

2. Reagen Bradford

Bradford adalah suatu uji untuk mengukur konsentrasi protein total dengan secara kolorimetri dalam suatu larutan. Dalam Uji Bradford melibatkan pewarna Coomassie Brilliant Blue (CBB) yang berikatan dengan protein dalam suatu larutan yang bersifat asam sehingga memberikan warna (kebiruan). Karena menghasilkan warna, sehingga secara kolorimetri dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Reagen Bradford dibuat dengan:

- a. Menimbang 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 dilarutkan dalam 50 ml etanol 95%.
- b. Kemudian ditambahkan 100 ml 85% (w/v) asam fosfat.
- c. Diencerkan sampai 1 liter sampai warna melarut semua.
- d. Menyaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No.1. reagen Bradford harus berwarna coklat muda jernih.
- e. Penyaringan mungkin harus diulang untuk memisahkan komponen pereaksi yang berwarna biru (Bintang, 2010).

E. Gula Reduksi dan Kadar Protein

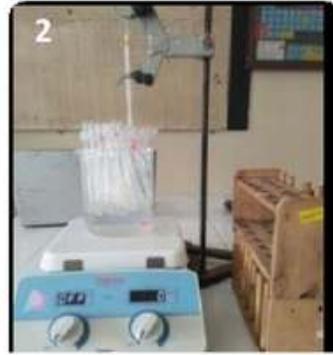
1. Menentukan kadar gula reduksi enzim metode DNS menggunakan spektrofotometer

DNS digunakan untuk mengukur gula reduksi yang diproduksi oleh mikroba yang memiliki tingkat ketelitian tinggi. DNS merupakan senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya untuk membentuk 3-amino-5-nitrosalicylic acid, suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang 540 nm. Semakin banyak komponen komponenpereduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul 3-amino-5-nitrosalicylic acid terbentuk dan mengakibatkan serapan semakin tinggi (Sazciet, et all. 1986).

Reaksi dengan DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehid gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk 3-amino dan 5-nitrosalicylic acid. Reaksi ini berjalan dalam suasana basa. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan.



1 ml crude enzim +
CMC 1%



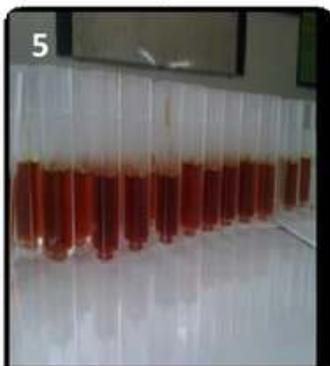
Diinkubasi pada suhu
50°C selama 30 menit



Ditambahkan reagen DNS



Diinkubasi pada suhu
100°C selama 15 menit



Diletakkan pada kuvet

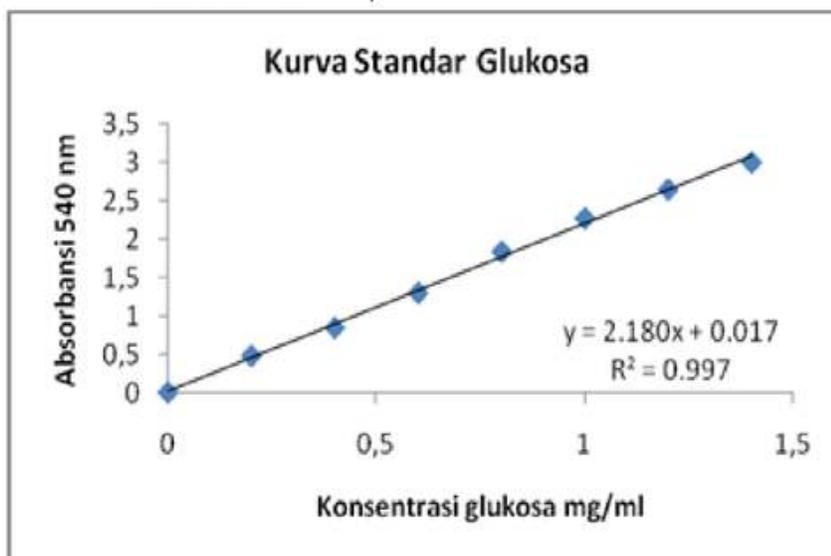


Dilihat absorbansinya

- (2) Konsentrasi 0.4 mg/ml
- $$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$
- $$V_1 \times 2 \text{ mg/ml} = 5 \times 0.4 \text{ mg/ml}$$
- $$V_1 = 1 \text{ ml larutan stok} + 4 \text{ ml akuades}$$
- (3) Konsentrasi 0,6 mg/ml
- $$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$
- $$V_1 \times 2 \text{ mg/ml} = 5 \times 0,6 \text{ mg/ml}$$
- $$V_1 = 1,5 \text{ ml larutan stok} + 3,5 \text{ ml akuades}$$

Dan seterusnya,

- Membaca nilai absorbansi larutan glukosa dengan spektrofotometer panjang gelombang 540 nm.
- Membuat kurva standart glukosa dan mencari nilai R^2 sehingga mendapat persamaan $y = ax + b$ (Nilai R^2 minimal adalah 0.97).



Gambar 2.9. Contoh kurva standar glukosa.

5. Membuat kurva standart BSA

Membuat larutan stok protein standar

$$1 \text{ mg/ml} = \frac{1 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} = \frac{0,01 \text{ g}}{10 \text{ ml}}$$

Untuk membuat stok larutan standar BSA 1 mg/mg dibutuhkan 0,01 g BSA, dilarutkan dengan akuades sebanyak 10 ml. kemudian membuat larutan glukosa dengan konsentrasi 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, dst. Sebanyak 3 ml dibuat sesuai dengan perhitungan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

- (1) Konsentrasi 0,02 mg/ml
- $$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$
- $$V_1 \times 0.1 \text{ mg/ml} = 3 \times 0,02 \text{ mg/ml}$$
- $$V_1 = 0,6 \text{ ml larutan stok} + 2.4 \text{ ml akuades}$$
- (2) Konsentrasi 0.04 mg/ml
- $$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$
- $$V_1 \times 0.1 \text{ mg/ml} = 3 \times 0.04 \text{ mg/ml}$$
- $$V_1 = 1,2 \text{ ml larutan stok} + 1,8 \text{ ml akuades}$$
- (3) Konsentrasi 0,06 mg/ml
- $$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$
- $$V_1 \times 0.1 \text{ mg/ml} = 3 \times 0.06 \text{ mg/ml}$$
- $$V_1 = 1,8 \text{ ml larutan stok} + 1.2 \text{ ml akuades}$$

Dan seterusnya,

- c. Membaca nilai absorbansi larutan glukosa dengan spektrofotometer panjang gelombang 595 nm.

F. Aktivitas Enzim

1. Aktivitas enzim selulase

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan satu mikromol gula reduksi (glukosa) setiap menit. (Lehninger, 1993). Penggunaan substrat spesifik dapat dilakukan untuk menentukan aktivitas selulase. Aktivitas endroglukanase dapat dilakukan dengan menguji pada substrat CMC (*Carbomethyl cellulose*).

Penentuan aktivitas selulase akan sulit apabila filtrat yang akan diukur aktivitas enzimnya merupakan campuran dari berbagai macam enzim selulase. Enzim-enzim ini tidak hanya dapat menghidrolisis substrat yang sama tetapi juga dapat bekerja secara sinergis memecah substrat yang sama, sehingga menyebabkan aktivitas yang diukur dipengaruhi oleh proporsi dari masing-masing enzim yang ada.

2. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim selulase

a. Substrat

Enzim mempunyai spesifitas yang tinggi. Apabila substrat cocok dengan enzim maka kinerja enzim juga akan optimal.

maka bagian aktif enzim akan terganggu dan kecepatan reaksinya pun akan menurun.

d. pH

Enzim selulase pada umumnya stabil pada kisaran pH 5,0-8,0. Perubahan pH lingkungan sangat berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks substrat. Jika kondisi pH rendah atau pH tinggi dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan akan mengakibatkan aktivitas enzim menjadi turun.

e. Pengaruh ion

Stabilitas enzim termasuk selulase dapat dipertahankan dengan teknik modifikasi kimia dengan penambahan bahan tambahan atau aditif yang telah diketahui dapat mempertahankan stabilitas enzim. Aditif digolongkan menjadi beberapa kelompok, yaitu substrata atau koenzim, ion logam, garam, anion dan kation, gula, dan glikol serta aditif lainnya.

f. Konsentrasi inokulum

Enzim selulase diperlukan jumlah inokulum dan waktu inkubasi (fermentasi) dalam jumlah yang sesuai agar mendapatkan enzim selulase yang optimal, sehingga aktivitas enzim selulase maksimal. Konsentrasi inokulum adalah jumlah mikroorganisme yang ditambahkan dalam

Sedangkan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim selulase dihitung berdasarkan (Nency, 2012) dengan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{aktivitas enzim}}{\text{konsentrasi protein}}$$

TES FORMATIF 4

1. Apa yang kamu ketahui tentang aktivitas enzim?
2. Apa saja faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim? Jelaskan!
3. Bagaimana cara mengukur aktivitas enzim selulase? jelaskan!

G. Produksi Enzim Selulase

Tahap produksi enzim merupakan tahap dimana enzim selulase dihasilkan melalui proses fermentasi limbah pertanian sebagai akibat dari metabolisme kapang. Menurut Gandjar (2006) pada proses fermentasi dilakukan pemberian larutan nutrisi untuk melengkapi nutrisi yang dapat merangsang pertumbuhan jamur. Nutrisi ini berupa karbon, nitrogen, hidrogen dan mineral seperti fosfor, sulfur, kalsium, kalium dan magnesium.

Sumber karbon yang digunakan berupa selulosa yang berasal dari ampas sagu. Karbon berfungsi sebagai unsur utama dalam



Gambar 2.11. Media Nutrisi Mendels

2. Produksi crude enzim selulase

Komponen utama dalam memproduksi enzim adalah mikro organisme selulolitik dan substrat selulosa. Namun, untuk meningkatkan produktivitas enzim selulase perlu menggunakan larutan nutrisi yang berfungsi untuk memenuhi kebutuhan unsure yang dibutuhkan kapang untuk tetap hidup. Agar kapang terbiasa dan dapat bertahan hidup pada larutan nutrisi, maka proses aklimatisasi perlu dilakukan. Aklimatisasi adalah suatu upaya penyesuaian fisiologis atau adaptasi suatu organisme terhadap lingkungan baru yang akan kapang nantinya mampu menyesuaikan diri dan bertahan hidup pada lingkungan dengan medium nutrisi pada proses produksi enzim.

Langkah-langkah produksi selulase:

b. Persiapan inokulum kapang

Produksi enzim dengan fermentasi cair dapat menggunakan kapang yang ditumbuhkan pada medium cair. Medium cair ini adalah PDB (*Potato Dextrose Broth*). Kapang ditumbuhkan pada medium PDB dengan *rotary shaker*. Cara memindahkan kapang yang berada pada cawan petri medium PDA adalah mengambil 2-3 ose kedalam akuades steril, kemudian divorteks hingga spora keluar dan air akuades menjadi keruh, kemudian disuspensikan kedalam media PDB. Kapang yang disuspensikan ke medium PDB sebanyak 10%. Bentuk kapang yang ditumbuhkan pada media PDB berbentuk granul (bulat-lonjong).

- 2) Menyiapkan larutan nutrisi yang telah di sterilisasi dan yang telah disesuaikan pada pH 5.
- 3) Menimbang substrat limbah pertanian sebanyak 1% (menyesuaikan penelitian) ke dalam botol
- 4) Menambahkan kapang sebanyak 10% dan larutan nutrisi kedalam botol yang telah terisi substrat limbah pertanian.
- 5) Meletakkan botol kedalam rotary shaker pada kecepatan 125 rpm selama 6 hari.



Media nutrisi



Media nutrisi + 1 % substrat + 10% kapang dari PDB yang berisi kapang



Di inkubasi pada rotary shaker selama 6 hari

d. Produksi

Tahap produksi:

- 1) Mengambil kapang yang telah berusia 6 hari dari media aklimatisasi 2 sebanyak 10%.
- 2) Menyiapkan larutan nutrisi yang telah di sterilisasi dan yang telah disesuaikan pada pH 5.
- 3) Menimbang substrat limbah pertanian sebanyak 1% (menyesuaikan penelitian) ke dalam botol.
- 4) Meletakkan botol ke dalam rotary shaker pada kecepatan 125 rpm selama waktu yang diinginkan.

Media Nutrisi Produksi +
1% substrat + 10%
Media Aklimatisasi 2



Diinkubasi pada rotary
shaker selama waktu
panen yang diinginkan



KEGIATAN PROJECT MAHASISWA "MEMPRODUKSI ENZIM SELULASE"

A. Tujuan

Mahasiswa mampu memproduksi enzim selulase dengan substrat limbah pertanian lokal.

B. Alat & Bahan

1. Alat

Tabung reaksi, rak tabung reaksi, timbangan digital, *hot plate*, gelas ukur, *beaker glass*, erlenmeyer, cawan petri, jarum ose, bunsen, kulkas, *incubator*, *autoclave*, pH meter, *magnetic stirrer*, *rotator orbital*, sentrifuge, sentrifuge tube, pipet volume, micropipet dan tip, spatula, mikroskop cahaya, *waterbath*, spektrofotometer, kertas saring Whatman No.1, alcohol 70%, *aluminium foil*, *wrapping plastic*, botol spre, korek api.

2. Bahan

Limbah pertanian, kapang selulolitik, *Potato Dextrose Agar*, akuades, NaOH 4%, Urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Peptone, *Yeast extract*, Tween 80, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

C. Petunjuk:

1. Buatlah kelompok yang terdiri dari 3 orang mahasiswa.
2. Desainlah penelitian produksi enzim selulase dengan kapang, substrat dan perlakuan yang berbeda (pH, waktu inkubasi, suhu, konsentrasi substrat) pada masing-masing kelompok
3. Produksilah enzim selulase sesuai dengan desain penelitian anda

C. Langkah

1. Mengukur kadar gula reduksi
 - a. Siapkan crude enzim selulase, masukkan sebanyak 1 ml kedalam tabung reaksi
 - b. Tambahkan CMC 1% pada tabung reaksi yang telah berisi crude enzim selulase
 - c. Lakukan inkubasi pada suhu 50°C Selama 30 menit
 - d. Tambahkan reagen DNS, Selanjutlah inkubasi pada suhu 100°C selama 5 s/d 15 menit sampai berwarna merah
 - e. Setelah dingin, letakkan pada kuvet dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.
 - f. Buatlah kurva standart glukosa.
 - g. Masukkan pada persamaan garis linier kurva standar glukosa
2. Mengukur kadar protein
 - a. Siapkan 0.05 ml crude enzim selulase, masukkan ke dalam tabung reaksi
 - b. Tambahkan 4 ml reagen Bradford dan diamkan hingga 5 menit
 - c. Letakkan larutan pada kuvet dan hitung absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm.
 - d. Buatlah kurva standar BSA
 - e. Masukkan persamaan garis liniernya
3. Mengukur aktivitas enzim selulase
 - a. Aktivitas enzim selulase

$$\text{Aktivitas (U/ml)} = \frac{\text{mg glukosa} \times 1000}{\text{Mr glukosa} \times t \times V}$$



BAB III

PURIFIKASI ENZIM SELULASE

A. Pengertian Purifikasi

Purifikasi merupakan suatu metode pemisahan enzim dari molekul-molekul protein lain sehingga didapatkan enzim murni. Purifikasi atau pemurnian protein dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya: fraksinasi garam ammonium sulfat, polaritas (pengendapan dengan etanol atau aseton), kelarutan relatif protein karena pengaruh pH (pengendapan isoelektrik). Purifikasi enzim dengan fraksinasi garam ammonium sulfat dilakukan secara bertahap dengan tujuan untuk dapat memperoleh enzim selulase yang semakin tinggi tingkat kemurniannya, dan ditandai dengan semakin meningkatnya aktivitas spesifik enzim tersebut. Purifikasi yang tidak dilakukan secara bertahap akan ditemukan protein yang berfungsi sebagai ko-enzim pada fraksi hasil filtrasi.

2
kekentalan cairan, dan hambatan oleh lapisan yang sudah terbentuk.

2. Kromatografi

Kromatografi merupakan cara pemisahan berdasarkan perbedaan interaksi antara komponen-komponen yang akan dipisahkan dengan fasa diam dan fasa gerak.

3. Kromatografi filtrasi gel

Kromatografi filtrasi gel merupakan pemisahan molekul berdasarkan perbedaan ukurannya. Perlakuan enzim selanjutnya adalah pemurnian berdasarkan ukuran dengan kolom kromatografi filtrasi gel menggunakan sephadex G-100. Sampel diteteskan pada bagian atas kolom gel sephadex G-100 yang berfungsi sebagai fase diam dan larutan buffer fosfat pH 8 yang berfungsi sebagai fase gerak.

4. Kromatografi Penukar Ion

Terdapat dua fasa dalam kromatografi kolom penukar ion, yaitu fasa diam dan fasa gerak. Dalam proses pertukaran ion, fasa gerak bertugas mengambil kembali ion-ion yang terkait pada penukar ion dengan jalan mengalirkannya melalui tumpukan penukar ion. Pada umumnya proses ini berlangsung pada sebuah kolom, dan fasa gerak ini dialirkan dari atas ke bawah dengan kecepatan tertentu, sehingga mampu menyebabkan reaksi pertukaran ion ketika fasa gerak mengalir melalui tumpukan resin penukar ion.

akan melindungi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul sehingga protein melarut, peristiwa ini disebut *salting in*.

Teknik pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan serta ukuran berat molekulnya. Metode pemurnian enzim diantaranya pengendapan, filtrasi, dan kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas dan filtrasi.

1. Pengendapan

Pengendapan biasa dilakukan dengan menggunakan ammonium sulfat, pelarut organik, dan polimer dengan berat molekul tinggi.

2. Dialisis

Dialisis adalah suatu teknik pemisahan dengan cara menggunakan membrane yang memisahkan dua frasa cairan. Membran tersebut bersifat semipermeabel terhadap partikel solute. Partikel solute berpindah melalui membran ke larutan dengan konsentrasi rendah. Dialisis digunakan untuk memisahkan garam-garam dari suspensi dalam biokimia dengan tujuan untuk mencegah koagulasi atau penggumpalan.

3. Filtrasi

Filtrasi merupakan pemisahan padatan dari sejumlah larutan melalui sebuah penyaring sehingga partikel padat akan tertahan di

dan fasa gerak ini dialirkan dari atas ke bawah dengan kecepatan tertentu, sehingga mampu menyebabkan reaksi pertukaran ion ketika fasa gerak mengalir melalui tumpukan resin penukar ion.

Pemurnian dengan amonium sulfat, purifikasi atau pemurnian merupakan suatu metode pemisahan enzim dari molekul-molekul protein lain sehingga didapatkan enzim murni. Purifikasi atau pemurnian protein dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya: fraksinasi garam ammonium sulfat, polaritas (pengendapan dengan etanol atau aseton), kelarutan relatif protein karena pengaruh pH (pengendapan isoelektrik). Purifikasi enzim dengan fraksinasi garam ammonium sulfat dilakukan secara bertahap dengan tujuan untuk dapat memperoleh enzim selulase yang semakin tinggi tingkat kemurniannya, dan ditandai dengan semakin meningkatnya aktivitas spesifik enzim tersebut. Purifikasi yang tidak dilakukan secara bertahap akan ditemukan protein yang berfungsi sebagai ko-enzim pada fraksi hasil filtrasi.

Purifikasi protein menggunakan prinsip *salting out*, yaitu pengendapan protein (enzim) karena garam ammonium sulfat berikatan dengan air. Molekul protein terdiri dari asam amino hidrofilik dan asam amino hidrofobik. Asam amino hidrofilik berinteraksi dengan air sehingga protein akan larut dalam air

3. Peremajaan kapang *Trichoderma viride* pada media PDA.
4. Inokulasi *Trichoderma viride* dari medium PDA ke medium PDB dengan cara memindahkan 1 tabung inokulum dalam 100mL medium PDB aseptis lalu dikocok di rotator selama 6X24 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 130 rpm (Azizah, 2017).
5. Produksi enzim selulase dilakukan dengan menginokulasi secara aseptis 100mL (10% v/v dari total volume fermentasi) ke dalam 1.000mL medium fermentasi yang terdiri dari:

Nama bahan	Gram/Liter
Urea	0,3
(NH ₄)SO ₄	1,4
KH ₂ PO ₄	2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,4
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
Pepton	0,75
Yeast extract	0,25
Tween 80	2 ml
Bubuk substrat	1
MnSO ₄ . 7H ₂ O	1,6
FeSO ₄ . 7H ₂ O	5
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,4
CoCl ₂ .6H ₂ O	2

Kemudian disterilkan pada suhu 121^oC selama 15 menit dalam autoklaf. Selanjutnya media fermentasi yang berisi 10% medium inokulum di kocok dalam rotator dengan kecepatan 120 rpm selama 6X24 jam.

10. Memisahkan natan dan supernatan.



Gambar 3.3.
Natan dan supernatant
Sumber: Fajarwati, 2018

11. Menguji aktivitas enzim hasil purifikasi pada setiap fraksi.
12. Menambahkan ammonium sulfat pada supernatan fraksi yang diperoleh berdasarkan tingkat kejenuhan fraksi selanjutnya.

TUGAS MANDIRI

Kerjakan soal berikut dengan benar dan lengkap!

1. Bagaimana teknik pemurnian dengan metode kromatografi filtrasi gel?
2. Apa yang terjadi jika urea dan pepton tidak ada dalam media produksi?
3. Mengapa penambahan ammonium sulfat harus dilakukan dengan suhu 4°C ?

membentuk kupro oksida ini dioksidasi kembali dengan asam arsen molibdat yang akan membentuk warna biru arsenmolibdat. Bahan yang dibutuhkan pereaksi ini adalah $ZnSO_4$ 5%, Barium hidroksida (BaOH) 0,3 N, Na_2PO_4 , Na-K tartrat, NaOH 1 N, ammonium molibdat, H_2SO_4 , dan asam molibdat.

c. Metode Luff-Schoorl

Metode ini digunakan untuk menentukan kandungan glukosa secara kuantitatif dalam bahan yang akan diuji, misalnya pada reaksi titrasi indometri dari kelebihan Cu. Bahan yang dibutuhkan adalah asam sitrat, Na_2CO_3 anhidrat, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, CH_3COOH , iodium 0,1 N, HCl 0,75 N, Na-tiosulfat 0,1 N, dan larutan pati.

d. Metode Dinitrosalisilat (DNS)

Metode ini digunakan untuk mengukur gula pereduksi dengan teknik kolorimetri. Metode ini hanya dapat mendeteksi satu gula pereduksi, misalnya glukosa. Glukosa memiliki gugus aldehida, sehingga dapat dioksidasi menjadi gugus karboksil. Gugus aldehida yang dimiliki oleh glukosa akan dioksidasi oleh asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi gugus karboksil dan menghasilkan asam 3-amino-5salisilat pada kondisi basa dengan suhu 90-100°C. Senyawa ini dapat

bereaksi dengan polipeptida atau ikatan peptide yang menyusun protein, dan membentuk senyawa kompleks berwarna ungu atau violet. Protein melarutkan tembaga untuk membentuk warna. Bahan yang dibutuhkan adalah Natrium hidroksida 10% dan larutan tembaga sulfat 0,1%.

b. Uji heller

Uji ini dapat digunakan untuk menentukan adanya protein secara kualitatif dan cepat. Protein akan terkoagulasi dengan adanya asam kuat atau akibat panas. Bahan yang dibutuhkan adalah asam nitrat.

c. Uji Bradford

Uji Bradford dilakukan berdasarkan pengamatan absorban maksimum untuk larutan *Coomassie Brilliant Blue G-250* yang berkisar dari 465 ke 595 nm, ketika terjadi pengikatan protein. Kedua interaksi bersifat hidrofobik dan menstabilkan ion bentuk anionic pewarna yang menyebabkan perubahan warna terlihat. Bahan yang dibutuhkan untuk membuat reagen adalah *Coomassie Brilliant Blue G-250*, etanol 95%, dan asam fosfat 85%.

d. Uji Lowry

Uji ini merupakan uji pilihan untuk menentukan kadar protein dalam suatu bahan. Protein akan bereaksi dengan

suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang 540 nm. Pereaksi DNS dapat bekerja dengan adanya komponen pendukung yang membantu kerja DNS yaitu KNa-Tartarat, fenol, sodium bisulfit (Na_2SO_3), dan natrium hidroksida (NaOH).

Prinsip pengujian dengan metode dinitrosalisilat (DNS) adalah gugus aldehyd pada rantai polisakarida dioksidasi menjadi gugus karboksil, disaat yang bersamaan, gugus aldehyd gula akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Reaksi tersebut akan berlangsung terus-menerus selama terdapat gula pereduksi dalam larutan yang diujikan (Hasanah dan Iwan, 2015). Adanya gula pereduksi pada sampel akan bereaksi dengan larutan DNS yang awalnya berwarna kuning menjadi warna jingga kemerahan. Prosedur pembuatan reagen DNS sebagai berikut:

1. Menimbang 1 g DNS (3,5-dinitrosalisilat) dan 1 g NaOH.
2. Melarutkan ke dalam 20 mL aquades (Larutan A).



Gambar 3.4
Larutan DNS dan NaOH
Sumber: Fajarwati, 2018

Reagen *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) akan bebas berwarna merah kecoklatan jika berada pada suasana basa. Hal ini dikarenakan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) mengandung residu asam amino dengan rantai samping aromatik (Tyrosine, Tryptophan dan Phenylalanine) atau bersifat basa (Arginine, Histidine dan Leucine) sehingga absorpsi diukur pada panjang gelombang 465 nm. Namun, reagen CBB akan berwarna biru jika berada pada suasana asam. Selanjutnya langkah-langkah pembuatan reagen Bradford sebagai berikut:

1. Menimbang 10 mg *Comasie Brilliant Blue* (CBB) G-250.



Gambar 3.8
Comasie Brilliant Blue (CBB)
G-250
Sumber: Fajarwati, 2018

2. Melarutkan dalam 5 mL etanol (C_2H_5OH) 95%.



Gambar 3.9
Penambahan etanol
Sumber: Fajarwati, 2018

merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan (Triyati, 1985). Metode ini memerlukan suatu proses pengompleksan sehingga dapat membentuk warna yang spesifik pada larutan agar terukur dalam spektrofotometer UV-Vis.

LEMBAR KEGIATAN PROYEK MAHASISWA

A. Indikator : Membuat reagen DNS dan Bradford

B. Tujuan : Mahasiswa mampu membuat reagen DNS dan Bradford melalui praktikum

C. Alat dan Bahan:

- | | |
|-------------------------------|----------------------------------|
| 1. Magnetic stirrer | 8. Dinitrosalisilat (DNS) |
| 2. Erlenmeyer | 9. Na-K tartrat |
| 3. Neraca analitik | 10. NaOH |
| 4. Gelas ukur | 11. Aquades |
| 5. Spatula | 12. Etanol 95% |
| 6. Corong kaca | 13. Asam fosfat 85% |
| 7. Kertas saring whatman no.1 | 14. Comassie Brillian Blue (CBB) |

D. Cara Kerja

1. Reagen DNS
 - a.
 - b.
 - c.
2. Reagen Bradford
 - a.
 - b.
 - c.



Gambar 3.12
Larutan Standar Glukosa
Sumber: Fajarwati, 2018

Prosedur pembuatan kurva standar BSA dengan konsentrasi 1 mg/mL sebagai berikut:

1. Menimbang 0,01 g BSA.
2. Melarutkan dalam 10 mL aquades, larutan ini sebagai larutan stok BSA.
3. Mengencerkan larutan glukosa dengan konsentrasi 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 1 mg/mL.
4. Mengambil 1 ml larutan standar BSA 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 1 mg/mL dan memasukkan ke dalam tabung reaksi.
5. Memasukkan 4 mL reagen Bradford dan menghomogenkan.
6. Menginkubasi selama 5 menit.
7. Setelah dingin mengukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 595 nm.



Gambar 3.13
Larutan Standar BSA
Sumber: Fajarwati, 2018

1. Memipet enzim sebanyak 0,2 mL.



Gambar 3.14
Memipet enzim
Sumber: Fajarwati, 2018

2. Menambahkan 0,8 mL CMC 1% yang dilarutkan dalam buffer sitrat.



Gambar 3.15
Memipet CMC 1%
Sumber: Fajarwati, 2018

3. Menambahkan 1 mL buffer sitrat kemudian menghomogenkan.
4. Menginkubasi di *waterbath* selama 10 menit pada suhu 50°C.



Gambar 3.16
Inkubasi suhu 50°C
Sumber: Fajarwati, 2018

Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Aktivitas enzim selulase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/mL. Aktivitas enzim selulase ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi yang diperoleh dari konsentrasi glukosa standar, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$AE = \frac{C}{BM \text{ Produk} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Keterangan:

AE = Aktivitas enzim (Unit/mL)

C = Konsentrasi glukosa

BM = Berat molekul glukosa (180 g/mol)

T = Waktu inkubasi (menit)

H = Volume total enzim-substrat (mL)

E = Volume enzim

Setelah diketahui aktivitas enzim selanjutnya menentukan kadar total protein dengan metode *Bradford*. Langkah-langkah uji kadar protein sebagai berikut:

1. Mengambil cairan enzim selulase (supernatan) sebanyak 0,2 mL.



Gambar 3.20
Memipet enzim
Sumber: Fajarwati, 2018

LEMBAR PROYEK MAHASISWA

A. Indikator

Menghitung aktivitas enzim dan kadar protein.

B. Tujuan

Mahasiswa mampu menghitung aktivitas enzim dan kadar protein melalui praktikum.

C. Alat dan Bahan

1. Spektofotometer
2. Kuvet
3. Pipet volum
4. Gelas beker
5. Kompor listrik
6. *Waterbath*
7. Rak tabung reaksi
8. Tabung reaksi
9. Mikro pipet
10. Enzim
11. Reagen DNS
12. Reagen Bradford
13. Aquades
14. Bufer sitrat

D. Cara Kerja

1. Uji Gula Reduksi
 - a.
 - b.
2. Uji Kadar Protein
 - a.
 - b.

E. Hasil

1. Kadar Gula Reduksi

No	Sampel	Absorbansi	Kadar Glukosa (mg/mL)	Aktivitas Enzim (U/mL)
1				
2				
3				



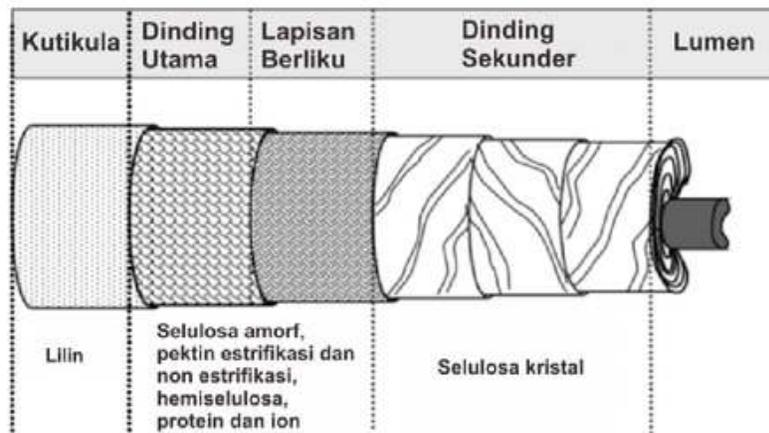
BAB IV

APLIKASI ENZIM SELULASE

A. Penggunaan Enzim selulase

Penggunaan enzim dalam bidang industri sangatlah menjanjikan karena afek yang ditimbulkan dalam hasil akhir dalam limbah dapat diminimalkan karena enzim bersifat biodegredebel mudah diurai. Pabrik yang menggunakan teknologi enzim cenderung memiliki modal lebih rendah dan biaya energi lebih sedikit. Penggunaan enzim dalam industri khususnya pada industri tekstil adalah relatif baru. Enzim saat ini telah digunakan dalam berbagai aplikasi untuk meningkatkan metode produksi dan finishing kain pada dalam industri tekstil. Proses enzimatik banyak dilakukan karena dapat mengurangi penggunaan air dan energi. Prosentase enzim yang digunakan untuk industri tekstil sekitar 11%.

Salah satu aplikasi enzim tertua di industri tekstil adalah penggunaan amilase untuk menghilangkan pati yang digunakan saat proses "sezing". Benang warp (benang



Gambar 4.1. Skema lapisan serat kapas (Rocky, 2012)

Komposisi dari serat kapas meliputi selulosa (90% -94%), wax (0,6%1,3%), *pectic substance* (0,9% -1,2%), protein (0,6% -1,3%), abu ($\pm 1,2\%$), asam organik ($\pm 0,8\%$) dan bahan lain ($\pm 1,2\%$). Tujuan utama dari penggosokan/ scouring adalah untuk menghilangkan wax, pectins, hemi-selulosa dan mineral-mineral bawaan dari serat kapas mentah. Proses tersebut dilakukan pada tahap awal pengolahan tekstil dengan tujuan untuk meningkatkan daya serap kapas sehingga akan mengoptimalkan proses selanjutnya seperti *mercerizing*, *bleaching*, *dyeing*, *printing* dan *finishing*.

Scouring merupakan proses penggosokan kain/kapas pada industri textile dengan menggunakan bahan alam seperti enzim (selulase, pectinase).

Penelitian yang telah dilakukan untuk mengetahui potensi enzim selulase yang berasal dari kapang *Trichoderma viride*, penggunaan enzim sebanyak 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%. Kontrol menggunakan NaOH sebagai kontrol positif dan aquades sebagai kontrol negatif. Berikut langkah-langkah dalam proses bioscouring:

Mempersiapkan kain blacu atau kain yang belum di scouring dan menimbanginya pada timbangan digital seberat 4 gr sebagai berat awal pada masing-masing kain balcu sebelum diberi perlakuan. Proses pemasakan atau *bioscouring* kain menggunakan resep dengan vlot 1:40, dan kontrol positif NaOH sebanyak 7 gr dalam 1 liter aquades.

1. Pemasakan kain dengan enzim 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%.

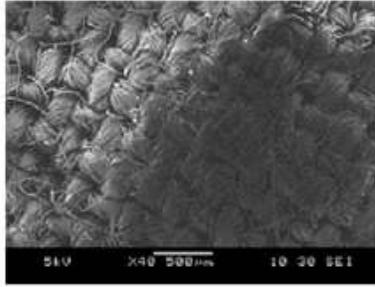
Kain yang digunakan di timbang dengan berat 4 gr sebagai berat awal sebelum di beri perlakuan pada setiap masing masing kain, kemudian menghitung jumlah larutan (aquades) yang akan digunakan dengan vlot 1:40. Kebutuhan aquadesnya sebanyak 160 ml, aquades diukur dengan gelas ukur dan di tuangkan pada gelas beker. Menghitung kebutuhan enzim 1% dalam 160 ml larutan dengan kebutuhan sebanyak 1,6 ml, kebutuhan enzim 2% sebanyak 3,2 ml, kebutuhan enzim 3% sebanyak 4,8 ml, kebutuhan enzim 4% sebanyak 6,4 ml,

2. Pemasakan kain dengan NaOH

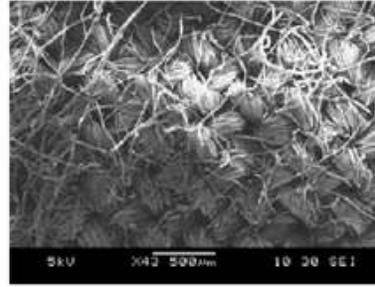
Kain yang digunakan di timbang dengan berat 4 gr sebagai berat awal sebelum di beri perlakuan pada setiap masing masing kain, kemudian menghitung jumlah larutan (aquades) yang akan digunakan dengan vlot 1:40. Kebutuhan aquadesnya sebanyak 160 ml, aquades diukur dengan gelas ukur dan di tuangkan pada gelas beker. Menghitung kebutuhan NaOH dalam 160 ml larutan. NaOH yang dibutuhkan yaitu sebanyak 1,12 g. NaOH tersebut di masukkan dalam gelas beker yang telah berisi aquades selanjutnya kain dimasukkan dan di panaskan pada *hot plate* dengan suhu 40-50°C selama 1 jam. Larutan yang digunakan untuk pemasakan kain tersebut kemudian di ganti dengan aquades baru selanjutnya dipanaskan lagi dengan suhu 75-90°C selama 15 menit. Kain diambil dan dibilas sampai bersih menggunakan air dingin, kemudian dikeringkan dengan suhu 65°C selama 1 hari.

3. Uji prosentase penurunan berat kain

Perhitungan prosentase pengurangan berat kain dengan menggunakan formula, % penurunan berat kain = $\frac{x-y}{y} \times 100$, dimana x adalah berat kain sebelum perlakuan, dan y adalah berat kain sesudah perlakuan.

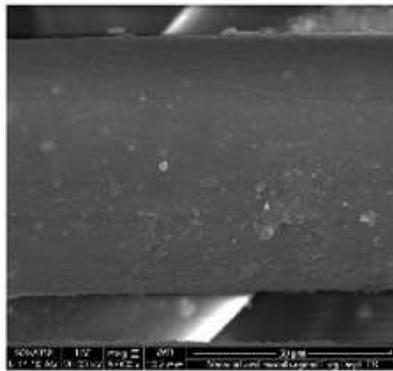


Gambar 4.7 SEM gambar permukaan kain Kontrol negatif (40 X) (Adivarekar, 2013)

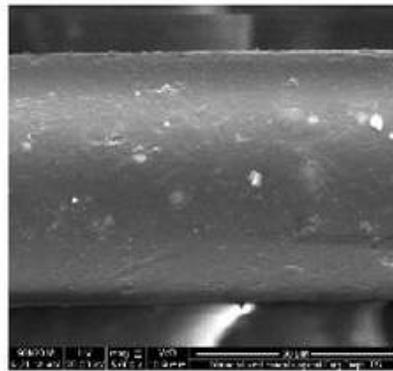


Gambar 4.8 SEM gambar permukaan kain *scouring alkalin* (43 X) (Adivarekar, 2013)

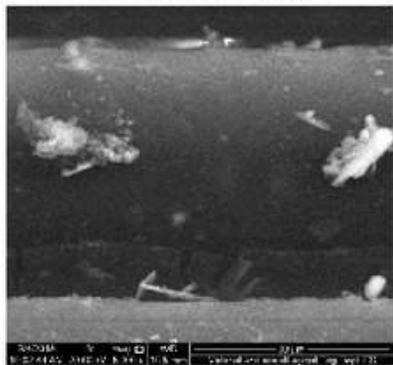
E. Data Hasil Penelitian untuk Perbandingan Proyek Mahasiswa



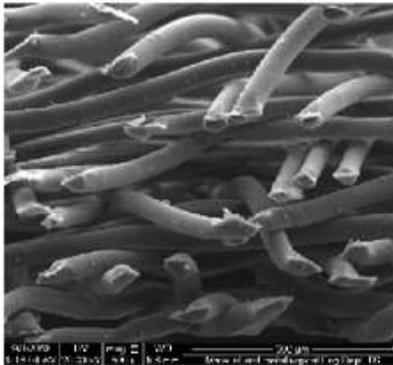
Gambar 4.9 SEM gambar permukaan kain Kontrol negatif (5000X) (Pratondo, 2018)



Gambar 4.10 SEM gambar permukaan kain Kontrol positif (5000X) (Pratondo, 2018)



Gambar 4.11 SEM gambar permukaan kain *bioscouring selulase* (5000X) (Pratondo, 2018)



Gambar 4.12 SEM gambar permukaan kain Kontrol negatif (500X) (Pratondo, 2018)

Tabel 4.2 Kecepatan Daya Serap Kain Terhadap Zat Warna (detik).

Perlakuan	Kain Blacu					
	Sudan III		Naftol (C ₁₀ H ₈ O)		Congo Red	
	U ₁	U ₂	U ₁	U ₂	U ₁	U ₂
Kontrol negatif	10	14	885	919	3073	3033
Kontrol positif	3	5	647	697	1869	1901
Enzim 1%	8	9	768	832	2980	2985
Enzim 2%	7	8	733	741	2965	2924
Enzim 3%	4	5	521	524	2914	2899
Enzim 4%	3	3	364	379	2424	2552
Enzim 5%	1	2	348	310	2222	2233

Keterangan:

U₁ = Ulangan 1

U₂ = Ulangan 2

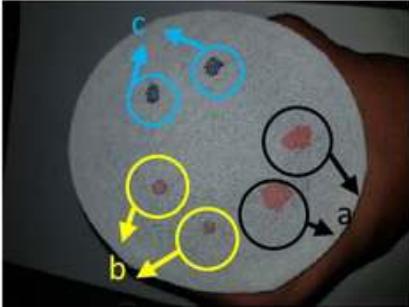
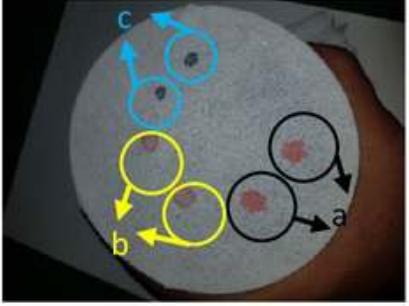
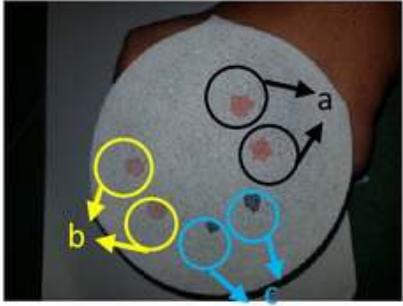
Tabel 4.2 menunjukkan bahwa prosentase enzim yang digunakan akan membuat semakin cepat pula daya serap kain terhadap zat warna hal ini menandakan bawah semakin besar penghilangan lemak, wax, ataupun kotoran yang ada pada kain sehingga daya serapnya semakin cepat.

3. Prosentase Pengurangan Berat Kain

Data pengamatan prosentase pengurangan berat kain dapat dilihat pada tabel 4.3 berikut ini:

Tabel 4.3 Prosentase Pengurangan Berat Kain (%).

Perlakuan	Kain Blacu		
	U ₁	U ₂	U ₃
Kontrol negatif	0,25	0,5	0,25
Kontrol positif	1,25	1	1
Enzim 1%	0,5	0,5	0,5
Enzim 2%	0,5	0,75	0,75
Enzim 3%	0,75	0,75	0,75
Enzim 4%	0,75	0,75	1
Enzim 5%	1	1,25	1

Perlakuan	Keterangan
 <p data-bbox="607 763 760 806">Enzim 1%</p>	<p data-bbox="932 451 1097 575">Sudan III Congo red Naftol</p>
 <p data-bbox="607 1150 760 1193">Enzim 2%</p>	<p data-bbox="932 860 1097 983">Sudan III Congo red Naftol</p>
 <p data-bbox="607 1559 760 1602">Enzim 3%</p>	<p data-bbox="932 1241 1097 1365">Sudan III Congo red Naftol</p>



GLOSARIUM

- Selulase : Nama bagi semua enzim yang memutuskan ikatan glikosidik beta-1,4 di dalam selulosa, sedodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya.
- Selulosa : Selulosa merupakan senyawa organik dengan rumus $(C_6H_{10}O_5)_n$, sebuah polisakarida yang terdiri dari rantai linier dari beberapa ratus hingga lebih dari sepuluh ribu ikatan $\beta(1 \rightarrow 4)$ unit D-glukosa. Selulosa merupakan komponen struktural utama dinding sel dari tanaman hijau.
- Kapang Selulolitik : Kapang yang memiliki kemampuan menyerang atau mendegradasi selulosa terutama pada kondisi aerob
- Substrat : Reaktan dalam reaksi yang dikatalisis enzim. Substrat merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi proses fermentasi.
- Aklimatisasi : Aklimatisasi merupakan suatu upaya penyesuaian fisiologis suatu organisme terhadap lingkungan baru. Tujuan aklimatisasi adalah agar kapang nantinya mampu menyesuaikan diri dan bertahan hidup pada lingkungan dengan medium nutrisi pada proses produksi enzim.
- Waktu Inkubasi : Masa antara inokulasi sampai pertumbuhan koloni yang karakteristik atau sampai terjadinya gejala penyakit yang khas yang ditimbulkan oleh jasad