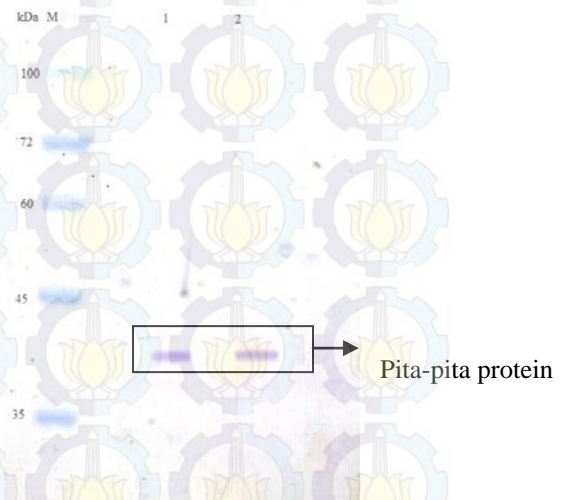
Untuk mengkonfirmasi hasil purifikasi protein selulase, maka dilakukan karakterisasi dengan uji kandungan protein, titik isoelektrik dan SDS-PAGE. Kadar protein tertinggi yang diperoleh melalui uji Bradford setelah purifikasi terdapat pada fraksi ke-2 yaitu sebesar 0,347 mg/ml pada isolat *Trichoderma 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 [28]. Titik isoelektrik selulase yang terpurifikasi tercapai pada pH 5 yang mencirikan karakter selulase akan terkoagulasi pada rentang pH 3,5 - 5,5 [29]. 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 [30]. 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 [31]. Gambar 4.5 berikut menunjukkan pita-pita protein selulase hasil elektroforesis SDS-PAGE.



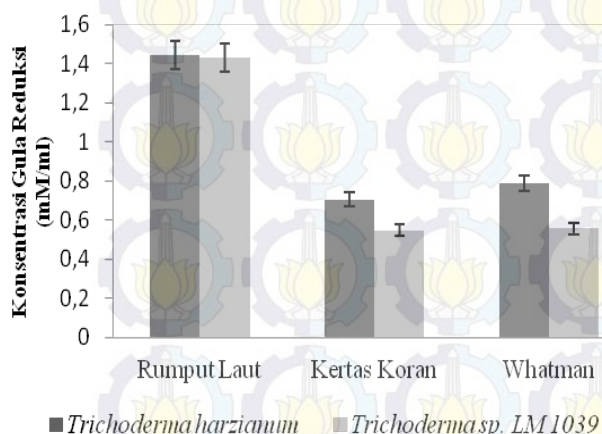
**Gambar 4.5** Elektroforesis SDS-PAGE Pada Fraksi Protein 45-60 % (M) Marker, (1) *Trichoderma harzianum*, dan (2) *Trichoderma sp. LM 1039*

**C. Tingkat Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzimatik**

Gula reduksi hasil dari proses hidrolisis enzimatik dianalisis menggunakan metode 3-5-dinitrosalicylic acid (DNS) [22]. 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.

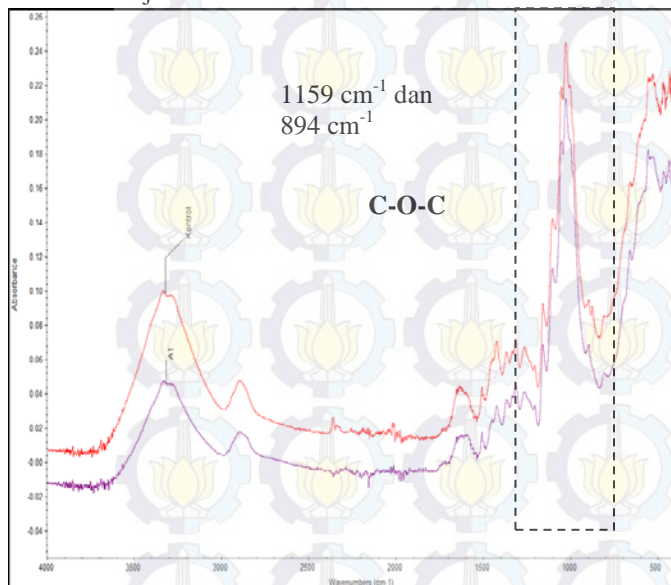
Berdasarkan Gambar 4.6, tampak bahwa konsentrasi gula reduksi tertinggi yang dihasilkan selama hidrolisis enzimatis terdapat pada substrat rumput laut. Hidrolisis enzimatis pada substrat rumput laut menghasilkan konsentrasi gula reduksi tertinggi yaitu sebesar 1,4 mM/ml dibandingkan pada substrat kertas 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 [32].



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

#### D. 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.



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

Berdasarkan Gambar 4.7, tampak bahwa terjadi perubahan pada intensitas panjang gelombang 894  $\text{cm}^{-1}$  yang ditandai dengan penebaran *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 [33] [34].

#### IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

*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).

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis Asmaul Karima ucapkan terima kasih kepada Ir. Sri Nurhatika, M.P. dan Dr. Techn. Endry Nugroho P., M.T. selaku dosen pembimbing, Ayahanda dan ibunda atas doa, semangat dan kasih sayangnya beserta teman-teman Biomaterial dan Enzyme Research dan B15 atas motivasi dan semangatnya.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] 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.
- [2] Hansen, A.C., Zhang, Q., dan Lyne, P.W. 2005. Ethanol-Diesel Fuel Blends—A Review. *Bioresource Technology* 96: 277-285..
- [3] 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.
- [4] Taherzadeh dan Karimi. 2008. Review Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production. *Int. J. Mol. Sci.* 9. 1621-165.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.

- [8] Goyal, A., Ghosh, B., dan Eveleigh, D. 1991. Characterisation of Fungal Cellulases. **Biores. Technol.**, 36, 37-50.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Sun, Y., dan Cheng, J. 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. **Bioresource. Technol.**, 83, 1-11.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Kodri, Argo, B.A., dan Yulianingsih, R. 2013. Pemanfaatan Enzim Selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi dengan *Pretreatment* Microwave. **Jurnal Bioproses Komoditas Tropis** Vol. 1 No. 1, April 2013.
- [17] 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.
- [18] Ghose, T.K. 1987. Measurement of Cellulase Activities. **Pure Appl Chem** 59 (2): 257-268.
- [19] Kosmulski, M. 2009. **Surface Charging and Points of Zero Charge**. United States of America : CRC Press.
- [20] Renee, R., dan Joan, M. 1985. **Basic Biochemical Methods**. Singapore : Brisbane-Toronto.
- [21] Bollag, D., dan Edelstein, S.J. 1991. **Protein Methods**. New York : John Willey and Sons.
- [22] Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, vol. 31, no. 3, pp. 426-428.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Juan, A.A. 1990. **Separation Processes in Biotechnology**. New York : Marcel Dekker.
- [28] Tsigos, I., dan Bouriotis, V. 1995. Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. **J Biol Chem**, 270: 26286 -26291.
- [29] 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.
- [30] Walker, L.P., dan Wilson, D.B. 1991. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: An Overview. **Bioresource. Technol.**, 36.3-14.
- [31] 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.
- [32] Davies, G., dan Henrissat, B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure** 3(9), 853-859.
- [33] Ciolacu, D., Cilolacu, F., dan Popa, V.I. 2011. Amorphous Cellulose-Structure and Characterization. **Cellulose Chem. Technol.**, 45 (1-2), 13-21.
- [34] 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.