

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

daerah kristal dari selulosa dengan membebaskan dua unit glukosa. Kerja sama kedua enzim ini menghasilkan unit-unit sakarida yang lebih kecil yang selanjutnya dihidrolisis oleh β -glukosidase menghasilkan glukosa.

Represi katabolit

Represi katabolit adalah kemampuan intermediet di dalam rangkaian reaksi katabolik yang dikatalisis enzim untuk merepresi sintesis enzim katabolik. Efek ini pertama-tama terlihat pada *E. coli* yang sedang tumbuh pada media bersumber karbon bukan glukosa. Penambahan glukosa merepresi sintesis enzim yang berhubungan dengan katabolisme sumber karbon tersebut. Fenomena ini mula-mula dinamakan sebagai efek glukosa. Istilah represi katabolit digunakan karena nutrien nonglukosa yang dapat dioksidasi juga menghasilkan efek

serupa. (Murray *et al.* 2004).

Represi katabolit berlangsung dengan perantaraan cAMP. cAMP bekerja melalui suatu reseptor protein (CRP). CRP merupakan protein dimer yang memiliki dua subunit identik yang masing-masing mampu mengikat satu molekul cAMP. CRP memiliki dua domain yang berbeda. Bagian ujung N mengikat cAMP dan bagian ujung C terikat pada DNA. Adanya cAMP menyebabkan CRP melakukan perubahan konfigurasi alosterik yang menyebabkan terbentuknya ikatan dengan bagian DNA yang spesifik dekat dengan daerah promotor operon yang bergantung cAMP. Ikatan ini memungkinkan RNA polimerase untuk terikat dan memulai transkripsi pada daerah sekitar 30 sampai 50 nukleotida dari daerah pengikatan CRP. Substrat yang mampu dimetabolisme seperti glukosa secara cepat meningkatkan konsentrasi ATP dan menurunkan cAMP sehingga merepresi operon yang bergantung pada cAMP (Fennington *et al.* 1984).

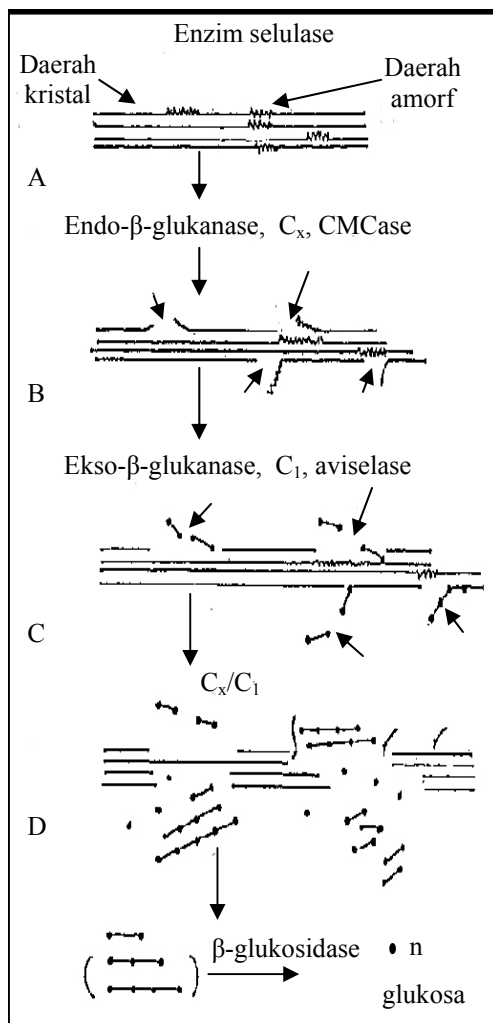
Selulase merupakan enzim induktif yang biosintesisnya dipengaruhi oleh induser dan represor. Selulosa, selobiosa, saforos dan laktosa merupakan induser selulase, sedangkan glukosa dan gliserol dikenal sebagai represor yang efektif. Hal ini sejalan dengan pernyataan Gong dan Tsao (1979) yang menyatakan bahwa berlebihnya gula terlarut di dalam pertumbuhan sel dapat menekan produksi enzim.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian yaitu autopipet 250-1000 μ l dan 40-200 μ l, sentrifus berpendingin Beckman GS-ISR, sentrifus Clements model B-Universal, spektrofotometer UV-Vis, neraca analitik, penangas air, inkubator bergoyang, *magnetic stirrer*, autoklaf, *Willey Mill*, oven, tanur, dan lemari pendingin.

Bahan-bahan yang dipakai yaitu kapang *Penicillium nalgiovense* SS240 dan *Eupenicillium javanicum* BS4 koleksi Balai Penelitian Ternak, *Potato Dextrose Agar* (PDA), *yeast extract*, bacto pepton, NaOH 0.5%, medium Mandels, tandan sawit, polard gandum, Natrium azida 20%, *Comassie Brilliant Blue* (CBB), *Bovine Serum Albumin* (BSA), asam dinitrosalisilat (DNS), bufer sitrat, glukosa, kertas saring Whatman no.1, p-nitrofenil-glukosida (p-NPC) dan p-nitrofenol.



Gambar 1 Skema tahap-tahap pemecahan selulosa

Metode

Perlakuan Substrat

Tandan sawit yang berasal dari perkebunan kelapa sawit Bengkulu dan polard digunakan sebagai substrat kapang *P. nalgiovense* SS240 dan *E. javanicum* BS4. Sebelum digunakan sebagai substrat, tandan diprelakukan terlebih dahulu yaitu dengan penggilingan tanpa pencucian NaOH yang digunakan sebagai kontrol dan penggilingan disertai pencucian dengan NaOH. Sedangkan polard diprelakukan dengan NaOH.

Tandan sawit sebelum digiling, digunting kecil-kecil terlebih dahulu kemudian tandan beserta polard digiling dengan *Willey Mill*. Metode perlakuan substrat dengan NaOH mengikuti metode Purwadaria (1988). Sebanyak 25 g tandan dan polard masing-masing dimasukkan ke dalam larutan NaOH 0.5% (w/v) selama 1 jam pada suhu 100° C. Setelah itu tandan dan polard disaring dan dicuci secara terus menerus hingga cairan hasil perasan memiliki pH netral yang diuji dengan kertas indikator universal. Tandan dan polard kemudian disimpan dalam oven suhu 40° C selama 2 hari. Tandan dan polard yang telah kering digiling kembali dengan *Willey Mill*.

Produksi Enzim

Kapang *P. nalgiovense* SS240 dan *E. javanicum* BS4 ditanam dalam PDA miring hingga berspora merata selama 4 hari. Suspensi spora dibuat dengan menambahkan 2 ml larutan NaCl 0.9% ke dalam tabung PDA kemudian suspensi dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml medium Mandels, yeast extract 0.30% dan pepton 0.075%. Terdapat 3 jenis substrat yang digunakan untuk pertumbuhan kapang yaitu tandan sawit dengan perlakuan NaOH (Tn); tandan sawit tanpa perlakuan NaOH (To); polard dengan perlakuan NaOH (Pn). Substrat Tn dan To digunakan untuk pertumbuhan *E. javanicum* BS4 (E) dan *P. nalgiovense* SS240 (P). Sedangkan Pn digunakan sebagai substrat bagi *P. nalgiovense* SS240. Setiap substrat dimasukkan ke dalam Erlenmeyer sebanyak 3% dan diinokulasi. Setelah inokulasi selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C dalam inkubator bergoyang dengan kecepatan 150 rpm. Waktu inkubasi dipilih selama 4 dan 5 hari. Setelah waktu inkubasi selesai, ditambahkan natrium azida sebanyak 0.2% dari volume akhir medium. Kultur media disentrifugasi pada 7000 rpm pada suhu 4° C selama 20 menit. Supernatan diambil kemudian disimpan dalam freezer.

Optimasi Produksi Selulase

Optimasi produksi selulase dilakukan melalui tiga tahap percobaan. Tahapan pertama dari penelitian ini adalah membandingkan aktivitas sakarifikasi selulase dari lima jenis perlakuan yaitu *E. javanicum* BS4 yang ditumbuhkan pada tandan sawit tanpa perlakuan NaOH (ETo), *E. javanicum* BS4 yang ditumbuhkan pada tandan sawit dengan perlakuan NaOH (ETn), *P. nalgiovense* SS240 yang ditumbuhkan pada tandan sawit tanpa perlakuan NaOH (PTo), *P. nalgiovense* SS240 yang ditumbuhkan pada tandan sawit dengan perlakuan NaOH (PTn) dan *P. nalgiovense* SS240 yang ditumbuhkan pada polard dengan perlakuan NaOH (PPn). Perlakuan terbaik untuk *E. javanicum* BS4 dan *P. nalgiovense* SS240 digunakan untuk tahapan selanjutnya.

Tahapan kedua dari penelitian ini adalah optimasi produksi selulase dengan merubah sumber nitrogen pada media Mandels. Sumber nitrogen yang digunakan adalah amonium sulfat + urea sebagai media standar dan natrium nitrat. Masing-masing sumber nitrogen dipakai dalam medium pertumbuhan pada kapang *E. javanicum* BS4 dan *P. nalgiovense* SS240. Perlakuan yang menghasilkan aktivitas sakarifikasi dipilih untuk tahapan ketiga. Tahap ketiga adalah dengan mengubah konsentrasi nitrogen dalam Mandels. Dalam medium Mandels, konsentrasi nitrogen dibuat setengah dan dua kali lipat dibandingkan konsentrasi awal. Enzim yang diamati pada tahapan ketiga ini adalah CMCCase, β -glukosidase dan sakarifikasi.

Analisis Aktivitas CMCCase

Aktivitas CMCCase ditentukan berdasarkan metode Hagggett *et al.* (1979). Ekstrak enzim dengan pengenceran yang tepat, bufer sitrat 0.05M, dan substrat (CMC 1% dalam larutan bufer pH 5.0 dan 1.0 ml NaN₃ 20%) masing-masing diprainskubasi lebih dahulu selama lima menit pada suhu 50° C. Enzim sebanyak 0.5 ml dicampur dengan bufer sitrat 0.5 ml lalu ditambah substrat 0.5 ml dan divorteks. Campuran kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50° C. DNS sebanyak 1.5 ml ditambahkan untuk menghentikan aktivitas enzim lalu dipanaskan dalam penangas air 100° C selama 15 menit dan divorteks. Kontrol dibuat dengan mencampurkan terlebih dahulu DNS dengan bufer sitrat dan substrat kemudian enzim ditambahkan. Blanko dibuat dengan mencampurkan 0.5 ml akuades dengan 1.0 ml bufer dan 1.5 ml DNS. Kontrol

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

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

dan blanko tidak diinkubasi terlebih dahulu namun langsung dipanaskan dalam penangas air 100° C selama 15 menit. Intensitas warna diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm dan dibandingkan dengan kurva standar glukosa. Larutan standar glukosa dibuat pada kisaran 0-750 µg/ml. Larutan standar glukosa sebanyak 0.5 ml, ditambah dengan bufer 0.5 ml, 0.5 substrat dan 1.5 ml DNS dipanaskan dalam penangas air 100° C selama 15 menit.

Satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya enzim yang dapat memproduksi 1 µmol glukosa per menit pada kondisi percobaan dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas CMCCase (U/ml)} = \frac{[\text{gula sampel}] - [\text{gula kontrol}] \times \text{fp}}{\text{Waktu inkubasi (menit)} \times \text{BM glukosa}}$$

fp = faktor pengenceran enzim
1 U = µmol gula produk/menit

β-Glukosidase

Aktivitas β-glukosidase ditentukan berdasarkan metode Nurbayti (2002). Substrat yang digunakan adalah p-NPG 0.1% (b/v). Ekstrak enzim, larutan bufer sitrat pH 5.0 dan substrat diprainskubasi selama 10 menit pada suhu 50° C. Setelah itu ekstrak enzim dengan pengenceran yang tepat sebanyak 0.5 ml dicampurkan dengan 0.5 ml bufer sitrat dan 0.5 ml substrat. Larutan kemudian diinkubasi pada suhu 50° C selama 60 menit. Setelah waktu inkubasi selesai, ditambahkan larutan Na₂CO₃ 1M sebanyak 1.0 ml lalu divorteks dan diukur intensitas cahaya pada panjang gelombang 400 nm. Kontrol dibuat dengan komposisi yang sama namun enzim dicampur setelah penambahan larutan Na₂CO₃ 1M sebanyak 1.0 ml. Sebagai blanko digunakan 1 ml akuades, larutan bufer 0.5 ml dan 1 ml Na₂CO₃. Larutan standar dibuat dengan menggunakan larutan p-nitrofenol sebagai larutan standar. Kisaran konsentrasi standar adalah 0-30 µg/ml.

Satu unit (U) aktivitas enzim β-glukosidase adalah banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 µmol nitrofenol dalam 1 menit pada kondisi percobaan, dengan perhitungan sebagai berikut

$$\text{Aktivitas } \beta\text{-glukosidase (U/ml)} = \frac{[\text{nitrofenol sampel-kontrol}] \times \text{fp}}{\text{Waktu inkubasi} \times \text{BM nitrofenol}}$$

fp = faktor pengenceran enzim
1 U = µmol nitrofenol/menit

Penentuan Aktivitas Sakarifikasi

Sebanyak 2 ml ekstrak enzim dimasukkan ke dalam tabung McCartney, dicampur

dengan 2 ml substrat dedak kemudian diinkubasi dalam inkubator bergoyang pada kecepatan 120 rpm pada suhu 42° C dengan waktu inkubasi 2 jam. Aktivitas enzim dihentikan dengan memasukkan tabung dalam air mendidih selama 10 menit. Kadar gula pereduksi diukur dengan metode DNS dengan mencampurkan 0.5 ml filtrat, 0.5 ml akuades dan 1.5 ml DNS.

$$\text{Aktivitas sakarifikasi (}\mu\text{mol/ml)} = \frac{[\text{glukosa sampel} - \text{kontrol}] \times \text{fp} \times 2}{\text{BM glukosa}}$$

fp = faktor pengenceran enzim

Analisis Kadar Protein

Analisis kadar protein dilakukan untuk mengetahui aktivitas spesifik selulase. Metode yang digunakan adalah metode Bradford (1976), yaitu berdasarkan pengikatan zat warna CBB dengan protein. Sebanyak 0.2 ml ekstrak enzim ditambah 5 ml pereaksi CBB divorteks lalu diukur intensitas cahayanya pada panjang gelombang 595 nm setelah 10 menit. Standar dibuat dari larutan BSA sebanyak 0.2 ml dengan deret konsentrasi antara 0-800 µg/ml.

Aktivitas spesifik enzim diketahui dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg)} = \frac{1000 \times \text{aktivitas enzim (U/ml)}}{\text{Kadar protein (}\mu\text{g/ml)}}$$

Rancangan Penelitian

Uji statistika digunakan untuk mengetahui pengaruh dari suatu perlakuan. Penelitian tahap pertama menggunakan lima perlakuan yang berbeda yaitu *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit dengan perlakuan NaOH (ETn), *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan (ETo), *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan sawit perlakuan NaOH (PTn), *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan (PTo) dan *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat polard (PPn). Perlakuan-perlakuan ini diuji dengan metode kontras ortogonal. Penelitian tahap dua diuji dengan metode Rancangan Acak Lengkap dua faktorial. Faktor pertama adalah jenis kapang yang terdiri dari *E. javanicum* BS4 dan *P. nalgiovense* SS240 sedangkan faktor kedua adalah sumber nitrogen yaitu amonium sulfat + urea dengan Natrium nitrat. Tahap ketiga penelitian ini diuji dengan Rancangan Acak Lengkap yaitu faktor konsentrasi nitrogen dalam media. Perlakuan yang menghasilkan perbedaan nyata ($P < 0.05$) diuji lanjutan dengan uji Duncan dengan beda 0.05.