

TESIS

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM SELULASE DARI
KERANG KEPAH *Atactodea striata* MENGGUNAKAN
SUBSTRAT SELULOSA KERTAS**

***ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASE FROM
MUSSEL SHELLS *Atactodea striata* USING SUBSTRATES OF
PAPER CELLULOSE***

WIDIASTINI ARIFUDDIN

P1100211005



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM SELULASE DARI
KERANG KEPAH *Atactodea striata* MENGGUNAKAN
SUBSTRAT SELULOSA KERTAS**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Magister

Program Studi

Kimia

Disusun dan diajukan oleh

WIDIASTINI ARIFUDDIN

Kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Widiastini Arifuddin

No. Mahasiswa : P1100211009

Program studi : Kimia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 7 November 2013

Yang menyatakan,

Widiastini Arifuddin

PRAKATA

Syukur alhamdulillah senantiasa penulis ucapkan ke Hadirat Allah Subhanahu Wata'ala sebagai ungkapan rasa syukur atas berkat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini merupakan salah satu persyaratan akademis guna memperoleh gelar Magister pada Jurusan Kimia, Program Pascasarjana, Universitas Hasanuddin Makassar. Tesis ini merupakan laporan penelitian dengan judul **Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase dari Kerang Kepah *Atactodea striata* menggunakan Substrat Selulosa Kertas**

Penulisan tesis ini mengalami banyak hambatan, namun berkat bantuan dan bimbingan yang tulus dari berbagai pihak, semua dapat teratasi dengan baik. Penulis menyadari, tesis ini jauh dari kesempurnaan, dan tentu memiliki banyak kekurangan. Oleh karena itu, dengan penuh kerendahan hati penulis menyampaikan terima kasih kepada semua yang telah membantu dalam penyusunan tesis ini, terutama kepada Bapak Prof. Dr. H. Abd. Rauf Patong sebagai ketua komisi penasehat dan Ibu Dr. Hj. Seniwati Dali, M.Si sebagai anggota komisi penasehat atas segala bantuan, bimbingan, dan arahan yang tulus ikhlas dan kemurahan hati membantu penulis dalam penyelesaian tesis ini.

Demikian pula ucapan terima kasih dan penghargaan disampaikan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. dr. Idrus Paturusi, Sp.B, Sp.BO. sebagai Rektor Universitas Hasanuddin.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Mursalim sebagai Direktur PPS-UNHAS, Makassar.
3. Bapak Prof. Dr. Hanafi Utsman, M.Sc sebagai Dekan FMIPA-UNHAS, Makassar.
4. Ibu Dr. Paulina Taba, M.Phil sebagai Ketua Program Studi Magister Kimia PPS-UNHAS, Makassar.
5. Bapak Prof. Dr. Tjodi Harlim, Bapak Prof. Dr. Alfian Noor dan Ibu Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, M.Si sebagai anggota tim penguji seminar usul, seminar hasil serta ujian tesis.
6. Bapak dan Ibu dosen Program Studi Kimia PPS-UNHAS Makassar.
7. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah memberi kesempatan untuk memperoleh beasiswa studi dan penelitian.
8. Seluruh rekan mahasiswa angkatan 2011 Program Magister Kimia: Abdur rahman Arif, Zulfian Armah, Muh. Yasser, Irham Pratama, Hasty Hamzah, Ischaidar, Sukarti, Santi, Desy Kartina Mery Arafah, Loth Botahala, Oktapianus Pattaru yang telah berbagi suka dan duka selama mengikuti perkuliahan.
9. Seluruh rekan mahasiswa angkatan 2010 dan 2012 Program Magister Kimia, khususnya saudara Fatur Rahman Ma'rifatullah atas bantuan dan kerja samanya.
10. Analis Laboratorium Biokimia ibu Mahdalia, S.Si yang telah banyak memberi arahan pelaksanaan penelitian. Demikian pula kepada Ibu

Andi Asfiana Amin (bagian administrasi Pascasarjana FMIPA UNHAS) atas segala bantuan dalam penyelesaian administrasi perkuliahan maupun tesis.

Terkhusus kepada rekan sepenelitian “selulase” Hasty Hamzah, juga Tim “Kitinase” Abdur rahman Arif dan Ischaidar, terima kasih atas bantuan, kerja sama dan segala kebersamaannya menjalani penelitian di laboratorium.

Secara khusus, penulis menyampaikan penghargaan dan terima kasih yang tak terhingga kepada keluarga, ayahanda Arifuddin, S.Pd, dan ibunda Hasniati, S.Pd serta saudara-saudariku, Asti Arifuddin, S.Pd dan Muh. Syafri, S.Pdi yang selalu mendidik, memberikan motivasi dan mendoakan penulis. Semoga doa, bantuan, dan motivasi yang diberikan kepada penulis mendapat imbalan dari Allah Subhanahu Wata’ala.

Penulis menyadari bahwa meskipun tesis ini telah dibuat dengan usaha yang maksimal, tidak menutup kemungkinan masih terdapat kekurangan-kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran untuk penyempurnaan tesis ini senantiasa penulis harapkan. Penulis mengharapkan tesis ini dapat memberikan manfaat, khususnya bagi penulis dan terlebih bagi pembaca. Amin.

Makassar, November 2013

Penulis,

Widiastini Arifuddin

ABSTRAK

Widiastini Arifuddin 2013. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase dari Kerang Kepah *Atactodea Striata* Menggunakan Substrat Selulosa Kertas (Dibimbing oleh: Abd. Rauf Patong dan Seniwati Dali)

Enzim selulase merupakan enzim yang termasuk dalam kelompok enzim hidrolitik yang mampu mengkatalisis reaksi hidrolisis selulosa menghasilkan oligosakarida yang akhirnya diubah menjadi monomer glukosa. Enzim ini dapat diperoleh dari hewan invertebrata, salah satunya dari kelompok moluska yakni kerang kepah (*Atactodea striata*). Berdasarkan fungsi dari enzim selulase yang dapat mengubah selulosa menjadi glukosa, salah satu sumber selulosa yang dapat digunakan sebagai substrat yaitu kertas koran bekas.

Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengkarakterisasi enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*). Tahapan isolasi dimulai dengan homogenasi menggunakan NaCl 1%, fraksinasi dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 70% dan dialisis menggunakan membran selofan. Hasil karakterisasi meliputi: konsentrasi substrat optimum 2%, suhu optimum 40 °C, pH optimum 5,4 dan konsentrasi enzim optimum 12 mg/mL. Nilai K_M dan V_{maks} enzim selulase ini sebesar 1,192% (b/v) dan 1,12 $\mu\text{mol/mL/menit}$. Selain itu, aktivitas enzim selulase meningkat dengan adanya ion Co^{2+} 1 mM (aktivator) dan menurun dengan adanya ion Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+} 1 mM (inhibitor). Pada kondisi optimum, aktivitas spesifik enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*) dalam menghidrolisis selulosa yang terkandung dalam kertas koran bekas menjadi glukosa sebesar $1,62 \times 10^{-4}$ U/mg.

Kata kunci: enzim selulase, kerang kepah, kertas koran, aktivitas spesifik.

ABSTRACT

Widiastini Arifuddin 2013. Isolation and Characterization of Cellulase from mussel shells *Atactodea striata* Using Substrates of Cellulose Paper (Supervised by: Abd. Rauf Patong and Seniwati Dali).

Cellulase enzyme is an enzyme that belongs to a group of hydrolytic enzymes capable of hydrolyzing cellulose to break the bonds of $\beta(1,4)$ -glycoside produce oligosaccharides that is eventually converted into glucose monomers. This enzyme can be obtained from invertebrate such as mussel shells (*Atactodea striata*), a kind of molluscs. Based on the function of the enzyme cellulase which can convert cellulose into glucose, a source of cellulose that can be used as a substrate, namely waste newspaper.

This study aimed to isolate and characterize the cellulase enzyme from mussel shells (*Atactodea striata*). Isolating phases starting with homogenasi using 1% NaCl, fractionation with ammonium sulfate at 70% saturation level and dialysis using cellophane membranes. Characterization results include: optimum substrate concentration of 2%, the optimum temperature of 40 °C, optimum pH 5.4 and optimum enzyme concentration of 12 mg/mL. K_M and V_{max} values of cellulase is at 1.192% (b/v) and 1.12 $\mu\text{mol/mL/min}$. In addition, the cellulase activity increased in the presence of 1 mM Co^{2+} (activator) and decreased in the presence of 1 mM Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} (inhibitor). At the optimum conditions, the specific activity of the cellulase from mussel shells (*Atactodea striata*) in hydrolyzing cellulose contained in old newspapers into glucose of 1.62×10^{-4} U/mg.

Keywords: cellulase, mussel shells, newspaper, the specific activity

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	iii
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xvi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
D. Kegunaan Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
A. Tinjauan Tentang Kerang Kepah	7
B. Tinjauan Tentang Selulosa	9
C. Tinjauan Tentang Enzim	10
D. Tinjauan Tentang Enzim Selulase (EC.3.2.1)	18

E. Kinetika Enzim	22
F. Tinjauan Tentang Ekstraksi Enzim	23
G. Tinjauan Tentang Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim	27
H. Tinjauan Tentang Kertas.....	30
I. Kerangka Konseptual.....	32
J. Hipotesis	33
BAB III. METODE PENELITIAN	35
A. Waktu dan Tempat Penelitian	35
B. Alat dan bahan	35
C. Pelaksanaan penelitian	36
BAB IV. HASIL PENELITIAN	46
A. Preparasi kertas koran sebagai substrat	46
B. Produksi Enzim Selulase dari Kerang Kepah	47
C. Pemurnian Enzim Selulase	47
D. Karakterisasi Enzim Selulase	50
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	61
A. Kesimpulan	61
B. Saran	62
DAFTAR PUSTAKA.....	63
LAMPIRAN	68

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Komposisi kimia serbuk kering kerang kepah (<i>Atactodea striata</i>)	9
2. Komposisi kimia koran berdasarkan bahan kering (%)	32
3. Tingkat kemurnian enzim selulase dari kerang kepah fraksi amonium sulfat dan hasil dialisis.....	50
4. Data hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi untuk menentukan transformasi Lineweaver-Burk	59

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Morfologi dan anatomi kerang kepah (<i>Atactodea striata</i>).....	7
2.	Struktur selulosa	10
3.	Cara kerja enzim	13
4.	Pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim	14
5.	Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi	15
6.	Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim	15
7.	Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim	16
8.	Hubungan antara [S] dengan V.....	17
9.	Mekanisme hidrolisis selulosa	19
10.	Struktur enzim selulase, (a) struktur enzim selulase dalam bentuk 3D,(b) beberapa residu asam amino penyusun enzim selulase	20
11.	Mekanisme hidrolisis selulosa menjadi glukosa	21
12.	Hubungan antara laju reaksi enzim dan konsentrasi substrat menurut persamaan Michaelis-Menten.....	23
13.	Proses dialisis.....	27
14.	Kerangka konseptual.....	34
15.	Reaksi penyabunan.....	47
16.	Pengaruh tingkat kejenuhan amonium sulfat terhadap aktivitas enzim selulase dari kerang kepah.....	48
17.	Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim selulase dari kerang kepah pada kondisi: [enzim] = 8 mg/mL,	

pH 5,6 dan suhu 35 °C	51
18. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim selulase dari Kerang kepah pada kondisi: [substrat] = 2%, [enzim] = 8 mg/mL, dan pH 5,6	52
19. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim selulase dari kerang kepah pada kondisi: [substrat] = 2 %, [enzim] = 8 mg/mL, dan suhu 40 °C	54
20. Pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim selulase dari kerang kepah pada kondisi: [substrat] = 2 %, suhu 40 °C, pH 5,4	55
21. Pengaruh logam terhadap aktivitas enzim selulase dari Kerang kepah pada kondisi: [substrat] = 2 %, [enzim] = 8 mg/mL, suhu 40 °C, dan pH 5,4	57
22. Kurva Lineweaver-Burk enzim selulase pada berbagai konsentrasi substrat	59

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Gambaran umum prosedur penelitian	68
2. Isolasi enzim selulase dari kerang kepah (<i>Atactodea striata</i>)	69
3. Uji aktivitas enzim, dialisis, dan penentuan kadar protein	70
4. Karakterisasi enzim selulase	72
5. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum untuk penentuan kurva standar dan kadar glukosa	75
6. Hasil pengukuran kurva standar glukosa	76
7. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum untuk penentuan kurva standar dan kadar protein	77
8. Hasil pengukuran kurva standar protein	78
9. Pembuatan larutan buffer sitrat fosfat	79
10. Contoh perhitungan penentuan aktivitas enzim	80
11. Contoh perhitungan penentuan kadar protein dan aktivitas spesifik	81
12. Data aktivitas enzim setiap fraksi	82
13. Data penentuan konsentrasi substrat optimum	83
14. Data penentuan pH optimum	84
15. Data penentuan suhu optimum	85
16. Data penentuan pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim	86
17. Data penentuan pengaruh logam terhadap aktivitas enzim	87

18. Data Aktivitas Spesifik Enzim Selulase pada Kondisi Optimum ..	88
19. Tabel penambahan garam amonium sulfat untuk persentase kejenuhan pada 0 °C	89
20. Foto penelitian	90

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
EC	<i>enzim commission</i> , kode enzim
[E]	konsentrasi enzim
K_M	Tetapan Michaelis-Menten
pH	derajat keasaman
ppm	<i>part per milion</i> , bagian perjuta
rpm	rotasi per menit, kecepatan putar per menit
[S]	konsentrasi substrat
U	Unit, aktivitas enzim
V_{maks}	kecepatan maksimum
μmol	mikromol

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Dewasa ini perkembangan bioteknologi sangat pesat dan menunjukkan hasil yang cukup menarik perhatian. Salah satu produk bioteknologi yang banyak dimanfaatkan adalah molekul enzim. Enzim merupakan senyawa berstruktur protein yang dapat berfungsi sebagai biokatalisator dalam setiap reaksi biokimiawi yaitu, mulai konversi energi, metabolisme makanan, mekanisme pertahanan sel, komunikasi antar sel hingga ke konversi sifat-sifat keturunan (Suhartono, 1989). Enzim dapat diperoleh dari sel-sel hidup dan dapat bekerja baik untuk reaksi-reaksi yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel. Pemanfaatan enzim untuk reaksi-reaksi yang terjadi di luar sel sekarang banyak diaplikasikan dalam dunia industri, baik industri pangan maupun nonpangan. Pemanfaatan enzim dapat dilakukan secara langsung menggunakan enzim hasil isolasi maupun dengan cara pemanfaatan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim yang diinginkan.

Enzim selulase merupakan salah satu contoh enzim yang termasuk dalam kelompok enzim hidrolitik yang mampu mengkatalisis reaksi hidrolisis selulosa dengan memutuskan ikatan $\beta(1,4)$ -glikosida menghasilkan oligosakarida yang akhirnya diubah menjadi monomer glukosa. Hidrolisis enzimatik yang sempurna dari enzim selulase memerlukan aksi sinergis dari tiga tipe enzim ini, yaitu endoglukanase (EC

3.2.1.4), eksoglukanase (EC 3.2.1.91) and glukosidase (EC 3.2.1.21) (Niranjane, 2004).

Enzim selulase ini tersebar luas di alam, tidak hanya pada jamur, bakteri, tanaman, dan protista (Moriya *et al.*, 2001) menghasilkan selulase, tetapi juga berbagai hewan invertebrata. Beberapa contoh hewan invertebrata yang dapat menghasilkan enzim selulase yaitu serangga (Sugimura *et al.*, 2003), nematoda (Kikuchi *et al.*, 2005), dan moluska (Guo *et al.*, 2008). Enzim selulase dari hewan invertebrata merupakan produk dari simbiosis mikroorganisme di dalam usus dan sebagian juga merupakan produk langsung dari hewan itu sendiri yang terdapat pada hepatopankreas (Elyakova *et al.*, 1968 dalam Watanabe *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003).

Kerang kepah (*Atactodea striata*) merupakan salah satu jenis kerang-kerangan yang termasuk dalam kelompok moluska. Kerang ini hidup di pasir putih yang terdapat di pantai. Kandungan senyawa metabolit primer kerang kepah yaitu protein 56,08 %, lemak 5,95 %, dan karbohidrat 21 % (Waranmaselebun, 2007). Kerang kepah termasuk dalam organisme *filter-feeding* yang memanfaatkan bakteri dan fitoplankton untuk makanannya sehingga di dalam sistem pencernaannya terdapat enzim selulase untuk menghasilkan gula dari fitoplankton tersebut (Sona, 2004). Hal ini yang mendasari bahwa enzim selulase dapat diisolasi dari kerang kepah (*Atactodea striata*). Proses isolasi enzim

selulase dari hewan dilakukan melalui tahap dekstruksi sel, homogenasi dan sentrifugasi (Maisaroh, 2009).

Berdasarkan fungsi dari enzim selulase tersebut diketahui bahwa enzim selulase dapat menghidrolisis bahan-bahan yang mengandung selulosa, salah satunya yaitu kertas. Pemanfaatan limbah kertas sekarang ini belum banyak dikembangkan. Banyak limbah kertas yang dibiarkan menumpuk dengan upaya pengelolaan yang minimal. Padahal besarnya jumlah limbah kertas yang ada memberikan peluang terhadap upaya pemanfaatan limbah kertas tersebut. Bahan pembuat kertas adalah komponen kayu. Sebagai gambaran, komposisi kimia kayu adalah kadar selulosa 45,72– 60,29 %, hemiselulosa 23,26–29,58 %, dan lignin 21,98– 24,54 % (Syafii dan Siregar, 2006). Tingginya kadar selulosa pada limbah kertas dapat dimanfaatkan sebagai salah satu sumber selulosa yang dengan penambahan enzim selulase akan dapat menghasilkan glukosa sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut.

Di samping untuk menanggulangi masalah pencemaran, pemanfaatan limbah kertas ditujukan untuk memperoleh bahan baku baru. Selulosa yang terdapat pada kertas merupakan bahan yang dapat diolah menjadi bahan yang bermanfaat. Degradasi selulosa menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana oleh enzim selulase akan menghasilkan oligosakarida, disakarida, dan monomer glukosa.

Glukosa yang merupakan hasil akhir dari proses hidrolisis selulosa dapat digunakan sebagai sumber nutrisi yakni sebagai bahan pangan,

makanan ternak dan sebagai sumber substrat untuk fermentasi atau bahan baku pada proses biokonversi untuk memproduksi senyawa organik lainnya seperti etanol, butanol, aseton dalam skala besar (Gadgil *et al*, 1995 dalam Kumar *et al*, 2009).

Produksi enzim selulase dari moluska khususnya dari kelas bivalvia telah dilakukan, yaitu produksi enzim selulase dari tiram *Haliotis discus hannai* (Suzuki *et al.*, 2003) dan *Mytilus edulis* (Xu, 2002). Pada penelitian yang dilakukan Suzuki *et al.* (2003) aktivitas enzim total yang diperoleh sebesar 15 Unit dan aktivitas spesifiknya sebesar 13,9 Unit.mg⁻¹ pada kondisi optimum yaitu pH 6,3 dan suhu 38 °C. Oleh karena itu, menarik untuk meneliti kerja enzim selulase dari jenis moluska khususnya kelas bivalvia yang lain yakni kerang kepah (*Atactodea striata*) terhadap substrat limbah kertas.

B. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah yang menjadi acuan dalam melakukan penelitian ini adalah:

1. Apakah kerang kepah (*Atactodea striata*) berpotensi menghasilkan enzim selulase ?
2. Apakah kondisi optimum (konsentrasi substrat, pH, suhu, konsentrasi enzim) dan ion logam dapat mempengaruhi aktivitas enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*) ?

3. Berapa nilai K_M dan v_{maks} enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*) ?
4. Berapa aktivitas spesifik enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*) pada kondisi optimum dalam menghidrolisis selulosa menjadi glukosa yang terdapat dalam limbah kertas ?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengisolasi enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*).
2. Menentukan kondisi optimum (konsentrasi substrat, pH, suhu, konsentrasi enzim) dan pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*).
3. Menentukan nilai K_M dan v_{maks} enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*).
4. Menentukan aktivitas spesifik enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*) pada kondisi optimum dalam menghidrolisis selulosa menjadi glukosa yang terdapat dalam limbah kertas.

D. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Memberikan informasi mengenai kondisi optimum enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*) dalam menghidrolisis selulosa menjadi glukosa yang terdapat dalam limbah kertas.
2. Memberikan sumbangan pemikiran bagi pengembangan bidang industri enzim pangan dan non pangan dalam usaha mengembangkan dan meningkatkan produktivitasnya.
3. Memberikan sumbangan pemikiran untuk pengolahan limbah kertas yang menjadi salah satu masalah lingkungan.

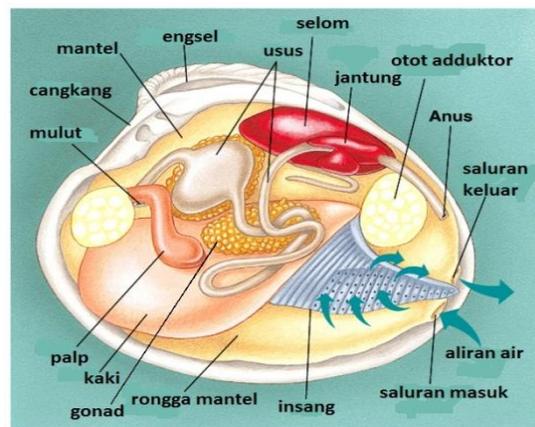
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Mengenai Kerang Kepah

Adapun klasifikasi kerang kepah (*Atactodea striata*) menurut Gmelin (1791) dalam Waranmaselembun (2007):

Kingdom : Animal
Filum : Mollusca
Kelas : Bivalvia
Sub Kelas : Heterodonta
Ordo : Veneroida
Familia : Mesodesmatidae
Genus : *Atactodea*
Spesies : *Atactodea striata*



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Gambar 1. Morfologi dan anatomi kerang kepah (*Atactodea striata*) (www.marinespecies.org)

Kerang kepah (*Atactodea striata*) merupakan salah satu jenis kerang-kerangan yang termasuk dalam kelompok moluska. Cangkang kerang *Atactodea striata* berbentuk segitiga, mempunyai garis-garis konsentris yang nyata pada permukaan engsel dan berwarna putih. Kerang ini dapat mencapai panjang 28 mm. Kerang bernafas dengan sepasang insang. Mantel insang pada *filter feeder* selain berfungsi sebagai alat pernapasan juga berfungsi sebagai alat penyaring makanan. Makanan yang terpilih akan dimasukkan ke dalam mulut, sedangkan yang tidak terpilih akan dibuang ke tepi mantel. Habitat kerang kepah adalah pasir putih yang terdapat di pantai sekeliling pulau-pulau karang. Pantai berpasir ini pada umumnya terendam air pada waktu pasang dan terkena sinar matahari pada waktu air surut di siang hari. Pada waktu panas matahari terik dan air surut, suhu pasir di pantai pulau-pulau karang ini cukup tinggi, dapat mencapai 35 °C. Inilah suatu keistimewaan kerang kepah, mereka hidup dan berkembang biak dengan baik pada habitat yang bersuhu cukup tinggi dan kekeringan selama air surut (Sunarto 2001).

Menurut Moka (1982) dalam Purbasari (2008), kerang laut *Atactodea striata* memiliki nama daerah sebagai berikut: kepah (Indonesia), tude bombang (Makasar), kasii (Bima), seasea (Mandar), baje bombang (Bugis), sedangkan di daerah Kei Maluku Tenggara dikenal dengan nama mas ngur.

Komposisi kimia kerang laut sangat bervariasi tergantung pada spesies, tingkat umur, musim, habitat dan kebiasaan makan. Nilai gizi kerang laut terutama ditentukan oleh kandungan lemak dan proteinnya. Menurut Waranmaselebun (2007), kerang kepah (*Atactodea striata*) dalam bentuk kering termasuk salah satu hasil perikanan yang berkadar lemak sedang, yaitu antara 5%-10% dan memiliki protein yang tinggi karena lebih dari 50%. Tabel 1 memperlihatkan komposisi kimia kerang kepah (*Atactodea striata*).

Tabel 1. Komposisi kimia serbuk kering kerang kepah (*Atactodea striata*)

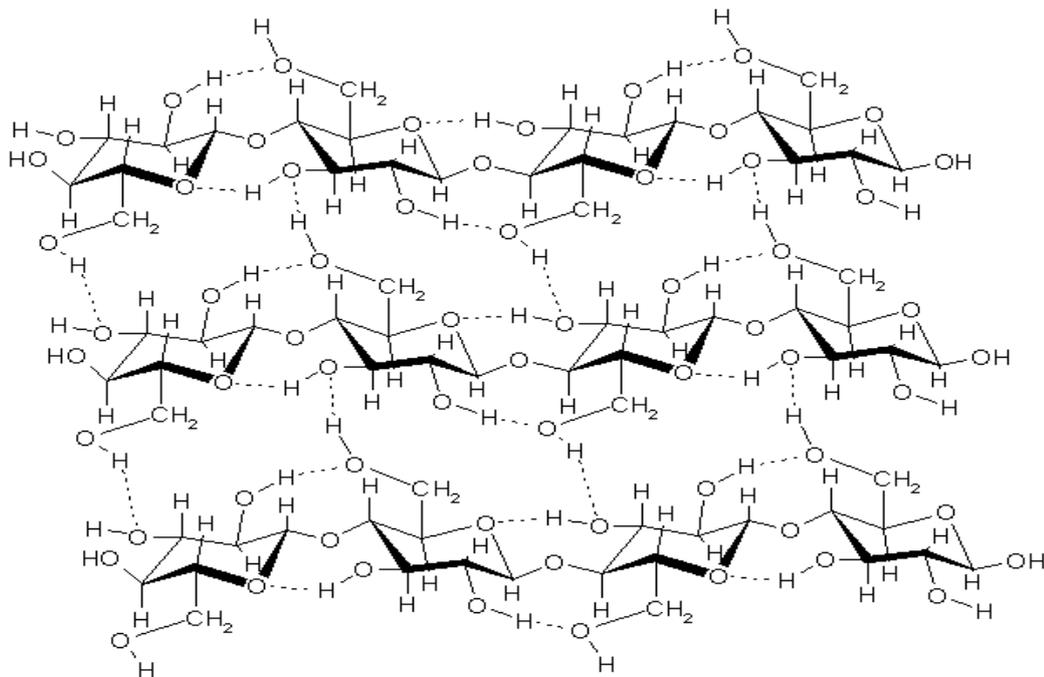
Jenis Kandungan	Jumlah (% berat kering)
Kadar air	7,84
Protein	56,08
Lemak	5,95
Abu	7,88
Serat kasar	1,25
Karbohidrat	21

Sumber: Waranmaselebun (2007)

B. Tinjauan Tentang Selulosa

Selulosa merupakan serat-serat panjang yang bersama-sama hemiselulosa, pektin dan protein membentuk struktur jaringan yang memperkuat dinding sel tanaman. Selulosa adalah polimer berantai lurus dari β -(1,4)-D-glukosa yang tidak larut dalam air (Winarno, 2004). Selulosa merupakan polisakarida yang terdiri dari D-glukosa yang dihubungkan

oleh ikatan glikosida (Jagtap dan Rao, 2005). Struktur selulosa dapat digambarkan seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur selulosa

C. Tinjauan Tentang Enzim

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Molekul enzim meningkatkan dengan nyata kecepatan reaksi kimia spesifik yang tanpa enzim akan berlangsung amat lambat. Semua enzim murni yang telah diamati sampai saat ini adalah protein dan aktivitas katalitiknya bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein.

Enzim adalah biomolekul yang berfungsi sebagai katalisi (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia. Pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim, molekul awal reaksi disebut substrat, dan enzim mengubah molekul tersebut menjadi molekul-

molekul yang berbeda, disebut produk. Hampir semua proses biologis sel memerlukan enzim agar dapat berlangsung dengan cukup cepat (Sadikin, 2002).

1. Klasifikasi enzim

Semua enzim diberi nama menurut sistem yang dirancang oleh Komisi Enzim (*Enzyme Commission, EC*) dari *International Union Of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, dan berdasarkan pada tipe reaksi yang dikatalisis enzim tersebut. Menurut Stryer *et al.*, (2002), klasifikasi enzim meliputi enam golongan, yaitu:

1. Oksido-reduktase, berperan dalam reaksi oksidasi-reduksi

Contoh: dehidrogenase

2. Transferase, berperan dalam reaksi pemindahan gugus tertentu

Contoh: enzim transaminase

3. Hidrolase, berperan dalam reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat dengan pertolongan molekul air

Contoh: selulase

4. Liase, mengkatalisis reaksi adisi atau pemecahan ikatan rangkap dua

Contoh: fumarat hidratase

5. Isomerase, mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom dalam molekul substrat, sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrat yang bersangkutan.

Contoh: glukosafosfat isomerase

6. Ligase, mengkatalisis reaksi penggabungan dua molekul disertai dengan hidrolisis ikatan berenergi tinggi.

Contoh: piruvat karboksilase

2. Mekanisme kerja enzim

Suatu enzim mempunyai kekhasan yaitu hanya bekerja pada satu reaksi saja. Untuk dapat bekerja terhadap suatu zat atau substrat harus ada hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat. Enzim mempunyai ukuran yang lebih besar dari pada substrat. Oleh karena itu tidak semua bagian enzim dapat berhubungan dengan substrat. Hubungan antara substrat dengan enzim hanya terjadi pada bagian atau tempat tertentu saja. Tempat atau bagian enzim yang mengadakan hubungan atau kontak dengan substrat dinamai bagian aktif (*active site*). Hubungan hanya mungkin terjadi apabila bagian aktif mempunyai ruang yang tepat dapat menampung substrat. Apabila substrat mempunyai bentuk atau konformasi lain, maka tidak dapat ditampung pada bagian aktif suatu enzim. Dalam hal ini enzim tidak dapat berfungsi terhadap substrat.

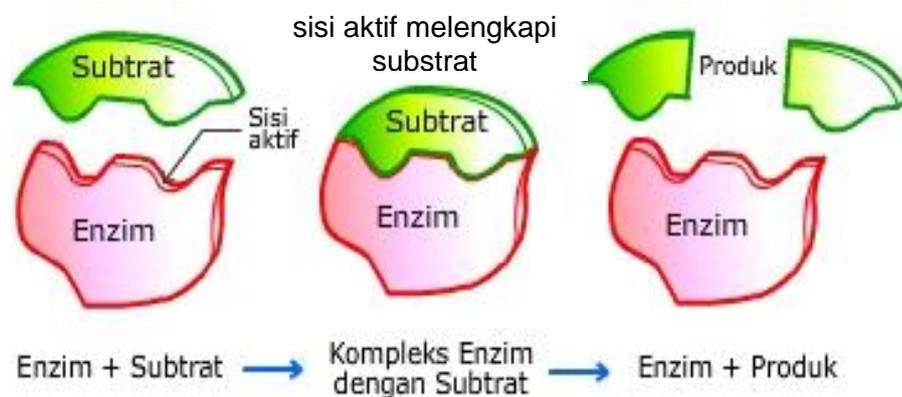
Hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim-substrat. Kompleks ini merupakan kompleks yang aktif, yang bersifat sementara dan akan terurai lagi apalagi reaksi yang diinginkan telah terjadi. Menurut Permasih (2011), enzim bekerja dengan dua cara, yaitu:

a. Teori Kunci-Gembok (*Lock and Key Theory*)

Menurut teori kunci-gembok, bentuk sisi aktif sangat spesifik, sehingga hanya molekul dengan bentuk tertentu yang dapat menjadi substrat bagi enzim. Substrat berperan sebagai kunci masuk ke dalam situs aktif, yang berperan sebagai gembok, sehingga terjadi kompleks enzim-substrat. Setelah bereaksi, kompleks lepas dan melepaskan produk serta membebaskan enzim

b. Teori Kecocokan Induksi (*Induced Fit Theory*)

Menurut teori kecocokan enzim, sisi aktif enzim merupakan bentuk yang fleksibel. Ketika substrat memasuki sisi aktif enzim, bentuk sisi aktif termodifikasi melingkupinya membentuk kompleks enzim-substrat.



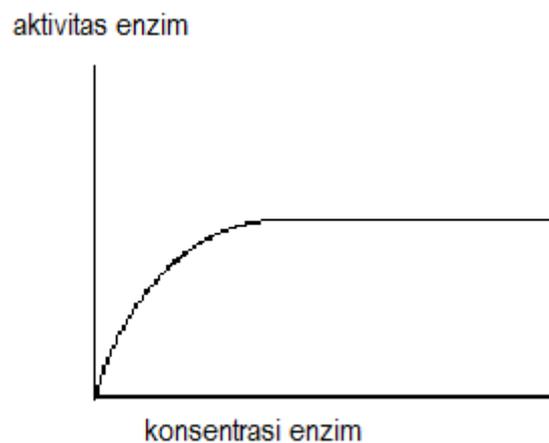
Gambar 3. Cara Kerja Enzim

3. Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim

Menurut Murray *et al.* (2009) faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim sebagai berikut:

a. Konsentrasi enzim

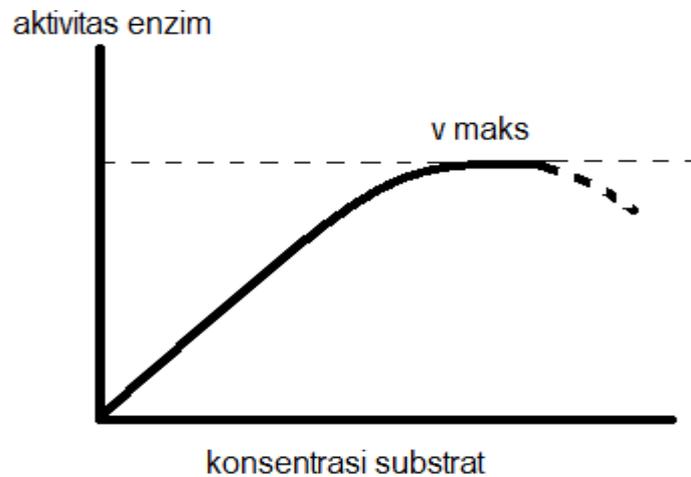
Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Tetapi setelah mencapai aktivitas maksimumnya, maka perubahan konsentrasi enzim lebih lanjut tidak akan mengubah aktivitas enzim



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim

b. Konsentrasi substrat

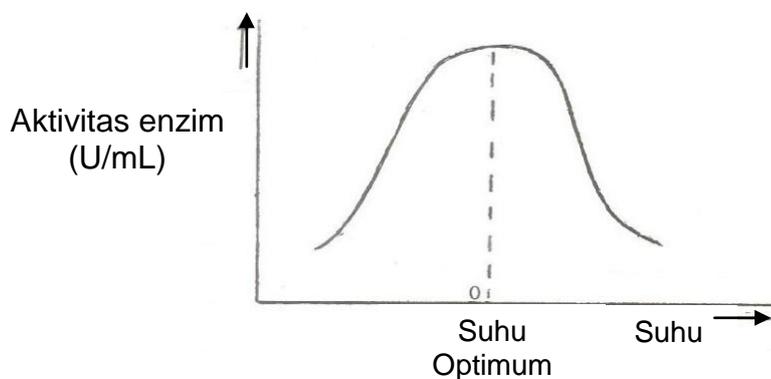
Hasil eksperimen menunjukkan bahwa dengan konsentrasi enzim yang tetap, maka pertambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar.



Gambar 5. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim

c. Suhu

Reaksi yang menggunakan katalis enzim dapat dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu rendah reaksi kimia berlangsung lambat, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Di samping itu, karena enzim itu adalah suatu protein, maka kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya denaturasi. Apabila terjadi proses denaturasi, maka bagian aktif enzim akan terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya pun akan menurun.

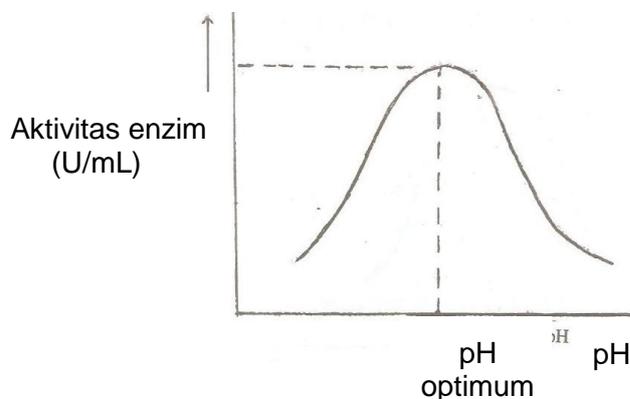


Gambar 6. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

Menurut Erlina (1998) suhu optimum enzim selulase pada umumnya antara 30-65 °C. Enzim selulase cukup stabil dengan pemanasan. Kemampuan untuk tidak terdenaturasi, terutama dengan adanya substrat, memungkinkan penggunaan enzim pada temperatur yang cukup tinggi.

d. Pengaruh pH

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. pH rendah atau pH tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim.

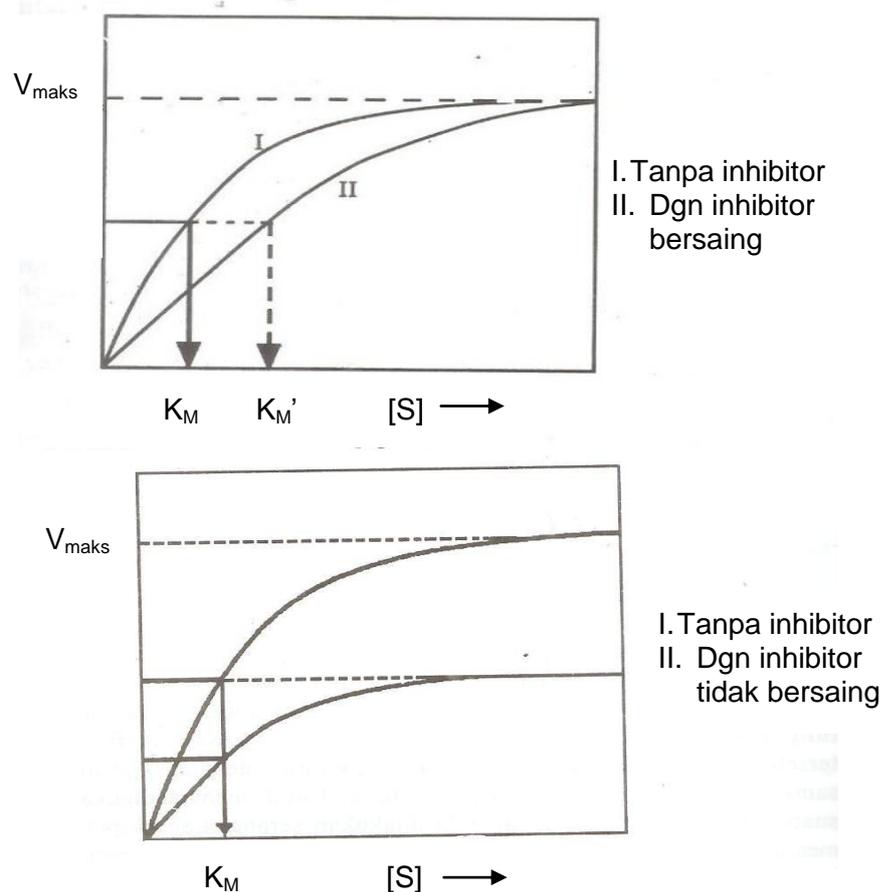


Gambar 7. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

Enzim selulase pada umumnya memiliki pH optimum antara 4,5 sampai 6,5. Harga pH optimum dari enzim yang sama dapat berbeda-beda tergantung dari substrat dan sumber enzim selulase tersebut (Erlina, 1998).

e. Pengaruh inhibitor

Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi atau kerja enzim dinamakan inhibitor. Hambatan yang dilakukan oleh inhibitor dapat berupa hambatan tidak reversibel atau hambatan reversibel. Hambatan tidak reversibel pada umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih yang terdapat pada molekul enzim. Hambatan reversibel dapat berupa hambatan bersaing atau hambatan tidak bersaing.



Gambar 8. Hubungan antara $[S]$ dengan V

Enzim selulase sangat dihambat aktivitasnya oleh glukonolakton. Hambatan ini lebih besar dengan penggunaan selobiosa dan

oligosakarida yang lebih rendah daripada dengan selulosa. Akibatnya, pemutusan awal selulosa lebih sedikit dipengaruhi daripada pemecahan secara lengkap menjadi glukosa (Erlina, 1998).

Faktor lain yang mempengaruhi aktivitas selulase yaitu berupa ion logam. Beberapa ion logam dapat menghambat aktivitas enzim selulase (inhibitor) dan dapat meningkatkan aktivitas selulase (aktivator). Nawas *et al.* (2006) melaporkan bahwa adanya ion logam seperti Hg^{2+} , Fe^{2+} , dan Cu^{2+} akan menurunkan aktivitas enzim selulase sedangkan dengan adanya ion logam seperti Co^{2+} dan Ca^{2+} pada konsentrasi ≤ 1 mM dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase dari *Trichoderma harzianum*. Hal yang sama dilaporkan oleh Sona (2004) bahwa keberadaan ion logam seperti Hg^{2+} , Fe^{2+} , Ag^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , dan Mg^{2+} akan menurunkan aktivitas enzim selulase (inhibitor) dari kerang hijau (*Perna viridis*). Senyawa penghambat tersebut dapat menekan seluruh kecepatan hidrolisis dengan menghambat aksi sinergis eksoselulase dan endoselulase yang bekerja pada permukaan selulosa.

D. Tinjauan Tentang Enzim Selulase (EC.3.2.1)

Enzim yang dapat menghidrolisis ikatan $\beta(1-4)$ pada selulosa adalah selulase. Menurut Ikram *et al.* (2005), hidrolisis enzimatik yang sempurna memerlukan aksi sinergis dari tiga tipe enzim ini, yaitu :

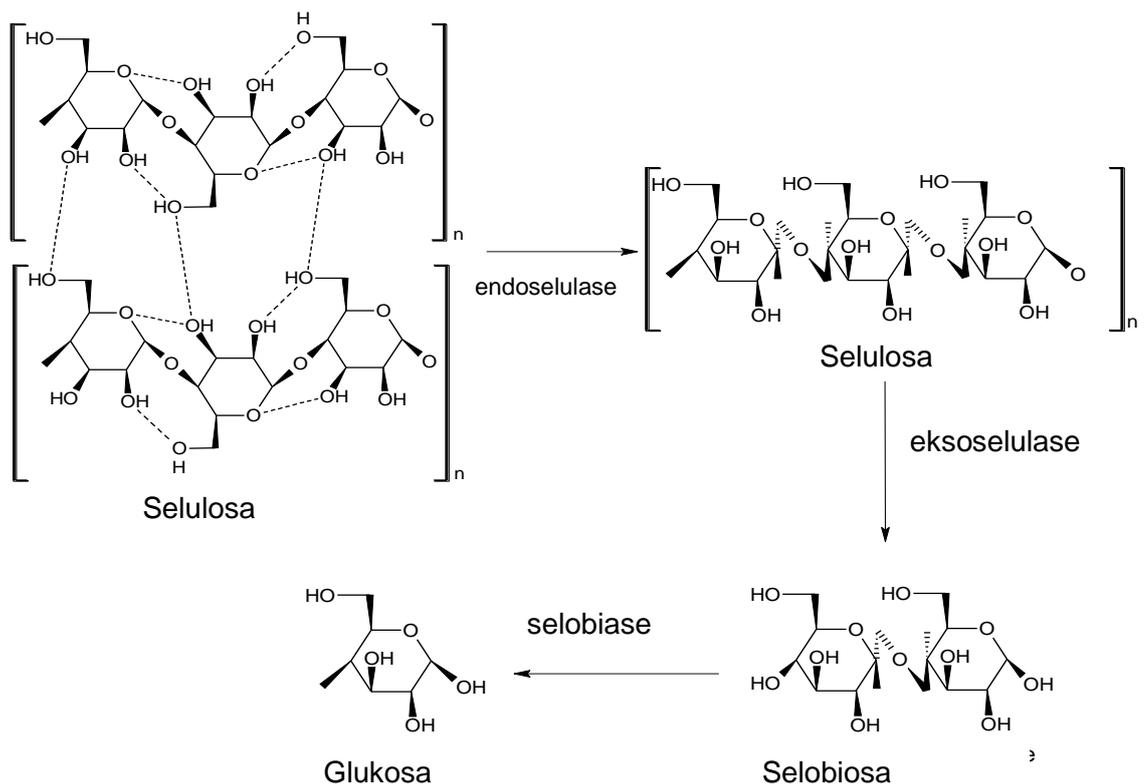
- a. Endo-1,4- β -D-glukanase (endoselulase, *carboxymethylcellulase* atau CMCCase), yang mengurai polimer selulosa secara random pada ikatan

internal α -1,4-glikosida untuk menghasilkan oligodekstrin dengan panjang rantai yang bervariasi.

b. Ekso-1,4- β -D-glukanase (eksoselulase), yang mengurai selulosa dari ujung pereduksi dan non pereduksi untuk menghasilkan selobiosa dan/atau glukosa.

c. β -glukosidase (selobiase), yang mengurai selobiosa untuk menghasilkan glukosa.

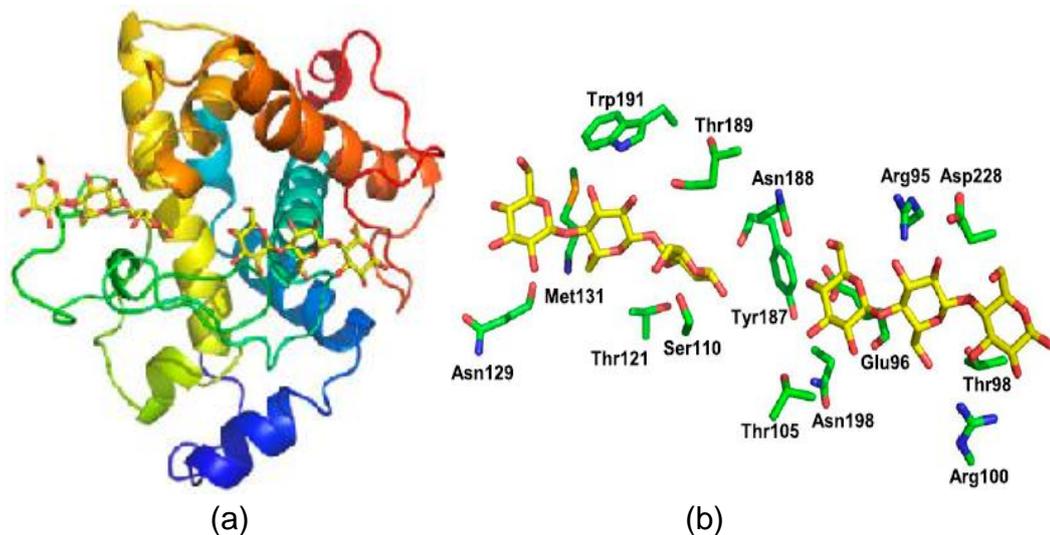
Mekanisme hidrolisis selulosa oleh ketiga enzim tersebut dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 9. Mekanisme hidrolisis selulosa (en.wikipedia.org/wiki).

Sama halnya dengan protein lain, enzim selulase juga disusun dari asam amino. Dapat dilihat pada Gambar 10 struktur dari enzim

selulase. Residu asam amino yang melakukan kontak langsung (*active site*) dalam situs pengikatan dengan substrat yaitu asam glutamat (Glu)96.

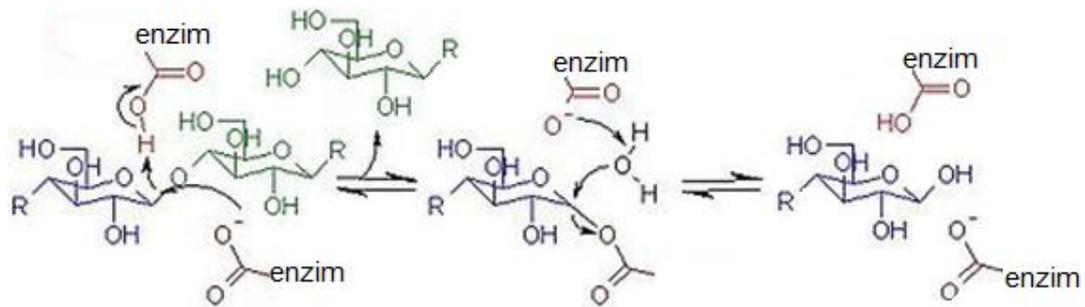


Gambar 10. Struktur enzim selulase, (a) struktur enzim selulase dalam bentuk 3D,(b) beberapa residu asam amino penyusun enzim selulase (Joana *et al.*, 2011).

Pembentukan glukosa secara enzimatik sesuai dengan mekanisme katalitik yaitu: $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$

Keterangan: E : enzim
 S : substrat
 ES : enzim-substrat
 P : produk

Mekanisme reaksi hidrolisis selulosa oleh selulase dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Mekanisme hidrolisis selulosa menjadi glukosa (Vocadlo *et al.*, 2001)

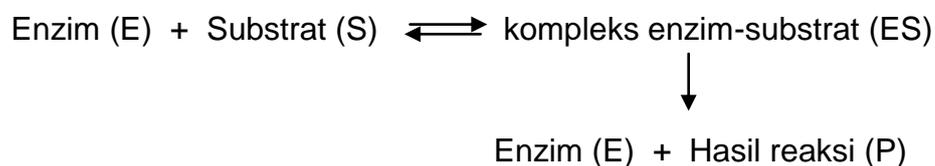
Kompleks selulase digunakan secara komersial dalam pengolahan kopi. Selulase digunakan secara luas dalam industri tekstil, deterjen, pulp dan kertas bahkan kadang-kadang digunakan dalam industri farmasi. Dalam krisis energi sekarang ini, selulase dapat digunakan dalam fermentasi biomassa menjadi biofuel, walaupun proses ini sifatnya masih eksperimental. Di bidang kesehatan selulase digunakan sebagai treatment untuk *phytobezoars*, salah satu bentuk selulosa bezoar di dalam perut manusia (en.wikipedia.org/wiki/cellulase). Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan asam atau enzim. Hidrolisis menggunakan asam biasanya dilakukan pada temperatur tinggi. Proses ini relatif mahal karena kebutuhan energi yang cukup tinggi. Baru pada tahun 1980-an, mulai dikembangkan hidrolisis selulosa dengan menggunakan enzim selulase (Gokhan *et al.*, 2002).

Hewan dari kelas bivalvia dapat menghasilkan enzim selulase yang merupakan produk langsung dari hewan tersebut yang terdapat pada hepatopankreasnya termasuk kerang kepah. Hal yang sama dilaporkan oleh Xu *et al.*, (2002) bahwa enzim selulase dapat diproduksi dari kerang

biru (*Mytilus edulis*) yang juga termasuk dalam kelas bivalvia. Enzim selulase itu sendiri merupakan enzim ekstraseluler yang diproduksi di dalam sel dan kemudian dikeluarkan dari sel masuk ke dalam sistem pencernaan. Dengan demikian enzim selulase dapat diisolasi dari hepatopankreas kerang kepah.

E. Kinetika Enzim

Pada tahun 1913 Leonor Michaelis dan Maude Menten mengajukan suatu hipotesis bahwa dalam reaksi enzim terjadi lebih dahulu kompleks enzim-substrat yang kemudian menghasilkan hasil reaksi dan enzim kembali. Secara sederhana hipotesis Michaelis dan Menten itu dapat dituliskan sebagai berikut:



Michaelis dan Menten berkesimpulan bahwa kecepatan reaksi tergantung pada konsentrasi kompleks enzim-substrat [ES], sebab apabila tergantung pada konsentrasi substrat [S], maka penambahan konsentrasi substrat akan menghasilkan pertambahan kecepatan reaksi yang apabila digambarkan akan merupakan garis lurus. Persamaan Michaelis-Menten dituliskan sebagai berikut:

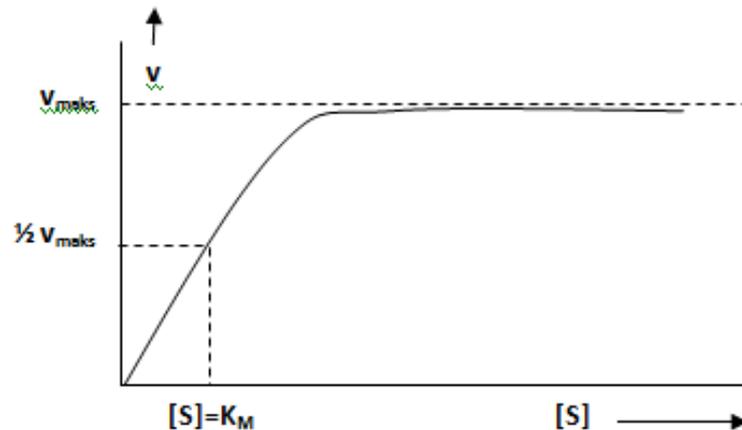
$$v = \frac{V_{\text{maks}} [S]}{K_m + [S]}$$

Keterangan:

v = kecepatan

v_{maks} = kecepatan maksimum

K_M = tetapan Michaelis-Menten



Gambar 12. Hubungan antara laju reaksi enzim dan konsentrasi substrat menurut persamaan Michaelis-Menten

Persamaan Michaelis-Menten merupakan dasar bagi semua aspek kinetika kerja enzim. Jika diketahui K_M dan v_{maks} , maka dapat dihitung kecepatan reaksi suatu enzim pada setiap konsentrasi substrat. Nilai K_M merupakan parameter yang menunjukkan afinitas enzim terhadap substrat. Semakin kecil nilai K_M semakin tinggi afinitasnya terhadap substrat, sehingga semakin rendah konsentrasi substrat yang dibutuhkan untuk mencapai kecepatan reaksi katalitik maksimumnya (v_{maks}) (Nelson dan Cox, 2004).

F. Tinjauan Tentang Ekstraksi Enzim

Ekstraksi adalah proses mengeluarkan enzim dari sel atau organ seluler. Untuk mengekstraksi enzim diperlukan perusakan atau

penghancuran dinding sel atau membran sel secara fisik, mekanik atau kimiawi. Sebagian besar enzim yang berasal dari hewan berada dalam jaringan khusus atau dalam urat daging. Organ hewan dapat dipotong-potong secara manual atau digiling untuk mengeluarkan enzim dari dalam organ. Proses ini sebaiknya dilakukan pada temperatur rendah karena kenaikan temperatur akan dapat mengurangi kecepatan pengeluaran enzim dari dalam organ dan dapat merusak enzim.

1. Teknik Sentrifugasi

Teknik sentrifugasi adalah suatu teknik pemisahan yang dilakukan berdasarkan sifat partikel dalam medan gaya sentrifugasi. Partikel yang berbeda dalam berat jenis, ukuran dan bentuk akan mengendap searah dengan gaya sentrifugal dengan kecepatan yang berbeda. Cara ini terutama digunakan untuk memisahkan endapan yang sukar disaring dengan saringan biasa (filter), dimana zat terlarut dapat dipisahkan dengan cepat menuju pusat medan sentrifugal. Dalam hal ini, partikel-partikel mula-mula yang terdistribusi secara merata di dalam larutan, pada suatu kecepatan perputaran tertentu akan bergerak meninggalkan larutan induknya dan bila partikel-partikel terlarut tersebut lebih besar dari partikel pelarut, maka akan memisah dan terjadi pengendapan. Sebaliknya partikel-partikel yang memiliki berat jenis lebih kecil dari pelarutnya, akan terapung di permukaan. Pada saat kesetimbangan tercapai, dimana konsentrasi zat terlarut di bagian atas lebih kecil dari pada konsentrasi bagian bawahnya, maka pada saat itulah terjadi pengendapan.

2. Fraksinasi

Hasil sentrifugasi diperoleh suatu larutan enzim kasar, selanjutnya dilakukan metode pemurnian. Pemurnian enzim pada dasarnya bergantung pada beberapa variabel diantaranya: pH, suhu, komposisi pelarut dan sifat dari protein itu sendiri (ukuran, kelarutan, muatan dan bentuknya). Fraksinasi protein dengan menggunakan garam, berdasarkan atas kelarutan protein yang merupakan interaksi antara gugus polar dengan air, interaksi ionik dengan garam dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Dalam hal ini fenomena kelarutan protein ada dua macam yaitu *salting in* dan *salting out*. *Salting in* adalah peristiwa dimana dengan penambahan garam konsentrasi rendah pada larutan protein dalam air, akan menurunkan koefisien aktivitas sehingga kelarutan protein akan bertambah.

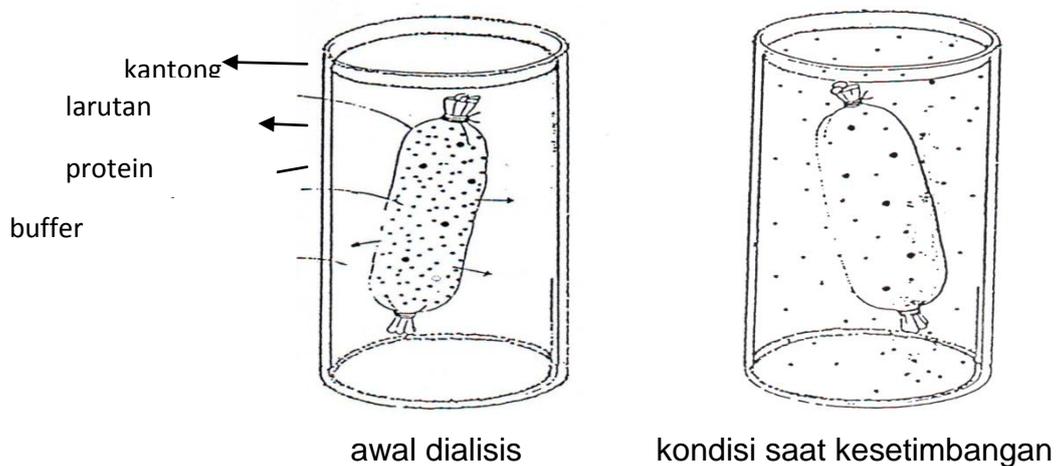
Bila konsentrasi garam dinaikkan sehingga kekuatan ion bertambah besar, maka interaksi ion dari garam dengan air akan bertambah, hal ini akan menyebabkan interaksi antara protein dengan air menurun. Proses ini disebut *salting out*. *Salting out* sangat tergantung pada hidrofobilitas protein. Peningkatan konsentrasi garam yang ditambahkan secara bertahap, akan mengendapkan protein secara bertahap pula, sehingga dapat digunakan untuk pemurnian protein. Pada peristiwa *salting out* akan terjadi pengendapan protein, dimulai dari kelarutan yang lebih kecil.

Reagen-reagen yang biasa digunakan adalah amonium sulfat dan natrium sulfat. Amonium sulfat bersifat menguntungkan karena harganya

murah dan kelarutannya tinggi meskipun di bawah temperatur kamar. Selain itu juga karena reaksinya netral dan tidak mengganggu fungsi dan bentuk enzim. Pemakaian natrium sulfat juga terbukti efektif bagi banyak enzim, namun kelemahannya adalah kelarutannya rendah (Suhartono, 1989).

3. Dialisis

Dialisis dalam biokimia dikenal sebagai proses untuk menghilangkan garam-garam dari larutan protein. Proses dialisis diperlukan suatu membran yang bersifat semipermeabel, dapat menahan zat-zat molekul besar tetapi melewatkan zat-zat molekul kecil. Adapun membran yang dipakai pada umumnya adalah kantong selofan dengan ukuran ketebalan dan panjang yang berbeda-beda.



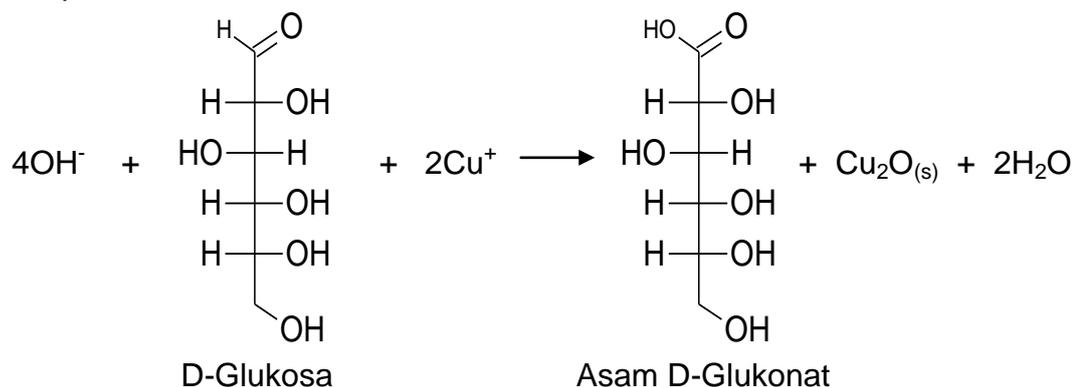
Gambar 13. Proses dialisis (Stryer, 1995).

G. Tinjauan Tentang Penentuan Aktivitas Spesifik Selulase

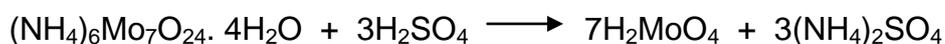
Ukuran kemurnian enzim dinyatakan sebagai aktivitas spesifik yang didefinisikan sebagai jumlah enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik dari enzim akan meningkat selama proses pemurnian dan akan mencapai nilai maksimal dan konstan jika enzim tersebut dalam keadaan murni. Aktivitas spesifik enzim dapat ditentukan dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar proteinnya (El-Safey dan Ammar, 2004).

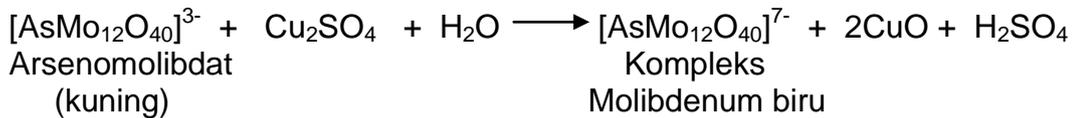
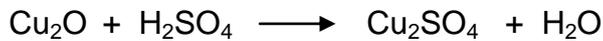
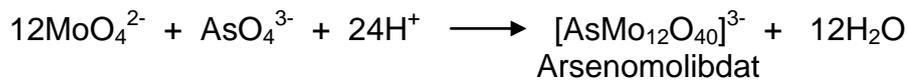
Aktivitas selulase didapat dengan menentukan kadar D-glukosa yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis selulosa. Penentuan kadar D-glukosa dilakukan dengan metode Nelson-Somogyi. Metode ini melibatkan dua tahap reaksi yaitu reaksi D-glukosa dengan pereaksi Nelson menghasilkan produk Cu_2O berupa endapan merah bata. Kemudian reaksi kedua adalah antara Cu_2O dengan pereaksi arsenomolibdat, dimana reaksinya adalah sebagai berikut:

Tahap 1 :



Tahap 2:





Pembuatan pereaksi arsenomolibdat dilakukan dengan penambahan asam sulfat ke dalam amonium molibdat untuk menghasilkan asam molibdat (H_2MoO_4) yang larut pada kondisi asam berlebih. Arsenat dengan amonium molibdat (dari asam molibdat) bereaksi menghasilkan arsenomolibdat berwarna kuning yang dapat direduksi oleh tembaga(I)oksida menghasilkan kompleks *Molybdenum blue*, yang mempunyai panjang gelombang maksimum 740 nm dan intensitas ini tidak mengalami perubahan dalam 24 jam (Bassett *et al.*,1994). Untuk penentuan kadar D-glukosa digunakan persamaan Bouguer-Beer (Underwood dan Day, 2002)

$$\mathbf{A=a.b.c}$$

Keterangan :

A : absorbansi

a : serapan spesifik

b : panjang lintasan menembus medium pengabsorpsi

c : konsentrasi (g/L)

Persamaan tersebut menyatakan hubungan antara besarnya serapan (A) terhadap konsentrasi D-glukosa, dimana jika dibuat grafik

hubungan A dan c merupakan garis lurus dengan kemiringan a b (Underwood dan Day, 2002).

Perhitungan aktivitas spesifik enzim juga melibatkan kadar proteinnya. Kadar protein didapat dengan menggunakan metode Lowry. Metode ini didasarkan pada reaksi protein dengan asam fosfotungstat-fosfomolibdat pada suasana alkalis yang memberikan warna biru dimana intensitas warnanya bergantung pada konsentrasi dari larutan protein tersebut.

Metode Lowry melibatkan dua pereaksi yakni pereaksi Lowry A dan Lowry B. Lowry A terdiri dari larutan Folin-Ciocalteu dan aquades dengan perbandingan 1:1 yang mana Folin-Ciocalteu terdiri dari fosfomolibdat dan fosfotungstat yang berfungsi sebagai zat pemberi warna biru dalam larutan. Sedangkan Lowry B terdiri dari natrium karbonat (Na_2CO_3) 2 % dalam NaOH, natrium kalium tartrat 2 % (NaK-tartrat) serta tembaga(II) sulfat pentahidrat 1 % ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dengan perbandingan 100:1:1. Fungsi dari natrium kalium tartrat 2% adalah untuk mencegah pengendapan kuprooksida yang terbentuk dalam reagen Lowry B. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ juga dikenal sebagai copper sulfat dimana fungsi dari bahan ini adalah memberi warna biru dengan kehadiran protein dan juga berfungsi untuk mereduksi fosfotungstat-fosfomolibdat. Adapun Na_2CO_3 digunakan sebagai garam yang mengkoordinasikan reaksi dalam suasana basa dengan NaOH. Larutan Lowry B terlebih dahulu dimasukkan ke dalam sampel agar larutan CuSO_4 dalam pereaksi Lowry B siap untuk mereduksi

asam fosfotungstat-fosfomolibdat yang terdapat pada Lowry A (Sudarmadji *et al.*, 2003). Setelah itu diukur dengan menggunakan spektrofotometer 20 D⁺ dengan panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya.

H. Tinjauan Tentang Kertas

Kertas merupakan salah satu komoditi yang paling penting yang digunakan oleh negara manapun. Seiring dengan berkembangnya pendidikan, permintaan terhadap kertas juga semakin meningkat. Dalam pandangan tentang peran kertas dalam masyarakat dan pertumbuhan industri secara keseluruhan, perlu bahwa industri kertas berkinerja baik (Riaz *at al*, 2010). Industri kertas berkembang pesat dengan menghasilkan 178 juta ton pulp, 278 juta ton kertas dan karton, dan menghabiskan 670 juta ton kayu. Pertumbuhannya dalam dekade berikutnya diperkirakan antara 2 % hingga 3,5 % per tahun (Lembaga Kajian Ekologi dan Konservasi Lahan Basah, 2002)

Pada umumnya sampah kertas banyak dibuang begitu saja dan tidak dimanfaatkan. Penumpukan sampah kertas tentu saja memberikan dampak buruk bagi lingkungan, baik dari segi keindahan maupun kesehatan. Metode daur ulang kertas dapat digunakan sebagai solusi pemanfaatan kertas bekas agar dapat mengurangi dampak buruknya terhadap lingkungan (Dahlan, 2011).

Kertas adalah bahan yang tipis dan rata, yang dihasilkan dengan kompresi serat yang berasal dari pulp. Selulosa merupakan komponen utama penyusun kertas. Oleh karena itu, melimpahnya jumlah limbah kertas dapat dipandang sebagai limbah selulosa yang dapat dimodifikasi. Salah satu teknologi yang dapat dikembangkan dalam memanfaatkan selulosa yang ada pada limbah kertas adalah dengan melakukan modifikasi menggunakan enzim selulase sehingga selulosa dapat diubah menjadi glukosa. Salah satu jenis kertas yang dapat digunakan yaitu kertas koran bekas.

Kertas koran yang berperan sebagai salah satu media komunikasi di Indonesia, sesudah digunakan biasanya tak berguna lagi dan dibuang. Menurut Fengel dan Wegener (1995) dalam Novalina (2002), limbah kertas koran merupakan sumber serat yang tidak dapat ditinggalkan dan bahkan akan menjadi lebih penting dikemudian hari. Dengan adanya serat kasar yang tinggi, kertas koran masih dapat digunakan sebagai substrat oleh enzim selulase. Namun ada hal yang harus diperhatikan dalam penggunaan kertas koran bekas, yaitu adanya mineral dan zat tinta yang harus dibuang (*deinking*) (Novalina, 2002). Komposisi kimia koran dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi kimia koran berdasarkan bahan kering (%)

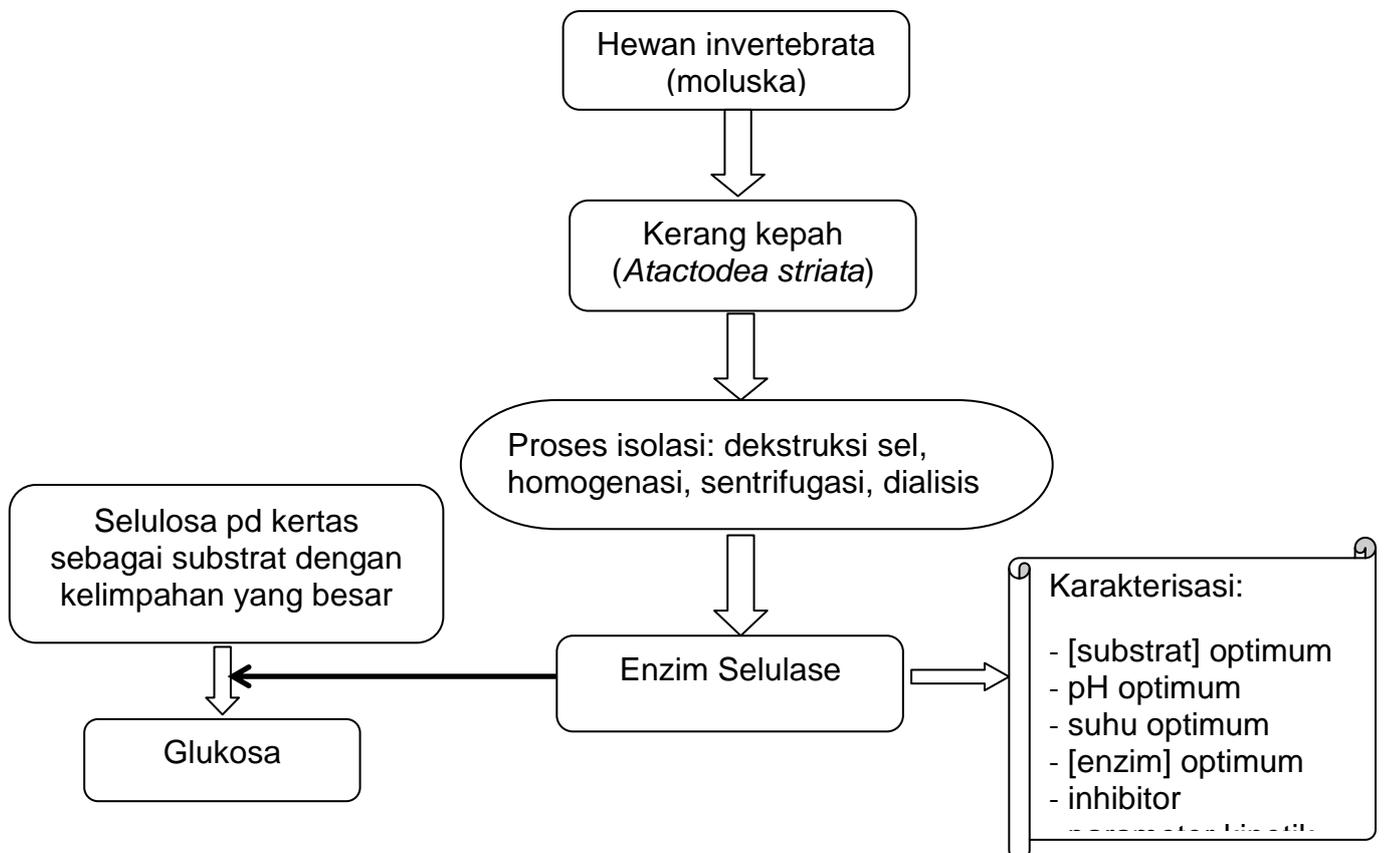
Komposisi kimia	Kadar
Abu*	0,90%
Protein kasar*	0,70%
Ekstrak eter*	3,70%
Serat kasar*	68,90%
Lignin*	17,40%
Kalium (K)*	0,30%
Fosfor (P)*	0,07%
Timbal (Pb)	0,16 ppm

Sumber: * Sherrod dan Hansen (1973) dalam Santoso (1987)

I. Kerangka Konseptual

Enzim selulase merupakan salah satu jenis enzim yang termasuk dalam kelompok enzim hidrolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis selulosa menjadi monomer glukosa. Enzim ini banyak terdapat di alam. Dari penelusuran literatur, produksi enzim selulase yang cukup murah dan lebih efisien dapat diperoleh dari hewan, salah satunya hewan invertebrata seperti moluska. Kerang kepah (*Atactodea striata*) merupakan salah satu hewan invertebrata yang berpotensi menghasilkan enzim selulase yang terletak pada bagian hepatopankreasnya. Proses isolasi enzim dari hewan terdiri dari beberapa tahap yaitu destruksi sel, homogenasi, sentrifugasi, dan dialisis. Berdasarkan fungsi dari enzim selulase tersebut maka salah satu sumber selulosa yang dapat digunakan sebagai substrat yaitu kertas. Studi biokimia enzim selulase diperoleh dengan mengkarakterisasi enzim yang diperoleh menggunakan substrat

selulosa limbah kertas. Karakterisasi yang meliputi konsentrasi substrat optimum, pH optimum, suhu optimum, dan konsentrasi enzim optimum dilakukan untuk mengetahui kondisi enzim selulase untuk bekerja secara maksimum. Selain itu, ditentukan pula pengaruh ion logam (aktivator atau inhibitor) terhadap aktivitas enzim selulase.



Gambar 14. Kerangka Konseptual

J. Hipotesis

Berdasarkan beberapa hal yang telah diuraikan, maka hipotesis ini adalah sebagai berikut.

1. Kerang kepah (*Atractodea striata*) berpotensi menghasilkan enzim selulase.

2. Kondisi optimum (konsentrasi substrat, pH, suhu, konsentrasi enzim) dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase dan ion logam dapat mempengaruhi aktivitas enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*) dalam menghidrolisis selulosa menjadi glukosa yang terdapat dalam limbah kertas.
3. Berdasarkan variasi konsentrasi substrat, nilai K_M dan v_{maks} dapat ditentukan.
4. Aktivitas spesifik enzim selulase dari kerang kepah (*Atactodea striata*) dapat ditentukan pada kondisi optimum.