

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM SELULASE PADA BAKTERI SELULOLITIK ASAL TANAH SAMPAH

ISOLATION AND CELLULASE ENZYME ACTIVITIES ASSAYS IN CELLULOLYTIC BACTERIA ORIGIN FROM SOIL WASTE

Hidayah Murtiyaningsih¹, Muhammad Hazmi¹

¹Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Jember

Jl. Karimata No. 49 Jember 68121 Jawa Timur

Email: hidayahmurtiyaningsih@gmail.com

ABSTRAK

Bakteri selulolitik merupakan bakteri penghasil enzim selulase yang mampu mendegradasi substrat selulosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri selulolitik asal tanah sampah, melakukan karakterisasi morfologi serta mengukur aktivitas enzim selulase ekstrak kasar pada bakteri selulolitik yang diisolasi pada salah satu tanah sampah di dramaga Bogor. Isolasi bakteri selulolitik dilakukan dengan menggunakan media selektif Carboxy Methyl Cellulose 1% (CMC 1%) dengan metode spread plate. Karakterisasi dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat murni terpilih pada media CMC 1% selanjutnya ditetesi congo red 0,1% untuk menguji potensi selulolitiknya (potensi selulolitik ditandai dengan munculnya zona bening di sekitar koloni). Hasil isolasi bakteri diperoleh 4 isolat yang berpotensi mendegradasi selulosa. Indeks aktivitas selulolitik paling besar dimiliki isolat 10.1 yaitu 0.875. Uji secara kuantitatif dengan metode spektrofotometri DNS menunjukkan bahwa aktivitas enzim tertinggi terjadi pada masa inkubasi hari ke-9.

Kata kunci: Selulolitik, enzim selulase, tanah sampah, Carboxyl Methyl Cellulose (CMC).

ABSTRACT

Cellulolytic bacteria is a cellulase enzyme producing bacteria capable of degrading cellulose substrates. Aim of this study is to isolate the cellulolytic bacteria from the soil, perform morphological characterization and measure cellulase enzyme activity of crude extracts on cellulolytic bacteria isolated on one of garbage soil in dramaga Bogor. Isolation of cellulolytic bacteria was done by selective media of Carboxy Methyl Cellulose 1% (CMC 1%) by spread plate method. Characterization is performed by growing the selected pure isolate on 1% CMC medium then spilled 0.1% congo red to test its cellulolytic potential (the cellulolytic potential is characterized by the emergence of clear zones around the colony). The result of bacterial isolation was obtained 4 isolates which have the potential to degrade cellulose. The largest cellulolytic activity index is owned by 10.1, namely 0.875. Quantitative test by spectrophotometric method of DNS showed that the highest enzyme activity occurred at 9 days incubation period.

Keywords: Cellulolytic, cellulase enzyme, soil waste, Carboxyl Methyl Cellulose (CMC).

PENDAHULUAN

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang mampu menghasilkan selulase dan menghidrolisis selulosa menjadi produk yang lebih sederhana yaitu glukosa. Bakteri selulolitik dijumpai pada habitat yang kaya akan selulosa, salah satunya adalah tanah sampah atau lokasi TPA. Menurut Reanida (2012) bahwa daun yang gugur di atas tanah atau pembusukan daun di TPA memungkinkan bahwa kandungan selulosa di tanah tersebut tinggi, maka besar kemungkinan untuk dapat menemukan bakteri pendegradasi selulosa di dalam tanah sampah.

Selulolitik sendiri berarti proses pemecahan selulosa menjadi senyawa atau unit-unit glukosa yang lebih kecil. Beberapa genus bakteri yang memiliki kemampuan selulolitik adalah *Achromobacter*, *Angiococcus*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Clostridium*, *Cellivibrio*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Poliangium*, *Sorangium*, *Sporocytophaga*, *Vibrio*, *Cellfalcicula* (Rao 1994), *Citrobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* dan *Aeromonas* (Anand *et al.*, 2009).

Mikroorganisme tersebut dapat mendegradasi selulosa karena menghasilkan enzim dengan spesifikasi berbeda yang saling bekerjasama. Enzim tersebut akan menghidrolisis ikatan (1,4)- β -Dglukosa pada selulosa (Saratale, 2012). Enzim selulase adalah suatu sistem enzim yang terdiri atas tiga tipe enzim utama yaitu kompleks endo- β -1,4-glukanase (CMCase, Cx selulase endoselulase, atau carboxymethyl cellulase), kompleks ekso- β -1,4-

glukanase (aviselase, selobiohidrolase, C1 selulase), dan β -1,4- glukosidase atau selobiase (Crueger and Crueger, 1984). Selanjutnya Munifah (2011) menambahkan bahwa enzim selulase adalah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan glikosidik β -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa.

Pemanfaatan enzim selulase yang diekstraksi dari bakteri sangatlah luas. Selain dalam bidang pangan dan industri, pemanfaatan enzim selulase dari bakteri dapat memberikan solusi dalam masalah pencemaran yakni mengurangi jumlah limbah selulosa seperti timbunan daun di area pembuangan akhir, limbah pertanian, rumput laut di tepi pantai serta dapat menjadi nilai tambah terhadap pemanfaatan limbah menjadi olahan pupuk organik. Hal ini dikarenakan limbah organik merupakan bagian dari masalah lingkungan yang berpotensi menjadi faktor pencemar lingkungan apabila dibiarkan dan tidak dikelola dengan baik dan benar. Kesuluruhan bahan tersebut dapat dimodifikasi untuk memproduksi berbagai bahan yang berguna untuk sektor pertanian dan biogas, dengan menggunakan enzim selulose. Beberapa penerapan produk organik yang bermanfaat untuk pertanian diantaranya MOL (Local Microorganism), POC (pupuk organik Cair), pupuk organik padat dan bokasi serta pestisida organik.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri selulolitik asal tanah sampah, melakukan

karakterisasi morfologi serta mengukur aktivitas enzim selulase ekstrak kasar pada bakteri selulolitik. Kedepannya kandidat bakteri yang memiliki aktifitas

tinggi dapat dijadikan isolat untuk produksi enzim selulase dan dapat diisolasi gen penyandinya untuk dilakukan kloning dan rekayasa.

METODOLOGI

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biorin Mikrobiologi, Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor pada bulan Juli 2016 sampai dengan November 2016.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spektrofotometer, *sentrifuge*, gelas ukur, *cuvette*, vortex, mikropipet, pH meter, *shaker*, *Laminar Airflow cabinet*, autoklaf, neraca analitik, *waterbath*, jarum ose, erlenmeyer, mikrotip, cawan petri, kapas, tabung reaksi, kelereng, batang pengaduk, botol, lampu spiritus.

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel tanah sampah, media CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) 1%, garam fisiologis, aquades, indikator *congo red* 1%, pereaksi DNS (3,5-*dinitrosaliclic acid*), alkohol 70%, spiritus, larutan standar glukosa, larutan standar BSA untuk pengukuran kadar protein dan larutan *Bradford*.

Metode Kerja

Pada penelitian ini isolasi dan karakterisasi bakteri selulolitik dari tanah sampah dilakukan dengan menggunakan metode *spread plate*. Isolat bakteri yang diperoleh kemudian di uji aktivitas selulolitiknya secara kualitatif melalui pembentukan zona bening yang dihasilkan dari pewarnaan

dengan *congo red*. Aktivitas selulolitik secara kuantitatif ditentukan berdasarkan kadar gula reduksi yang terbentuk dari reaksi enzimatik antara substrat CMC (*Carboxymethylcellulose*) dengan ekstrak enzim selulase. Kadar protein terlarut diukur berdasarkan metode Bradford 1976 & Walter 1984 dalam Bergmeyer & Gassal 1984.

A. Isolasi bakteri selulolitik dari tanah sampah

Sampel tanah pada sampah organik yang telah membusuk diambil dari TPA daerah Balio, Kecamatan Bogor, Dramaga.

Sebanyak 10 gram sampel tanah dilarutkan dalam 90 mL larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) lalu divortex sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Suspensi dari pengenceran 10^{-1} diambil 1 mL lalu dimasukkan ke dalam 9 mL garam fisiologis sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Selanjutnya dilakukan pengenceran berseri hingga didapatkan pengenceran 10^{-5} . Dari pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} diambil 0,1 mL dan diinokulasikan dengan metode sebaran (*spread plate*) pada media padat selektif *Carboximethyl cellulase* (CMC). Tujuan dari pengenceran bertingkat tersebut yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Komposisi media CMC per 100 mL mengandung 0,02 gr $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,075 gr KNO_3 ; 1 gr CMC; 0,05 gr K_2HPO_4 ; 0,002 gr $FeSO_4$; 0,004 gr $CaCl_2$; 0,2 gr

ekstrak yeast; 1,8 gr agar; 0,1 gr glukosa. Kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam.

B. Pengamatan Morfologi Koloni dan Pemurnian Bakteri

Pengamatan morfologi secara makroskopis dilakukan dengan cara mengamati morfologi koloni yang terbentuk dari bakteri, meliputi jumlah koloni, warna, bentuk koloni dan tepi koloni.

Pemurnian bakteri dilakukan dengan mengambil koloni yang tumbuh terpisah dan menunjukkan karakter morfologi yang berbeda dengan cara menginokulasikan isolat pada media CMC baru dengan metode *streak* kuadran sehingga diperoleh koloni tunggal. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 48 jam. Koloni tunggal pada cawan petri kemudian diinokulasikan ke media agar CMC miring sebagai stok bakteri menggunakan *loop* ose. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 48 jam.

C. Uji Aktivitas Enzim Selulase Secara Kualitatif

Isolat bakteri yang akan diuji secara kualitatif didapat dari stok agar miring CMC, kemudian ditotolkan pada petri kecil yang mengandung media CMC. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 48 jam. Pengujian aktivitas selulolitik dilakukan dengan metode *Congo Red*. Larutan *Congo Red* (0,1% w/v) dituang pada kultur dan dibiarkan selama 15 menit. Larutan kemudian dibuang dan dibilas dengan NaCl 0,2 M selama 15 menit sebanyak tiga kali. Pencucian ini bertujuan untuk membuang *Congo Red* yang tidak

berikatan dengan polisakarida. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 40°C selama 48 jam untuk menyempurnakan pembentukan zona bening, kemudian diamati zona bening yang terbentuk. Isolat bakteri yang mampu menguraikan CMC ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni setelah diuji dengan metode *Congo Red*. Indeks aktivitas selulase dapat ditentukan dengan cara mengukur rasio diameter zona bening terhadap diameter koloni. Isolat yang memiliki indeks aktivitas enzim terbesar ditumbuhkan dalam media agar miring CMC untuk digunakan uji lebih lanjut.

$$\text{Indeks Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}$$

Diameter koloni

D. Peremajaan Isolat Bakteri Kode (10.1)

Peremajaan isolat bakteri dilakukan pada bakteri yang memiliki indeks zona bening bernilai tinggi (salah satunya adalah isolat 10.1). Peremajaan isolat dilakukan dengan mengambil 1 ose isolat dari stok agar miring kemudian diinokulasikan ke dalam dua media. Peremajaan ini bertujuan untuk membuat isolat tetap hidup dengan cara dipindahkan ke media lain. Media pertama berupa media agar miring CMC dan kedua berupa media agar CMC *plate*. Peremajaan pada media CMC *plate* dilakukan dengan penggoresan isolat secara rapat, tanpa senggang atau *streak cockborer*. Proses inokulasi isolat menggunakan ose dilakukan pada

laminar air flow. Isolat bakteri disimpan dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 24 jam.

E. Produksi Enzim Selulase Ekstrak Kasar Isolat 10.1

Produksi enzim selulase ekstrak kasar dilakukan pada isolat-isolat yang memiliki diameter zona bening dengan nilai besar (salah satunya isolat 10.1). Sebanyak 1 ose isolat bakteri selulolitik dari media CMC dengan *streak cockborer* diinokulasikan kedalam 25 mL media cair CMC. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang dan dishaker pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Kemudian sebanyak 10 ml diinokulasikan ke dalam 100 ml media cair CMC. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang di inkubator bergoyang selama 24 jam. Setelah 24 jam, kita mulai melakukan tahap pemanenan/produksi enzim ekstrak kasar.

Produksi enzim dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 5 mL kultur ke dalam valcon kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit. Pemanenan dilakukan secara berkala mulai H₀-H₁₁ (hari ke-0 sampai hari ke-11). Supernatan yang diperoleh merupakan enzim ekstrak kasar yang nantinya akan diukur aktivitas enzim dan kadar protein terlarut dalam enzim ekstrak kasar.

F. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa dilakukan dengan membuat larutan stok glukosa, 1 gram (1000 mg) glukosa dilarutkan dalam 100 ml H₂O steril, yang artinya dalam 1 ml stok larutan mengandung 10 mg glukosa. Untuk pembuatan standart glukosa, yang kita perlukan adalah konsentrasi 1 mg/ml. Sehingga 1 ml larutan stok diencerkan dengan 9 ml H₂O steril. Kemudian dilakukan seri pengenceran dengan konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250 dan 300 ppm. Sebanyak 0.1 mL larutan glukosa dengan konsentrasi 1 mg/ml ditambahkan dengan 1.9 mL H₂O (Tabel 1.), kemudian ditambahkan dengan 2 ml DNS (*3,5-Dinitro salicylic acid*) dan dihomogenkan dengan vortex. Campuran diinkubasi pada suhu 100°C selama 15 menit. Setelah dingin, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Pembuatan kurva standar dilakukan 3 kali pengulangan. Absorban yang diperoleh diolah dengan menggunakan Microsoft Excel dengan nilai absorban sebagai sumbu x dan nilai konsentrasi sebagai sumbu y, hingga diperoleh persamaan reaksi dan regresinya.

Tabel 1. Konsentrasi Larutan Glukosa pada Pembuatan Standart Glukosa

Konsentrasi		H ₂ O steril (ml)	Larutan stok standar glukosa (ml)
ppm	mg/ml		
0	0.00	2.00	0.00
50	0.05	1.90	0.10
100	0.10	1.80	0.20
150	0.15	1.70	0.30
200	0.20	1.60	0.40
250	0.25	1.50	0.50
300	0.30	1.40	0.60

G. Uji Aktivitas Enzim Selulase Secara Kuantitatif

Pengukuran enzim selulase dilakukan dengan mengukur kadar gula reduksi, yang dilakukan terhadap 3 kelompok tabung reaksi yang terdiri dari sampel, kontrol dan blanko. Pada sampel, sebanyak 1 mL enzim ekstrak kasar ditambah dengan 1 mL larutan CMC 1%, kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit. Selanjutnya sampel ditambahkan 2 mL DNS dan diinkubasi pada *waterbath* suhu 100 °C selama 10 menit dan didinginkan. Pada kontrol, sebanyak 1 mL larutan CMC 1%, ditambah 2 mL DNS lalu ditambah 1 mL enzim ekstrak kasar. Selanjutnya

divortex dan diinkubasi pada *waterbath* suhu 100 °C selama 10 menit. Pada blanko, sebanyak 1 mL larutan CMC 1%, ditambah dengan 2 mL DNS dan 1 mL akuades kemudian divortex dan diinkubasi pada 100 °C selama 10 menit. Setelah dingin, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada ketiga tabung menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

H. Analisis Aktifitas Enzim Selulase

Satu unit aktivitas enzim selulase adalah jumlah enzim yang dibutuhkan untuk melepas 1 µmol gula pereduksi per menit pada kondisi percobaan dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Selulase (U/mL)} = \frac{[X \text{ sampel} - X \text{ kontrol}] \times \text{FP} \times 10^3}{\text{Waktu inkubasi} \times \text{BM glukosa}}$$

Ket:

Faktor pengenceran : 1000
Waktu inkubasi : 60 menit
BM glukosa : 180,18 mg/mL

I. Pengukuran Kadar Protein Total

Pengukuran protein terlarut dilakukan dengan menggunakan metode Bradford. Pembuatan kurva standar untuk pengukuran protein terlarut yaitu dengan membuat beberapa konsentrasi

BSA (*Bovine Serum Albumin*) yaitu 0, 20, 40, 60, 80, 100 ppm. Larutan BSA kemudian ditambahkan dengan H₂O steril dan reagent bradford dengan volume tertentu (Tabel 2). Campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada

suhu ruang selama 10 menit. Masing-masing diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Hasil absorbansi di plotkan pada Excel untuk mendapatkan persamaan dengan nilai absorbansi pada sumbu X dan konsentrasi BSA pada sumbu Y.

Pengukuran protein terlarut dilakukan dengan menambahkan 0,1

mL enzim ekstrak kasar dan 5 mL Bradford, kemudian divortex dan dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang yang sama dengan pengukuran standar BSA. Hasil absorbansi dimasukkan dalam persamaan pada kurva standar BSA.

Tabel 2. Konsentrasi Larutan Stok BSA dalam Pembuatan Standart Protein

Tabung	Konsentrasi BSA (mg/ml)	H ₂ O Steril (ml)	Larutan Standar BSA (ml)	Reagen Bradford(ml)
1	0	0.400	0.00	4
2	0.02	0.320	0.080	4
3	0.04	0.240	0.160	4
4	0.06	0.160	0.240	4
5	0.08	0.080	0.320	4
6	1.00	0.00	0.400	4

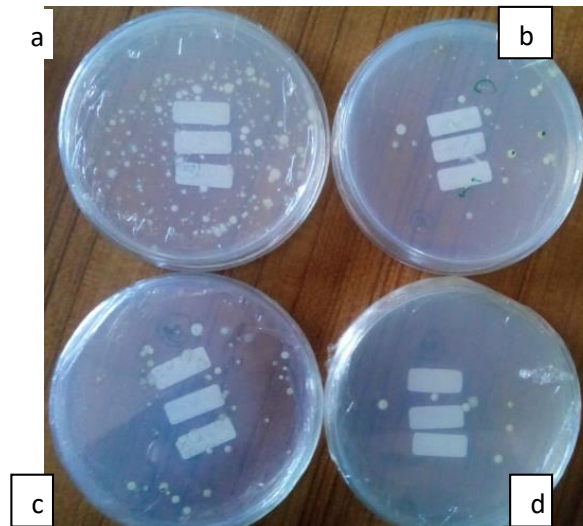
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Purifikasi Bakteri Selulolitik

Isolasi merupakan cara untuk memisahkan atau memindahkan mikroba tertentu dari lingkungan, sehingga diperoleh kultur murni atau biakan murni. Sampel yang digunakan merupakan tanah disekitar sampah organik yang terletak di daerah Dramaga, Bogor. Hal tersebut dikarenakan mikroorganisme khususnya bakteri selulolitik dijumpai pada habitat yang kaya akan selulosa, salah satunya adalah tanah di sekitar pembuangan sampah organik (Hatami *et al.*, 2008). Selain itu pada tanah sampah masih

banyak mengandung bahan organik yang memiliki kandungan selulosa sekitar 38%.

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang mampu menghasilkan selulase yang menghidrolisis selulosa menjadi produk yang lebih sederhana yaitu glukosa (Baharuddin *et al.*, 2010). Sebanyak 4 isolat bakteri yang memiliki morfologi berbeda telah berhasil diisolasi dari tanah sampah (Gambar 1). Keempat isolat tersebut tumbuh pada media CMC dengan konsentrasi pengenceran 10^{-3} berupa TBUD (terlalu banyak untuk dihitung). Sedangkan untuk pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} didapatkan berupa koloni tunggal.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri selulolitik dengan metode *spread plate* pada media agar CMC: a) pengenceran 10^{-3} , b) pengenceran 10^{-4} , c) pengenceran 10^{-4} , d) pengenceran 10^{-5} .

Bakteri yang berhasil diisolasi dari tanah tersebut diduga bakteri selulolitik karena mampu tumbuh pada media CMC yang merupakan media selektif bagi bakteri pendegradasi selulosa. Selulosa merupakan salah satu material organik tanah yang menentukan komunitas mikroba tanah. Selulosa merupakan polisakarida linier dari satuan glukosa yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glikosidik (Lehninger, 1990). Beberapa bakteri dapat menghasilkan selulase yang dapat mendegradasi selulosa.

Enzim selulase merupakan enzim yang mampu mendegradasi selulosa dengan memutuskan ikatan β -1,4 glikosida yang menghasilkan oligosakarida turunan selulosa dan glukosa. Enzim ini diklasifikasikan menjadi 3 kelompok tergantung spesifitas dalam menghidrolisis selulosa, yaitu endo-1,4- β -glukanase (CMCase), ekso-1,4- β -glukanase dan β -D-glukosidase (Lynd *et al.*, 2002).

Dalam media pertumbuhan bakteri selulolitik mengandung substrat CMC (*Carboxy Methyl Cellulase*) yang dapat didegradasi oleh enzim selulase (CMCase). Jika bakteri dapat tumbuh dalam media tersebut maka dapat diindikasikan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri selulolitik.

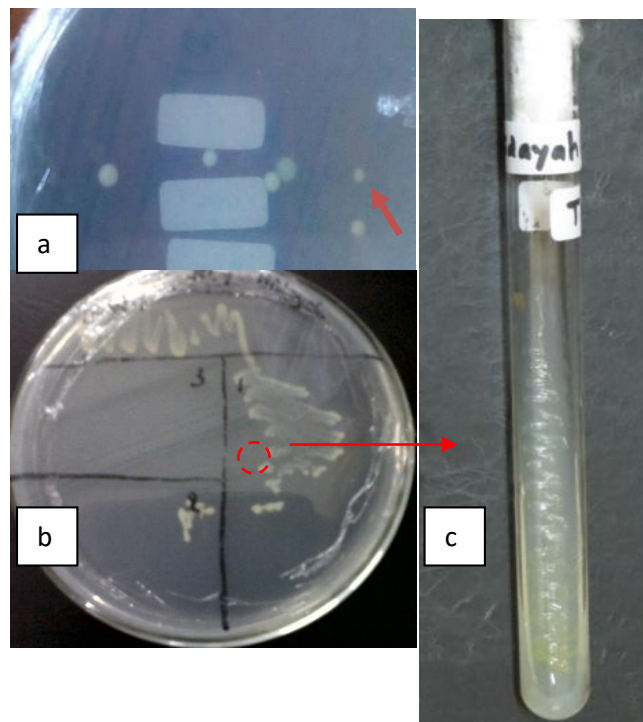
Pengamatan morfologi dilakukan pada semua isolat yang berhasil diisolasi, yaitu berasal dari pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Pengamatan tersebut meliputi jumlah koloni, warna dan tepi koloni (Tabel 3). Tujuan dari pengamatan morfologi ini adalah untuk mengetahui karakter morfologi dari suatu isolat. Dari hasil pengamatan morfologi petri yang TBUD tersebut didapatkan hasil bahwa isolat terbanyak memiliki tepi yang licin. Selain itu warna dari koloni yang didapat didominasi oleh warna putih dan kuning.

Tabel 3. Hasil isolasi bakteri selulolitik asal tanah sampah

Karakter	Pengenceran 10 ⁻³	Pengenceran 10 ⁻⁴	Pengenceran 10 ⁻⁴	Pengenceran 10 ⁻⁵
Jumlah Koloni	TBUD	45 koloni	52 koloni	7 koloni
Tepi	Licin	Bergerigi (8), licin (37)	Bergerigi (15), licin (37)	Licin
Warna	Kuning, putih	Kuning, putih	Kuning, putih, cream	krem, kuning

Setiap koloni tunggal yang memiliki morfologi berbeda pada hasil isolasi, ditumbuhkan pada media CMC secara *streak kuadran*. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan isolat yang murni atau berupa koloni tunggal. Kultur murni ialah kultur yang sel-sel mikrobaanya berasal dari pembelahan dari satu sel tunggal. Pada tahap ini,

isolat bakteri yang berwarna kuning (Gambar 2) dilakukan pemurnian dengan *streak kuadran*, namun tidak didapatkan adanya *single koloni*. Tahap berikutnya adalah mengambil isolat dari hasil *streak kuadran* dan dibuat stok pada media CMC agar miring, kemudian diberi nama isolat 10.4.



Gambar 2. Hasil pemurnian isolat hasil isolasi a) isolat 10.4 berwarna kuning, b) hasil *streak kuadran*, c) stok isolat 10.4 pada media miring.

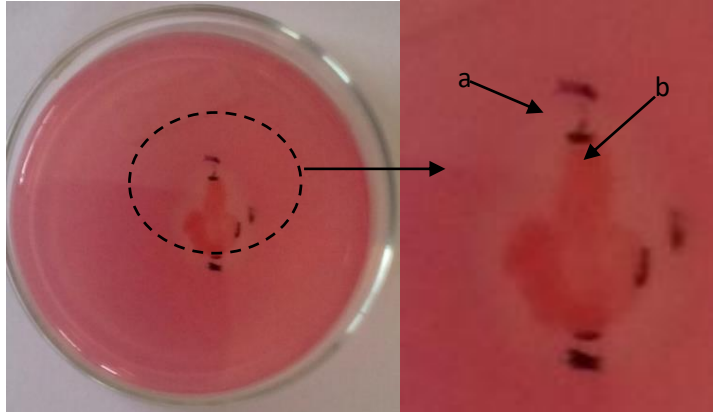
Pengukuran Aktivitas Selulolitik secara Kualitatif pada Isolat 10.4

Isolat dari stok agar miring kemudian ditumbuhkan pada media

CMC *plate* kecil untuk uji aktivitas selulolitik secara kualitatif. Hasil uji aktivitas enzim selulase secara kualitatif menunjukkan bahwa isolat bakteri hasil

pemurnian tersebut mampu membentuk zona bening pada media CMC *plate* setelah diuji menggunakan metode

Congo Red (Gambar 3). Bakteri tersebut memiliki nilai indeks aktivitas sebesar 0.85 cm.



Gambar 3. Analisis kualitatif isolat bakteri isolat 10.4 pada media CMC 1% menggunakan metode *Congo Red* setelah inkubasi 24 jam: a) zona bening, b) koloni bakteri.

Dari hasil uji di atas dapat disimpulkan bahwa isolat 10.4 tersebut disebut bakteri selulolitik karena mampu memanfaatkan selulosa pada media CMC sebagai satu-satunya sumber karbon untuk pertumbuhannya. Fungsi utama enzim ekstraseluler adalah melangsungkan perubahan-perubahan pada nutrisi disekitarnya sehingga memungkinkan nutrisi tersebut memasuki sel.

Zona bening menunjukkan adanya aktivitas hidrolitik oleh enzim ekstraseluler selulase yang diekskresikan oleh isolat-isolat bakteri dengan diameter tertentu. Produk hidrolisis tersebut berupa gula sederhana monosakarida dan tidak terjadi ikatan kompleks dengan *Congo Red*. Menurut Anand *et al.*, (2009) *Congo Red* akan berikatan secara spesifik dengan polisakarida yang memiliki ikatan β -1,4 glikosida, pada praktikum ini polisakarida yang terkandung dalam

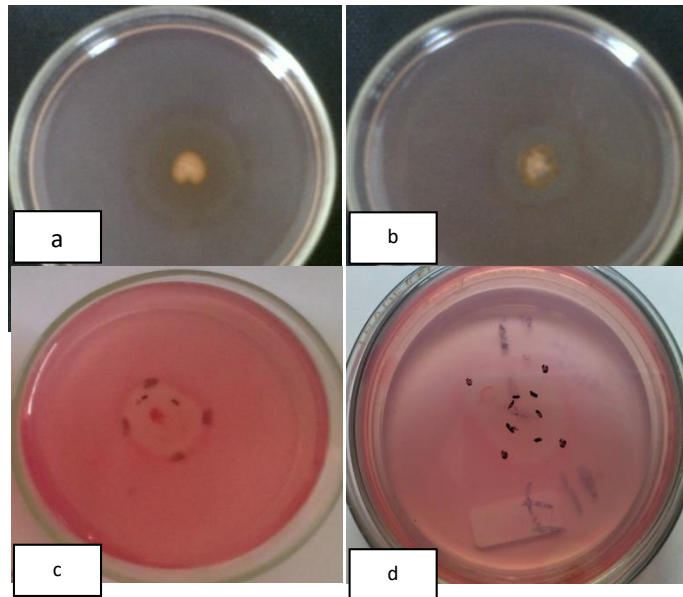
media uji adalah CMC. Sedangkan warna merah menunjukkan sisa selulosa yang tidak terhidrolisis sehingga terjadi pembentukan selulosa *Congo Red*. Zona bening yang terbentuk dapat dilihat dengan jelas melalui pencucian menggunakan NaCl 1 M. Merah kongo merupakan garam natrium dari benzenediazo-bis-1 naphthylamine-4 asam sulfonat ($C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$) sehingga pewarna ini akan larut dan tercuci oleh garam natrium lain, seperti NaCl. Dengan demikian, zona bening yang terbentuk akan tampak jelas.

Seleksi Isolat untuk Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase Secara Kuantitatif

Dari seluruh isolat yang telah diuji aktivitasnya secara kualitatif, kemudian dilakukan uji secara kuantitatif. Namun tidak semua isolat dilakukan uji secara kuantitatif. Pemilihan isolat tersebut didasarkan

pada besarnya zona bening yang terbentuk. Hanya isolat yang memiliki indeks aktivitas terbesar yang akan dilakukan pengukuran aktivitas enzim. Isolat yang akan diukur aktivitas secara kuantitatif adalah 4 isolat seperti pada (Gambar 4). Isolat 6.1 dan 6.2 berasal

dari tanah kandang ayam dan masing-masing memiliki IAE sebesar 1.533 dan 1.00. Isolat 10.1 berasal dari tanah sampah dan memiliki IAE sebesar 0.875. Isolat 2.3 merupakan isolat berasal dari comberan dan memiliki IAE sebesar 1.467.



Gambar 4. Analisis kualitatif isolat bakteri isolat pada media CMC 1% menggunakan metode *Congo Red*. Isolat yang memiliki Indeks zona bening terbesar a.) isolat 6.1 asal tanah kandang ayam, b) isolat 6.2 asal tanah kandang ayam, c) isolat 10.1 asal tanah sampah dan d) isolat 2.3 asal comberan.

Perbedaan indeks aktivitas selulolitik tersebut diduga karena selulase diekskresikan oleh masing-masing isolat bakteri yang berbeda potensinya untuk menguraikan substrat dalam media pertumbuhan (Sudiana *et al.* 2001). Semakin besar indeks selulase pada isolat maka semakin besar pula aktivitas selulolitik yang dihasilkan (Apun *et al.*, 2000). Dari keempat isolat tersebut kemudian diuji aktivitas secara kuantitatif (gambar 4c).

Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase Secara Kuantitatif pada Isolat 10.1

Pengukuran aktivitas enzim selulase isolat 10.1 harian dilakukan dengan mengukur absorbansi gula reduksi selama 11 hari. Hal ini bertujuan untuk mengetahui pada hari keberapa isolat tersebut memiliki aktivitas maksimumnya. Pengukuran tersebut dilakukan dengan memplotkan hasil absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva standart glukosa. Persamaan standart glukosa tersebut adalah $y = 2,927x - 0,067$ dengan nilai

$R^2 = 0,986$ (Lampiran). Konsentrasi yang didapat kemudian dikalikan faktor pengenceran dan dibagi dengan lama waktu inkubasi dan berat molekul glukosa, sehingga didapatkan unit aktivitas enzim.

Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol glukosa dalam satu menit sesuai kondisi pengukuran. Satu unit aktivitas katalitik 1 $\mu\text{mol}/\text{menit} = 1/60 \mu\text{mol}/\text{s} \approx 16,67 \text{ nmol}/\text{s}$; 16,67 nkat mengkatalisis 16,67 nmol/s, maka 1 U sesuai dengan 16.67 nkat.

Pengujian aktivitas selulase secara kuantitatif menunjukkan bahwa isolat 10.1 memiliki kemampuan dalam menghidrolisis selulosa pada substrat CMC membentuk gula pereduksi yaitu glukosa. Gula reduksi merupakan monosakarida yang dicirikan dengan adanya gugus aldehid dan keton yang bersifat mampu mereduksi senyawa pengoksidasi (Lehninger, 1982). Gugus aldehid glukosa akan bereaksi dengan DNS (asam dinitrosalisilat) sebagai oksidator untuk membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang menghasilkan warna jingga kemerahan (Sastrohamidjojo, 2005). Warna tersebut dapat dikuantitatifkan dengan pembacaan secara kolorimetrik menggunakan spektrofotometer.

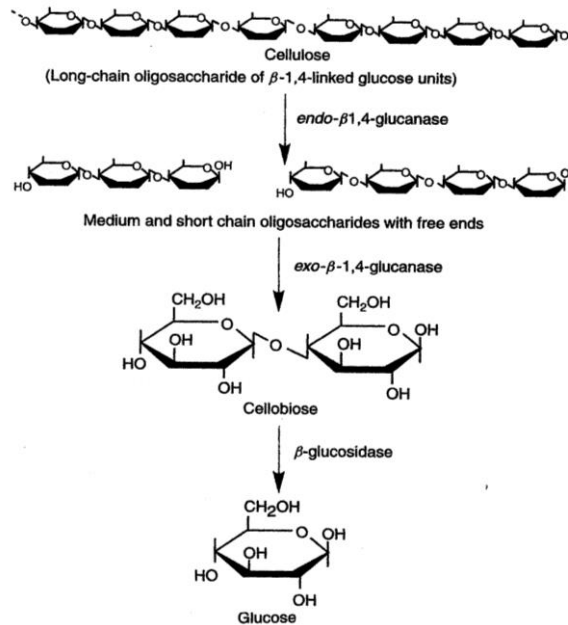
Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas harian (Gambar 6) didapatkan hasil bahwa pengukuran enzim hari ke-0 sampai hari ke-2 menunjukkan hasil yang negatif dikarenakan pada selang hari tersebut diduga bakteri belum memproduksi enzim selulase ekstraseluler. Aktivitas tertinggi enzim

selulase adalah pada hari ke-9 yaitu sebesar 0.135 nKat dengan gula reduksi sebesar 0.087471 mg/ml. Aktivitas selulase sebanding dengan kadar gula reduksi yang dihasilkan, semakin tinggi aktifitas enzim maka semakin tinggi pula gula reduksi yang dihasilkan. Selain itu juga mengalami penurunan aktivitas pada hari ke-4 sehingga menjadi -0.045 nKat, dengan gula reduksi -0.0289 mg/ml yang menandakan tidak adanya aktivitas. Nurmayani (2007) mengatakan bahwa hal ini dapat disebabkan oleh tingkat kemurnian enzim. Enzim yang digunakan berupa enzim ekstrak kasar, sehingga dimungkinkan masih mengandung komponen-komponen lain atau protein-protein lain yang merupakan inhibitor-inhibitor yang dapat mengganggu kerja enzim.

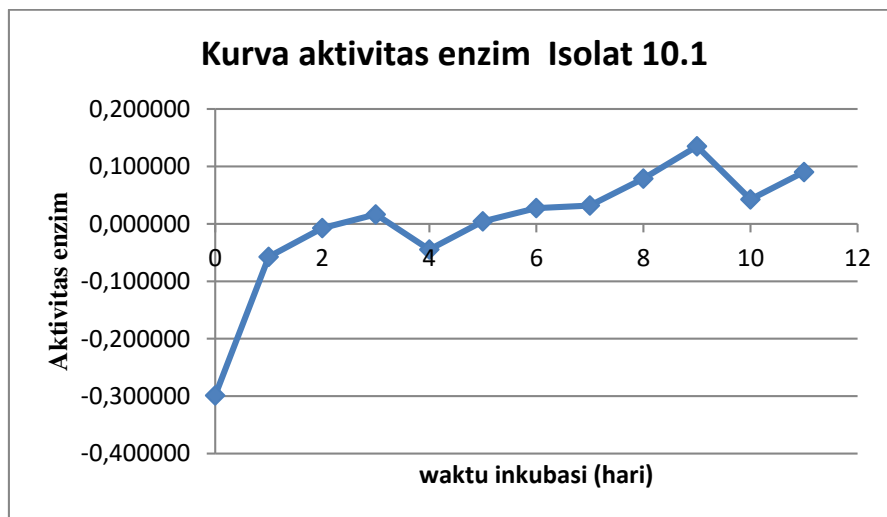
Penyebab lain turunnya kadar glukosa pada hari ke-4 adalah isolat tersebut tidak mampu mendegradasi selulosa secara sempurna. Salah satu tahapan enzim selulase terputus atau tidak menghasilkan enzim β -glukosidase yang berperan penting dalam pemecahan rantai sellobiosa menjadi glukosa. Selulase yang dihasilkan merupakan enzim induktif yang biosintesisnya dipengaruhi oleh induser yaitu selulosa yang terdapat dalam substansi CMC. Selulase akan bekerja secara sinergis dalam proses perombakan selulosa menjadi glukosa. Hidrolisis tersebut meliputi tiga tipe enzim utama yaitu: endo β -1,4-glukanase yang berperan memotong rantai selulosa secara random sehingga sisi yang terbuka dapat diserang oleh ekso- β -1,4-glukanase menghasilkan

selooligosakarida dengan ujung rantai bebas; Ekso-1,4 β -glukanase berperan memecah ujung pereduksi dan non pereduksi pada rantai selooligosakarida untuk menghasilkan selobiosa,

kemudian selobiosa kemudian dihidrolisis menjadi glukosa oleh β -glukosidase (Gambar 5.) (Moat *et al.* 2002).



Gambar 5. Degradasi selulosa oleh selulase (Moat *et al.* 2002)



Gambar 6. Kurva aktivitas enzim isolat 10.1 mulai hari ke 0 – ke 11.

Selain mengukur gula reduksi juga dilakukan pengukuran kadar protein terlarut. Kadar protein terlarut diukur dengan menggunakan metode Bradford yang merupakan uji untuk

mengukur konsentrasi protein total secara kolorimetri dalam suatu larutan. Penambahan pewarna CBB (*Coomassie Brilliant Blue*) akan berikatan secara spesifik dengan protein yang memiliki

gugus asam amino tirosin, histidin dan fenilalanin dalam larutan yang bersifat asam sehingga memberikan warna kebiruan yang akan terukur pada panjang gelombang 595 nm.

Uji protein terlarut diawali dengan pembuatan kurva standar BSA (Lampiran). Dari hasil pengukuran absorbansi BSA didapatkan nilai persamaan $y = 3,2x + 0,021$ dengan nilai $R^2 = 0,982$. Absorbansi sampel kemudian diplotkan pada persamaan tersebut sehingga diperoleh konsentrasi

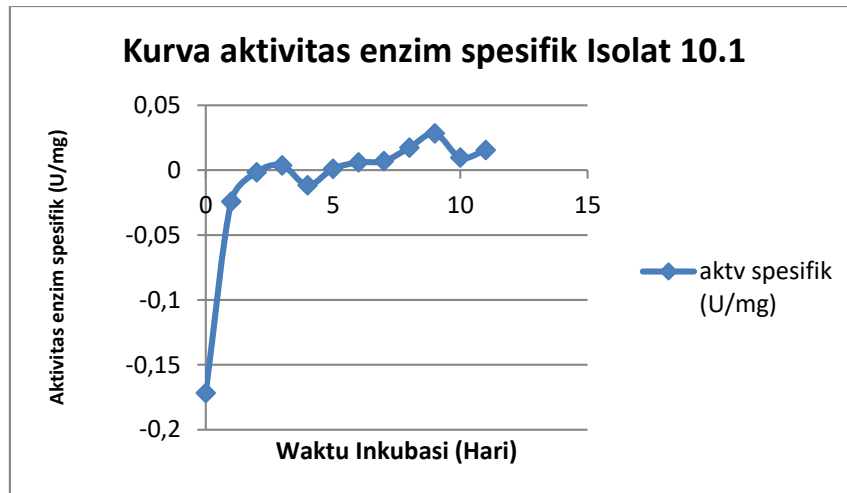
protein total dalam larutan. Hasil protein terlarut harian (mulai hari ke- 0 sampai ke ke-11) dari isolat 10.1 disajikan pada tabel 4. Kadar protein yang didapatkan berkisar antara 0.1-0.3 mg/ml. Hasil ini mengindikasikan bahwa dalam sampel enzim tidak hanya mengandung protein-protein selulase namun juga mengandung protein lainnya yang juga ikut terukur karena sampel tersebut masih berupa enzim ekstrak kasar yang belum dilakukan purifikasi.

Tabel 4. Hasil pengukuran kadar protein total dan aktivitas spesifik selulase

Hari	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
0	0,104	-0,17183
1	0,142	-0,02428
2	0,261	-0,0017
3	0,272	0,003635
4	0,230	-0,01164
5	0,247	0,001062
6	0,279	0,00593
7	0,274	0,006988
8	0,274	0,017285
9	0,286	0,028279
10	0,266	0,009616
11	0,350	0,015464

Hasil protein terlarut tersebut kemudian digunakan untuk menentukan aktivitas enzim selulase spesifik. Aktivitas spesifik tersebut diperoleh dari pembagian antara unit aktivitas enzim dengan kadar protein terlarut/total dalam larutan. Aktivitas

spesifik dari enzim selulase disajikan pada gambar 7. Aktivitas spesifik enzim selulase mengalami penurunan pada hari ke-4 yaitu -0.01164 U/mg. Kemudian aktifitas maksimumnya yaitu pada hari ke-9 yaitu sebesar 0.028279 U/mg.



Gambar 7. Kurva aktivitas enzim spesifik isolat 10.1 mulai hari ke 0 – ke 11.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil isolasi bakteri selulolitik dari tanah sampah didapatkan 4 isolat bakteri yang mampu tumbuh pada media CMC. Untuk isolat 10.4 mampu membentuk zona bening pada

media CMC dan memiliki IAE sebesar 0.85 cm. Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas enzim selulase pada isolat 10.1, aktivitas tertinggi berada pada hari ke-9, kemudian mengalami penurunan pada hari ke-4 dan aktivitas mulai menurun pada hari ke-10.

DAFTAR PUSTAKA

- Anand, Vennison, Sankar, Prabhu, Vasan, Raghuraman, Geoffrey, dan Vendan. 2009. Isolation and Characterization of Bacteria from the Gut Of *Bombyx Mori* that Degrade Cellulose, Xylan, Pectin and Starch and Their Impact on Digestion. *J of Insect Science*. 10(107): 1-20.
- Apun K, Jong BC dan Salleh MA. 2000. Screening and Isolation of A Cellulolytic and Amylolytic *Bacillus* from Sago Pith Waste. *J of Gen. Appl. Microbiol.* 46: 263 -267.
- Baharuddin, Razak, Hock, Ahmad, Aziz, Rahman, Shah, Hassan, Sakai dan Shirai. 2010. Isolasi and Characterization of Thermophilic Cellulase-Producing Bacteria from Empty Bunches-Palm Oil Mill Effluent Compost. *Journal of Applied Science*. Vol.7(1): 56-62.
- Hatami S, Alikhani HA, Besharati H, Salehrastin N, Afrousheh M, Jahromi ZY. 2008. Investigation on aerobic bacteria in some of north forest and farming soils. *American Eurasian J. Agric. & Environ. Sci* 3 (5):713-716.
- Lehninger AL. 1990. Dasar-dasar Biokimia Jilid 1. Alih bahasa Thenawidjaja, Maggy. Jakarta: Erlangga.
- Lynd L.R., P.J. Weimer, W.H. van Zyl and I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 66 (3): 506-577.
- Moat AG, Foster JW dan Spector MP. 2002. *Microbial Physiology Fourth edition*. New York: Wiley-liss, Inc.

- Munifah I, Chasanah E, Fawzya YN. 2011. Screening of cellulolytic bacteria from Indonesia's marine environment. Di dalam: Prosiding Seminar ISISM (International Seminar of Indonesian Society for Microbiology); Bogor, 26 Juni 2011. Bogor: Perhimpunan Mikrobiologi Cabang Bogor.
- Nurmayani, D. 2007. *Isolasi dan uji potensi mikroorganisme selulolitik asal tanah gambut dan kayu sedang melapuk dalam mendekomposisikan kayu*. Skripsi: Universitas Sumatera Utara.
- Pelezar M J dan Chan ECS. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Terjemahan Hadioemoto, R.S., Imas, T., Jitromo, S.S., dan Angka, S.L. *Elements of Microbiology*. Jakarta: UI Press.
- Rao SNS. 1994. *Mikroba Tanah dan Pertumbuhan Tanaman Edisi Kedua*. Jakarta: UI-PRESS.
- Reanida, Pramita Putri, Agus Supriyanto dan Salamun. 2012. Eksplorasi Bakteri Selulolitik Dari Tanah Mangrove Wonorejo Surabaya. Universitas Airlangga: Surabaya.
- Saratale, G.D., Saratale, R.G., Oh, S.E. 2012. Production and Characterization Of Multiple Cellulolytic Enzymes By Isolated *Streptomyces* sp. MDS. *Biomass and Bioenergy*.47: 302-315.
- Sastrohamidjojo H. 2005. *Kimia Organik*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Sudiana, Rahayu, Imaduddin, dan Rahmansyah. 2001. Cellulolytic Bacteria of Soil of Gunung Halimun Nasional Park. *Berita Biologi*. 5(6): 703-710.