

PRODUKSI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM SELULASE DARI BAKTERI *Bacillus subtilis*

Al Maratun Sholihati¹, Maswati Baharuddin¹, Santi²

¹Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar

²Prodi Anakes STIKes Mega Rezky Makassar

Email: syifah_qolby1453@yahoo.co.id

Abstract: *Enzyme cellulose can be produced from bacteria Bacillus subtilis. This bacteria is a kind of bacteria which grounded on the genus that can degrade cellulose to glucose. Cellulase enzyme acquired different optimum pH and temperature depends on the bacteria. This research aim to produce and analyze the activity of the cellulose enzyme from bacteria Bacillus subtilis at optimum pH and temperature. The research of this enzyme cellulose derived by prolific process and rejuvenation bacteria Bacillus subtilis on the nutrition culture, nutrition selective, and nutrition production that executed by cold centrifugation to obtain extract or the enzyme cellulose at the temperature of 4°C, 3500 rpm within 15 minutes. On the determine pH with variety pH 5,6 using buffer acetat and pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; and 8.0 using phosphate buffer while on the determine temperature using variety temperature 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, and 50°C which the next make an experiment activity enzyme cellulose by method Nelson-Somogy that measured in spectrophotometer UV-Vis of 540 nm. The result shows that the highest enzyme activity at optimum pH of 6,0 is $4,3661 \times 10^{-3}$ U/mL and in optimum temperature of 30°C as is $5,6609 \times 10^{-3}$ U/mL.*

Keywords: *Bacillus subtilis, cellulose, activity enzyme, pH and temperature*

1. PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara yang kaya akan mikroorganisme yang memberikan manfaat bagi manusia terutama pemanfaatannya untuk memproduksi bahan-bahan yang bernilai ekonomis salah satunya adalah enzim (Dali, dkk., 2009). Enzim pada umumnya selain dapat diperoleh dari mikroorganisme juga dapat diproduksi dari tanaman dan hewan, tetapi Mikroorganisme yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim. Mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting

dalam usaha produksi enzim baik yang berupa bakteri atau kapang (Akhdiya, 2003).

Mikroorganisme biasa berasal dari air, tanah dan udara yang memberikan kontribusi besar bagi manusia terutama dalam hal produk pangan dan obat-obatan. Produk tersebut dihasilkan oleh bioteknologi industri yang banyak memanfaatkan enzim sebagai katalis dalam suatu reaksi kimia dalam pembentukan produk tanpa ikut bereaksi di dalamnya. Salah satu enzim yang digunakan adalah enzim selulase yang dihasilkan dari bakteri *Bacillus subtilis*. Produksi selulase secara komersial biasanya menggunakan kapang atau bakteri. Kapang yang bisa menghasilkan selulase adalah *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* sedangkan bakteri yang bisa menghasilkan enzim selulase adalah *Pseudomonas*, *Cellulomonas* dan *Bacillus* (Gunam dkk., 2011).



Gambar 1. Bakteri *Bacillus subtilis*

Klasifikasi bakteri *Bacillus subtilis*, yaitu:

Kingdom : Bacteria
Phylum : Firmicutes
Class : Bacilli
Order : Bacillales
Family : Bacillaceae
Genus : *Bacillus*
Species : *B. subtilis* (Kosim dan Putra, 2010)

Bacillus subtilis termasuk jenis *Bacillus sp.*(satu family). Bakteri ini termasuk bakteri gram positif, yakni katalase positif yang umum ditemukan di tanah, air, udara dan materi tumbuhan yang terdekomposisi (debu). *Bacillus sp.* bersifat aerobik oleh karena itu dalam proses fermentasi harus diperhatikan dengan baik. Bakteri ini mampu membentuk endospora ketika kondisi lingkungan yang tertekan. Spora ini dapat bertahan 60 tahun atau lebih pada kondisi lingkungan ekstrim (Sakti, 2012).

Bakteri ini diketahui mampu menghasilkan enzim selulase bila ditempatkan dalam lingkungan yang terdapat selulosa. Secara umum ada 4 kelompok pembagian mikroorganisme berdasarkan suhu lingkungan tempatnya hidup yaitu *psikofil*, *mesofil*, *termofil* dan *hipertermofil*. *Psikofil* adalah kelompok mikroba yang dapat tumbuh pada suhu 0°C-25°C. *Mesofil* adalah kelompok mikroba yang pada umumnya mempunyai suhu berkisar antara 20°C-50°C. Mikroba *termofil* umumnya mempunyai membran sel yang mengandung lipida jenuh sehingga titik didihnya tinggi. Selain itu dapat memproduksi protein termasuk enzim yang tidak terdenaturasi pada suhu tinggi di dalam DNA-nya yang mengandung guanin dan sitosin dalam jumlah yang relatif besar, sehingga DNA tetap stabil pada suhu tinggi. Kelompok mikroba ini suhunya berkisar antara 45°C-80°C dan hipertermofil yaitu mikroba yang bertahan pada kisaran antara suhu 80°C-100 °C (Sianturi, 2008).

Selulase merupakan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme di luar sel. Produksi enzim dalam mikroorganisme dapat dikontrol untuk meningkatkan produktivitas enzim oleh mikroorganisme tersebut. Selulase yang dihasilkan bergantung pada hubungan kompleks yang melibatkan berbagai variasi faktor antara lain; ukuran inokulum, pH, rasio C:N, suhu, aditif medium, waktu pertumbuhan dan sebagainya.

Enzim selulase digunakan untuk menghidrolisis selulosa. Selulosa merupakan senyawa organik Selulosa adalah polimer berantai lurus dari β - (1,4)-D-glukosa yang tidak larut dalam air yang tersusun dari 15.000 residu D-glukosa. Sub unit glukosa bergabung bersama karena adanya ikatan β -1,4 menghasilkan selulosa. Selulosa mengandung polimer karbohidrat terbanyak dengan ikatan β (1-6) glikosida).

Struktur amorf selulosa bersifat larut dalam air sedangkan bagian kristal bersifat tidak larut dalam air sehingga resisten terhadap degradasi secara kimia maupun biologis. Akibatnya, selulosa menjadi sulit dihidrolisis. Molekul selulosa sangat stabil dan memiliki waktu paruh 5-8 juta tahun untuk pemutusan ikatan β -glikosidiknya pada suhu 25°C. Beberapa hal yang dapat menghambat degradasi selulosa adalah tingkat kristalisasi, lignifikasi dan struktur kapiler selulosa terhadap enzim selulolitik dan senyawa hidrolitik lainnya.

Proses mendegradasi selulosa menjadi glukosa oleh enzim selulase terdapat tiga jenis enzim yang bekerja, yaitu:

1. Enzim endoglukanase yang menghidrolisis ikatan glikosidik β -1,4 secara acak dan bekerja terutama pada daerah amorf dari serat selulosa yang menghasilkan oligosakarida dan polimer yang panjangnya tereduksi, seperti

pada *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC). Endoglukanase mempunyai afinitas yang tinggi terhadap substrat CMC (CMC-ase).

2. Enzim exoglukanase atau Selobiohidrolase menyerang atau memotong residu selubiosil dari rantai selulosa yang ujung rantai selulosanya tidak tereduksi dan menghasilkan selobiosa.
3. Enzim endo β -glukosidase menghidrolisis selobiosa untuk menghasilkan dua unit glukosa (Sakti, 2012).

Tipe enzim selulase adalah biokatalis yang selektifitasnya sangat tinggi terhadap substrat (spesifik produk dan spesifik substrat). Enzim selulase memiliki aplikasi yang sangat banyak dalam dunia industri, yaitu; pada industri tekstil digunakan sebagai biopolishing kain untuk meningkatkan kelembutan dan kecerahannya, pada pakan ternak digunakan untuk meningkatkan kualitas gizi dan pencernaan hewan, meningkatkan produksi etanol dan enzim selulase digunakan dalam pembuatan kertas baru dari kertas bekas.

Kerja enzim dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, inhibitor, suhu dan pH. Pengaruh suhu dan pH selalu dijadikan parameter yang sangat penting dalam menentukan aktivitas enzim selulase, semakin tinggi pH dan suhu maka aktivitas enzimnya semakin meningkat mencapai titik optimum dan akan kembali turun jika enzim mengalami denaturasi.

Enzim diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme dengan beberapa cara antara lain; metode ekstraksi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi dan kromatografi. Enzim pada umumnya dihasilkan di dalam sel, beberapa diekstraksi melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Berdasarkan tempat kerjanya enzim dapat dibedakan mejadi 2 macam, yaitu enzim intraseluler dan ekstraseluler. Enzim intraseluler merupakan enzim yang langsung digunakan di dalam sel sedangkan Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang dilepas dari sel ke lingkungan untuk menghidrolisis molekul polimer di lingkungan, seperti selulosa, hemiselulosa, lignin Enzim ekstraseluler dapat dipisahkan dari lingkungan dengan filtrasi ataupun sentrifugasi sedangkan enzim intraseluler dapat diekstrak dari dalam sel lewat proses pemecahan sel. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatan merupakan cairan yang berisi enzim.

Ukuran kemurnian enzim dinyatakan sebagai aktivitas spesifik yang didefinisikan sebagai jumlah enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik enzim dapat ditentukan dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar proteinnya. Aktivitas selulase didapat dengan menentukan kadar D-glukosa yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis selulosa. Penentuan kadar D-glukosa

dilakukan dengan menggunakan metode *Nelson-Somogy*. dengan menggunakan alat instrumen spektrofotometer UV-Vis.

Beberapa hasil penelitian sebelumnya pada isolasi enzim selulase dari bakteri tertentu dengan variasi pH dan suhu menghasilkan pH dan suhu optimum dengan aktivitas enzimnya di antaranya, yaitu; Masfufatun (2012), pada pH optimum 5,2 menghasilkan aktivitas enzim selulase sebesar 0,053 U/mL dan pada suhu optimumnya 50°C menghasilkan aktivitas enzim selulase sebesar 0,033 U/mL. Saraswati, dkk., (2012) pada pH optimum 7 menghasilkan aktivitas enzimnya sebesar 31,87 U/mL dan pada suhu optimum 30°C aktivitas enzimnya sebesar 32,48 U/mL. Roida (2013), dengan variasi pH 4; 7; 7,5 dan 8. Aktivitas enzimnya pH 7 optimum 0,037 U/mL dan pada suhu 40 °C (suhu optimum) aktivitas enzimnya 0,027 U/mL. Penelitian Chandra (2012) menemukan bahwa variasi pH (7; 7,5 dan 8) menghasilkan pH optimum 7,5 dengan aktivitas enzimnya 1,6 U/mL dan pada variasi suhu (35°C, 40°C dan 45°C) menghasilkan suhu optimum 40°C dengan aktivitas enzim 8 U/mL, dari penelitian tersebut maka dilakukan penelitian ini yaitu produksi dan uji aktivitas enzim selulase dari bakteri *Bacillus subtilis*.

2. METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, inkubator, shaker, spektrofotometer UV-VIS, alat gelas laboratorium.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aquadest, media NA, yeast ekstrak, pepton, NaCl, MgSO₄.7H₂O, CaCl₂, bakto agar, CMC, mikroba *Bacillus subtilis*, *congo red*, buffer asetat untuk pH 5,6 dan buffer fosfat pH: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 dan 8,0), reagen *Nelson-Somog*, reagen *arsenomolibdat*.

Prosedur Kerja

Pembuatan media NA

Media NA dibuat dengan cara menimbang 2,3 gram media NA ke dalam gelas kimia berisi 100 mL aquadest. Larutan dipanaskan sambil diaduk agar bubuk NA larut sempurna. Setelah itu media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan cawan petri. Pada tabung reaksi, mulut tabung reaksi ditutup dengan kapas berlemak yang telah dibungkus dengan kasa steril. Media tersebut disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian media

padat dalam inkubator sampai memadat. Setelah memadat ditumbuhkan bakteri *Bacillus subtilis*.

Pembuatan media Selektif

Pembuatan media selektif yang akan digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Bacillus subtilis* dan memastikan hanya bakteri *Bacillus subtilis* yang tumbuh. Media ini dibuat dengan cara Medium selektif dibuat dengan melarutkan yeast ekstrak 0,2 gram, pepton 1% 0,2 gram, NaCl 0,1 gram, MgSO₄.7H₂O 0,01 gram, CaCl₂ 0,01 gram, bakto agar 1,5 gram, dan CMC 0,05 gram dengan aquadest sehingga volume akhir 100 mL pada erlemeyer selanjutnya larutan dipanaskan dan disterikan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri (Khadijah, 2012).

Sebanyak 1-2 ose isolat diambil dan digoreskan pada media selektif (media padat) untuk menumbuhkan mikroba *Bacillus subtilis*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C. Pengujian mikroba *Bacillus subtilis* sebagai penghasil enzim selulase dilakukan dengan metode *congo red* 0,1 % dengan cara meneteskan *congo red* 0,1 % pada permukaan media yang berisi isolat (media selektif). Bila pada media tersebut terdapat zona bening, maka hal tersebut menandakan enzim selulase diproduksi oleh isolat bakteri *Bacillus subtilis* sehingga pada daerah tersebut selulosa sudah terhidrolisis.

Setelah melakukan uji *congo red*, maka selanjutnya dilakukan produksi enzim selulase yang sebelumnya dilakukan proses pembuatan media inokulum dan penyiapan inokulum yang komposisi bahanya sama dengan media selektif, hanya dibedakan kalau pada media selektif ada campuran bakto agar sedangkan media inokulum tanpa bakto agar. Pada penyiapan inokulum media inokulum dishaker pada 150 rpm selama 24 jam dengan suhu 50°C.

Pada produksi enzim selulase, media produksi (media inokulum) dishaker pada 150 rpm selama 48 jam dengan suhu 50°C.

Uji Aktivitas Enzim Selulase

Pada uji aktivitas enzim dilakukan 2 variasi, yaitu variasi suhu dan pH.

pH Optimum

Pada penentuan pH optimum dilakukan dengan cara, menyediakan 6 tabung reaksi yang berbeda-beda, mengisi masing-masing tabung dengan larutan 1 mL CMC 1 %, kemudian ditambahkan 1 mL buffer (buffer asetat untuk pH 5,6 dan buffer fosfat pH: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 dan 8,0). Pada masing-masing tabung ditambahkan lagi sebanyak 1 mL ekstrak kasar enzim selulase, kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam. Campuran dalam tabung

reaksi dipanaskan selama 20 menit pada penangas air mendidih dan selanjutnya menentukan kadar gula reduksi dengan metode *Nelson-Somogy*.

Suhu Optimum

Pada penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara, yaitu menyediakan 6 tabung reaksi yang berbeda-beda, mengisi masing-masing tabung dengan larutan 1 mL CMC 1 %, kemudian ditambahkan 1 mL buffer pH optimum. Kemudian ditambahkan 1 mL ekstrak kasar enzim selulase. Campuran dalam tabung reaksi diinkubasi pada suhu berbeda (25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C) selama 1 jam. Setiap campuran dalam tabung reaksi dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 20 menit dan selanjutnya dilakukan penentuan kadar gula reduksi dengan metode *Nelson-Somogy*.

Pengujian terlebih dahulu dilakukan pada larutan standar glukosa (10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm) dan blanko yang telah disiapkan, yaitu dipipet masing-masing 1 mL kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berbeda, ditambahkan 1 mL reagen *Nelson* dan dikocok sampai homogen. Setiap tabung reaksi dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit lalu didinginkan pada suhu kamar. Setelah didinginkan ditambahkan 1 mL reagen *arsenomolibdat*. Campuran dikocok sampai homogen lalu ditambahkan lagi 7 mL aquadest langsung dikocok kembali sehingga campuran merata. Selanjutnya diukur pada alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Perlakuan yang sama dilakukan pada sampel, yaitu variasi pH dan suhu).

Satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya enzim yang menghasilkan 1 μ mol glukosa per menit (U/mL).

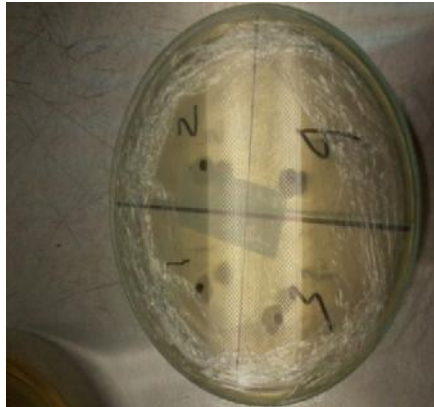
$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{[\text{glukosa}]}{Mr \text{ glukosa}} \times \frac{Fp}{V_{\text{enzim}}} \times \frac{V_{\text{substrat}}}{t}$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi Enzim Selulase dari Bakteri *Bacillus subtilis*

Pada produksi enzim selulase bakteri ditumbuhkan pada media selektif yang pertumbuhannya ditandai dengan adanya kekeruhan pada media. Magnesium (MgSO_4), natrium klorida (NaCl) dan kalsium klorida (CaCl_2) sebagai sumber ion dan mineral yaitu ion Mg^{2+} , Na^+ dan Ca^{2+} . Mineral berfungsi sebagai penyusun sel dan pengatur tekanan osmosis, kadar ion H^+ dan potensial oksidasi reduksi medium. yeast ekstrak sebagai sumber nitrogen dan CMC sebagai substrat yang berfungsi sebagai sumber karbon untuk bakteri

Bacillus subtilis dalam memproduksi enzim selulase. Air berfungsi sebagai komponen utama sel mikroba dalam medium yang berfungsi sebagai oksigen untuk bahan organik sel pada proses respirasi dan sebagai pelarut serta alat pengangkut dalam metabolismenya dan dengan penambahan bakto agar sebagai pematat media.



Gambar 2. Bakteri *Bacillus subtilis* pada media selektif

Selanjutnya setelah bakteri tumbuh dan berkembang dilakukan uji kualitatif bakteri *Bacillus subtilis* penghasil enzim selulase dilakukan dengan uji warna menggunakan larutan *congo red* 0,1 % yang hasilnya ditandai pembentukan zona bening pada isolat yang telah digoresi dengan isolat bakteri *Bacillus subtilis*.



Gambar 3. Uji Kualitatif metode *congo red*

Pada proses isolasi enzim selulase ini dilakukan pembuatan media inokulum dan media produksi, kemudian stok inokulum dijadikan sebagai starter dalam media produksi yaitu sebanyak 45 mL selanjutnya dilakukan proses sentrifugasi dingin dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C, kemudian dipisahkan filtrat yang menjadi ekstrak kasar enzim selulase dari residunya (enzim ekstraseluler).

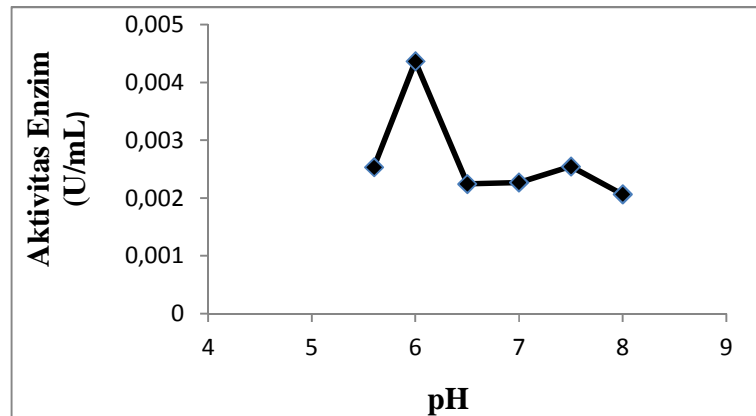


Gambar 4. Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Penentuan pH Optimum pada Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri *Bacillus subtilis*

Pada penentuan pH optimum dilakukan dengan cara, menyediakan 6 tabung reaksi yang berbeda-beda dan mengisi masing-masing tabung dengan larutan 1 mL CMC 1 % sebagai substrat, kemudian ditambahkan 1 mL buffer (buffer asetat untuk pH 5,6 dan buffer fosfat pH: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 dan 8,0) untuk mempertahankan pH larutan. Masing-masing tabung ditambahkan lagi sebanyak 1 mL ekstrak kasar enzim selulase, kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam agar substrat dapat dihidrolisi oleh enzim. Campuran dalam tabung reaksi dipanaskan selama 20 menit pada penangas air mendidih untuk menghentikan proses hidrolisis dan selanjutnya menentukan kadar gula reduksi dengan metode *Nelson-Somogy*. Pada penambahan reagen *Nelson* larutan berwarna biru, larutan ini akan mereduksi kupri oksida menjadi kupro oksida yang direduksi oleh glukosa dari enzim dan dimana K-Na-tartat yang terkandung dalam reagen *Nelson* berfungsi mencegah terjadinya pengendapan kupri oksida melainkan kupro oksida yang mengendap. Dilakukan pemanasan selama 20 menit untuk meningkatkan laju reaksi kupri oksida menjadi kupro oksida dan pemanasan tidak menyebabkan substrat CMC terhidrolisis karena tidak terjadi peningkatan gula pereduksi sehingga menghasilkan larutan berwarna merah bata, selanjutnya didinginkan selama beberapa menit agar reaksi berjalan stabil, karena apabila terlalu panas kemungkinan ada komponen

senyawa yang rusak atau habis menguap sedangkan pada penambahan reagen *arsenomolybdat* agar dapat bereaksi dengan kupro oksida. Tembaga (I) oksida akan kembali mereduksi senyawa *arsenomolibdat* menghasilkan kompleks *Molybdenum blue* (berwarna biru).



Gambar 5. Grafik hubungan pH dengan aktivitas enzim

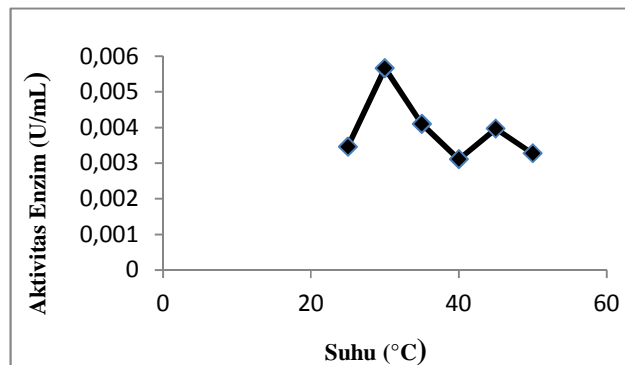
Warna berdasarkan konsentrasi glukosa, maka semakin tinggi konsentrasi maka warna yang terbentuk pada penambahan reagen *arsenomolybdat* juga semakin jelas kepekatannya, warna hijau pekat menandakan konsentrasi glukosanya sangat tinggi. Pada penambahan air berfungsi agar larutan tidak terlalu pekat, sehingga dapat terbaca absorbansinya yang akan diukur pada alat instrumen UV-Vis dengan panjang gelombang 540 nm. Pengujian ini dilakukan pada panjang gelombang 540 nm karena pada panjang gelombang ini molekul glukosa dapat menyerap cahaya secara optimum.

Berdasarkan grafik di atas yang merupakan hasil dari pengujian aktivitas enzim diperoleh data pada variasi pH, bahwa perubahan aktivitas enzim terhadap pH di mulai dari pH 5,6 dengan aktivitas enzim sebesar $2,5356 \times 10^{-3}$ U/mL dan mengalami peningkatan aktivitas pada pH 6,0 yang merupakan pH optimum dengan aktivitas enzim sebesar $4,3661 \times 10^{-3}$ U/mL. Selanjutnya aktivitas enzim ini mengalami penurunan pada pH 6,5; 7,0; 7,5 dan 8,0 dengan aktivitas berturut-turut; $2,2450 \times 10^{-3}$ U/mL; $2,2706 \times 10^{-3}$ U/mL; $2,5484 \times 10^{-3}$ U/mL dan $2,0641 \times 10^{-3}$ U/mL. Hal ini sama dengan penelitian dilakukan Anja Meryandini (2009) bahwa kisaran pH untuk selulase dari *Bacillus subtilis* dengan substrat CMC cenderung optimum pada pH asam yaitu pada rentang 4 – 6,5.

Pada kondisi pH optimum dibutuhkan oleh enzim untuk mengaktifkan seluruh enzim yang mengikat substrat dan mengubahnya menjadi produk. Pada umumnya enzim hanya aktif pada kisaran pH yang terbatas. Enzim memiliki sisi aktif dengan gugus-gugus tertentu yang berperan sebagai katalis dalam pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Perubahan pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim melalui perubahan struktur atau muatan residu asam amino yang berfungsi dalam pengikatan substrat. pH yang bervariasi juga dapat menyebabkan perubahan konformasi enzim. Hal ini terjadi karena gugus bermuatan ($-\text{NH}_3^+$ atau $-\text{COO}^-$) yang jauh dari daerah terikatnya substrat yang diperlukan untuk mempertahankan struktur tersier mengalami perubahan muatan pada pH yang berbeda. Hal ini akan menyebabkan terganggunya ikatan ionik dan terputusnya folding maksimum enzim sehingga konformasi enzim berubah. Aktivitas enzim akan optimum kalau terdapat keseimbangan antara kedua muatannya. Pada kondisi optimum enzim dapat mengikat dan mengolah substrat dengan kecepatan yang tinggi dan mengalami penurunan karena enzim pada dasarnya bersifat amfifolik yaitu mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam (H^+) dan gugus basa (OH^-) terutama pada gugus terminal aminonya. Pada keadaan asam muatannya cenderung positif dan pada keadaan basa muatannya cenderung negatif sehingga aktivitas enzimnya menjadi berkurang (menurun) atau bahkan menjadi tidak aktif.

Penentuan Suhu Optimum pada Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri *Bacillus subtilis*

Pada penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara menyediakan 6 tabung reaksi yang berbeda-beda, mengisi masing-masing tabung dengan larutan 1 mL CMC 1 %, ditambahkan sebanyak 1 mL larutan buffer pH 6 (pH optimum) dan ditambahkan lagi 1 mL ekstrak kasar enzim selulase kemudian diinkubasi pada suhu yang berbeda yaitu; 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C selama 1 jam agar substrat dapat dihidrolisi oleh enzim. Selanjutnya perlakuan yang sama dilakukan seperti pada penentuan pH (penentuan gula reduksi metode *Nelson-Somogy*). Aktivitas mula-mula akan meningkat dengan makin tingginya suhu, namun pada suatu titik tertentu akan terjadi inaktivasi enzim yang akan ditandai dengan menurunnya aktivitas enzim. Hal ini terjadi karena suhu yang terlalu tinggi dapat mempercepat denaturasi enzim.



Gambar 6. Grafik hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim

Berdasarkan grafik di atas yang merupakan hasil dari pengujian aktivitas enzim diperoleh data pada variasi suhu, yaitu; 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C dengan peningkatan aktivitas enzim dimulai pada suhu 25°C dengan aktivitas enzim sebesar $3,4629 \times 10^{-3}$ U/mL dan naik mencapai suhu 30°C sebagai suhu optimum dengan aktivitas $5,6609 \times 10^{-3}$ U/mL, ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Saraswati Bail (2012), yaitu suhu optimum enzim selulase diperoleh pada 30°C dengan aktivitas sebesar 32,48 U/mL. Selanjutnya aktivitas enzim mengalami penurunan di atas suhu optimum, yaitu 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C dengan aktivitas berturut-turut sebesar; $4,1011 \times 10^{-3}$ U/mL; $3,1082 \times 10^{-3}$ U/mL; $3,9647 \times 10^{-3}$ U/mL dan $3,2735 \times 10^{-3}$ U/mL.

Peningkatan suhu menyebabkan aktivitas ekstrak kasar enzim meningkat disebabkan oleh suhu yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dengan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk makin banyak. Pada suhu optimum tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat. Peningkatan suhu lebih lanjut akan menurunkan aktivitas ekstrak kasar enzim. Hal ini disebabkan karena enzim mengalami denaturasi. Enzim mengalami perubahan konformasi pada suhu yang terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim.

4. PENUTUP

Kesimpulan

Enzim Selulase yang diproduksi dari bakteri *Bacillus subtilis* diperoleh aktivitas enzim pada pH optimum 6,0 sebesar $4,3661 \times 10^{-3}$ U/mL dan Aktivitas enzim selulase pada suhu optimum 30°C sebesar $5,6609 \times 10^{-3}$ U/mL.

Saran

Penelitian berikutnya dapat dilakukan pemurnian enzim dan dapat dikembangkan dalam bidang farmasi yaitu pemanfaatan enzim selulase untuk pembuatan obat-obatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhdiya, A., 2003, Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil, *Buletin Plasma Nutfah*, 9 (2).
- Gunam, B. W., dkk, 2011, Produksi Selulase Kasar dari Kapang *Trichoderma Viride* dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi, *Jurnal Biologi XV (2) : 29 – 33*. Mataram: Universitas undayana.
- Dali, S., dkk., 2009, Karakterisasi Enzim Amilase dari Isolat Bakteri Termofilik *Bacillus subtilis*, *Jurnal Kimia*. Makassar: Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.
- Putra, S. R dan Kosim, M., 2010, Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis*, *Skripsi*. Surabaya: FMIPA ITS Surabaya Jurusan Kimia.
- Sakti, P. C., 2012, Optimasi Produksi Enzim Selulase dari *Bacillus* sp. BPPT CC RK2 dengan Variasi pH dan Suhu Menggunakan Response Surface Methodology, *Skripsi*. Depok: Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Sianturi, C. D., 2008, Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Termofil Kasar dari Sumber Air Panas Penen Sibirubiru Sumatera Utara, Tesis, Medan: Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara.