

PRODUCTION OF AMYLOCELLULOLYTIC ENZYMES AND THEIR VIABILITY ON CARRIER MEDIA BY *Bacillus* sp. U4 AND *Pseudomonas* sp. U3

Salma Shavira Rahma Khofifah, Enny Zulaika*

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Teknik Kimia, Keputih, Kec. Sukolilo, Kota Surabaya, Jawa Timur 60111

*Email: enny@bio.its.ac.id

ABSTRACT

Amylase and cellulase are enzymes that are amyocellulolytic. Both are extracellular enzymes that can degrade organic materials, namely starch and cellulose. The purpose of this study was to determine whether *Bacillus* sp. U4 and *Pseudomonas* sp. U3 could produce amyocellulolytic enzymes and determine their viability after being incubated for 2 hours on the husk, peat, and sawdust carrier media. Screening for the presence of amylase was carried out on a selective medium, namely nutrient agar-amylum 0.5 %, and cellulase on carboxymethyl cellulose-agar medium. Both isolates were inoculated into sawdust, husk, peat carrier media and incubated for 2 hours. Viability was observed using the total plate count method. *Bacillus* sp. U4 and *Pseudomonas* sp. U3 can produce amylase and cellulase. The best isolate viability after incubation for 2 hours was found in husk carrier media with 2.13×10^5 CFU/gr of husk media.

Keywords: amylase, carrier media, cellulose.

PENDAHULUAN

Bahan organik di dalam tanah memiliki peranan penting dalam meningkatkan dan menjaga kesuburan tanah sehingga akan meningkatkan produktivitas tanaman dan keberlanjutan penggunaan lahan pertanian (Muzaiyanah & Subandi, 2018). Mikroorganisme memiliki peranan penting dalam mendegradasi bahan organik yang dapat mempercepat proses dekomposisi sisa tanaman sehingga dapat meningkatkan kesuburan tanah. Enzim ekstraseluler dapat diproduksi oleh bakteri untuk mengubah senyawa berukuran besar menjadi lebih kecil dan larut dalam air, kemudian akan ditransfer ke bagian sel yang membutuhkan (Saraswati dkk., 2006). Enzim ekstraseluler seperti amilase dan selulase dapat diproduksi selama proses fermentasi aerobik (Santos, 2014).

Enzim amilaselulolitik terdiri dari dua enzim, yakni amilase dan selulase. Amilase merupakan enzim yang dapat

mengkatalisis ikatan α -1,4-glikosidik internal dalam amilum (Indriati *et al.*, 2018), menjadi gula sederhana seperti maltose, dekstrin, dan glukosa. Amilase terdiri atas α -amilase, β -amilase, and γ -amilase dengan memanfaatkan substrat amilum (Swandi, 2020). Beberapa bakteri dapat memproduksi amilase, antara lain *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* dan *B. stearothermophilus*, *Streptomyces* sp., *Saccharomycopsis filbugera*, dan *Pseudomonas stutzeri* (Singh *et al.*, 2011). Enzim selulase adalah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan β -1,4 glikosida dalam selulosa, selodektrin, selobiosa, dan turunannya (Soeka *et al.*, 2019), menjadi monomer glukosa (Razie dkk., 2011). Beberapa genus bakteri yang dapat menghidrolisis selulosa antara lain genus *Bacillus*, dan *Pseudomonas* (Liang *et al.*, 2014).

Media pembawa adalah media penyimpan yang dapat digunakan sebagai media pertumbuhan, pengemas, dan dapat memperpanjang waktu simpan agen biologis (Shariati *et al.*, 2013). Media pembawa harus mengandung unsur hara organik yang mendukung viabilitas dan pertumbuhan mikroba yang diinokulasi ke dalamnya (Rohmah & Muslihatin, 2016). Syarat media pembawa antara lain (1) tidak bersifat toksik bagi agen biologis, (2) dapat menyerap air yang baik, (3) mudah penggunaannya, (4) mudah proses sterilisasinya, (5) mudah diperoleh karena ketersediaannya cukup, (6) dan murah (Muraleedharan *et al.*, 2010).

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui apakah *Bacillus* sp. U4 dan *Pseudomonas* sp. U3 dapat menghasilkan enzim amilase dan selulase serta mengetahui viabilitasnya pada media pembawa sekam, gambut dan serbuk gergaji.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai dengan Juni 2021 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data (FSAD), Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS), Surabaya

Skrining Enzim Amilase dan Selulase

Skrining enzim amilase dilakukan dengan cara isolat bakteri digores pada medium Starch Agar (Medium NA-amilum 0,5%). Isolat bakteri diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37^o C. Selanjutnya ditetesi beberapa tetes Gram's iodine pada biakan bakteri, dan diamati zona bening yang terbentuk (Iftita dkk., 2014). Skrining enzim selulase dilakukan dengan menginokulasi isolat pada permukaan medium CMC Agar dengan metode titik dan diinkubasi 48 jam pada suhu ruang. Selanjutnya, permukaan medium CMC Agar digenangi *congo red* 0,1% selama 15 menit. Pewarna *congo red* dibuang

dan dibilas menggunakan NaCl 1 M. Hidrolisis selulosa ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni bakteri (Lay *et al.*, 2015).

Media Pembawa Inokulan

Persiapan media padat

Media pembawa yang digunakan adalah serbuk gergaji, sekam, dan gambut. Ketiga media pembawa ditimbang, dan dimasukkan ke wadah plastik masing-masing 100 g dan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit (121^oC, 1 atm).

Starter inokulan

Tiga ose penuh masing-masing isolat dari media subkultur diinokulasikan kedalam 20 ml medium *Nutrient Broth* (NB), diinkubasi diatas *rotary shaker* (100 rpm, 24 jam) pada suhu ruang. Selanjutnya 20 ml kultur tersebut dimasukkan ke dalam 180 ml medium NB, diinkubasi diatas *rotary shaker* (100 rpm, 7 jam) sampai mencapai fase eksponensial yang sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Solikhah dan Zulaika (2018) atau sampai kepadatan sel mencapai 10⁸ sel/ml yang merupakan jumlah minimum inokulan yang harus ada dalam media pembawa per gram nya (Solikhah, & Zulaika, 2016; Noviana, & Raharjo, 2009). Pengukuran kepadatan sel menggunakan *Hemocytometer Improve Nauber* .

Pencampuran inokulan

Starter isolat yang sudah mencapai 10⁸ digunakan sebagai inokulan dengan konsentrasi 5% dan 10%. Inokulan diencerkan dengan akuades steril dengan perbandingan volume 1:1, dan media tanpa inokulan sebagai control. Inokulan dicampur dengan media pembawa yang sudah steril di dalam *Laminair Air Flow*, semua kemasan media pembawa yang berisi inokulan, diinkubasi di ruangan terbuka dengan sirkulasi udara yang baik, penyimpanan dilakukan sampai dengan 1 bulan.

Uji viabilitas

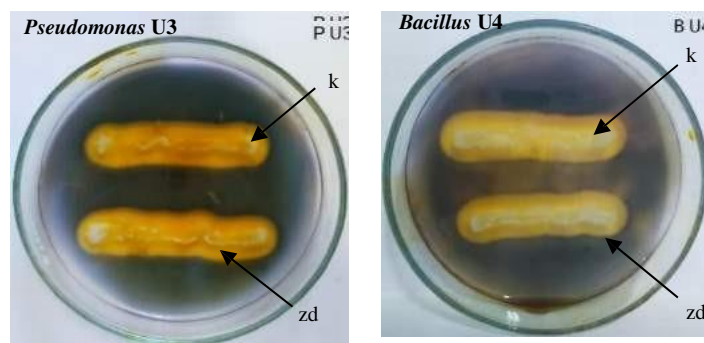
Uji viabilitas digunakan untuk mengetahui kemampuan hidup bakteri selama masa penyimpanan. Viabilitas dilakukan pada semua isolat setelah diinkubasi 2 jam. Kepadatan sel dihitung menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*) dengan metode pengulangan duplo. Sebanyak 1 g masing masing media pembawa diencerkan pada 9 ml akuades steril, dan dihomogenkan, diencerkan kembali sampai dengan 10^{-3} . Substansi kultur sebanyak 100 μ l diinokulasikan ke dalam NA-agar cawan dengan metode *pour plate*, diinkubasi 24 jam, dan dihitung jumlah koloninya. Koloni yang memenuhi standar perhitungan mikrobiologi adalah 30-300 CFU/gr (Capuccino, & Natalie, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

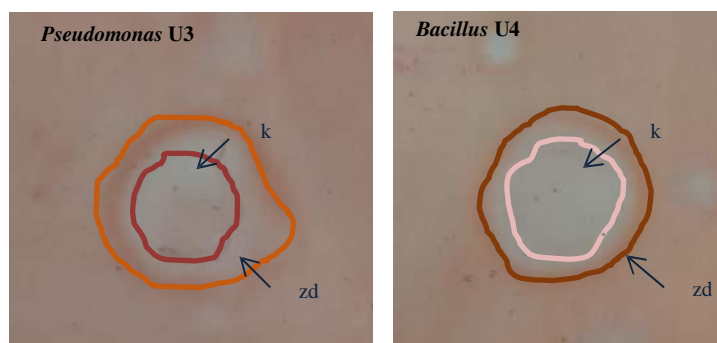
Produksi Enzim Amilase dan Selulase

Bacillus sp. U4 dan *Pseudomonas* sp. U3 mampu menghasilkan enzim amilase, ditandai dengan terbentuknya zona degradasi amilum di sekitar koloni

(Gambar 1). Keberadaan zona degradasi di sekitar koloni disebabkan oleh terjadinya hidrolisis amilum oleh isolat yang menyebabkan terdegradasinya amilosa sehingga tidak mampu membentuk kompleks dengan reagen iodine. Menurut Indriati *et al* (2018), bakteri yang memiliki aktivitas enzim amilase dapat menghidrolisis amilum yang terkandung pada media *starch agar* (Indriati *et al.*, 2018). Besar kecilnya zona degradasi amilum ditentukan jumlah monomer glukosa yang diproduksi dari proses hidrolisis amilum. Amilum terhidrolisis oleh enzim amilase menjadi dekstrin, kemudian terhidrolisis menjadi maltosa dan terhidrolisis lagi menjadi glukosa (Swandi, 2020). Enzim amilase dapat memecah ikatan glikosida yang terdapat pada polimer amilum menjadi sumber karbon dan energi (Swandi, 2020). Daerah pada media yang masih berwarna biru setelah ditetesi iodine diindikasikan amilum pada media belum terdegradasi oleh enzim amylase (Indriati *et al.*, 2018).



Gambar 1. Skринing amilase pada *Bacillus* sp. U4 dan *Pseudomonas* sp. U3 (zd: zona degradasi, k: koloni).



Gambar 2. Skринing selulase pada *Bacillus* sp. U4 dan *Pseudomonas* sp. U3

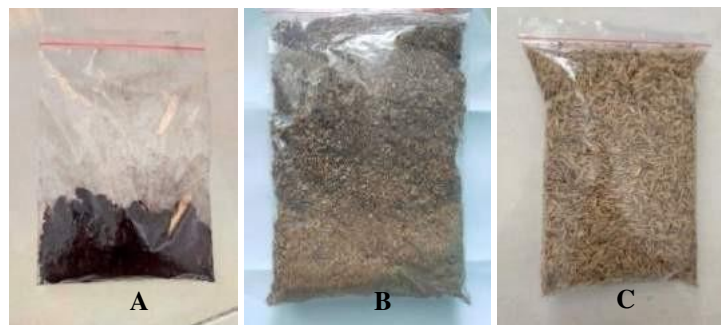
(zd : zona degradasi, k: koloni).

Bacillus sp. U4 dan *Pseudomonas* sp. U3 mampu memproduksi selulase ditandai dengan terbentuknya zona degradasi di sekitar koloni (Gambar 2). Zona degradasi muncul setelah media digenangi *congo red* 1% dan dibilas dengan NaCl 10%, hal ini disebabkan adanya aktivitas enzim selulase yang menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Reaksi antara *congo red* dan ikatan β -1,4- glikosidik yang terkandung pada polimer selulosa menyebabkan munculnya zona degradasi. Menurut Soeka *et al* (2019), bakteri dapat menghidrolisis selulosa

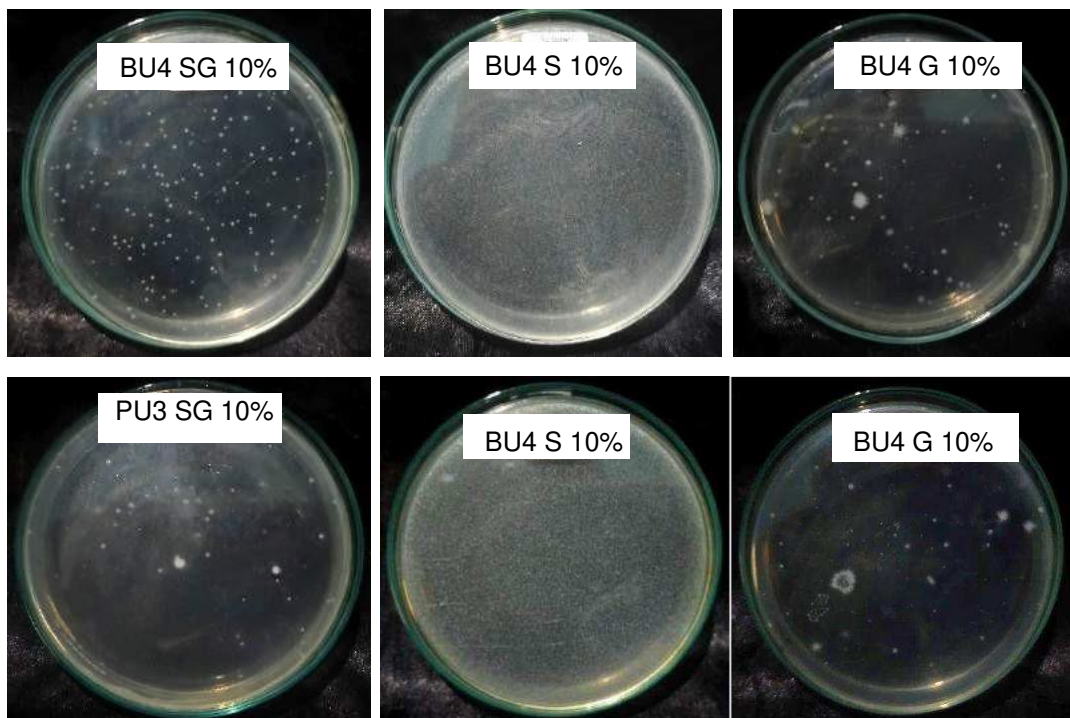
menjadi glukosa karena aktivitas enzim selulase (Soeka *et al.*, 2019).

Viabilitas Media Pembawa

Media pembawa yang digunakan pada penelitian ini adalah gambut, serbuk gergaji, dan sekam yang disterilisasi dan diberi inokulan (Gambar 3). Sterilisasi media pembawa bertujuan untuk meminimalkan adanya mikroorganisme yang tidak dikehendaki (kontaminan) serta untuk meminimalisasi kerusakan media pembawa yang dapat mempengaruhi kualitas inokulan (Nurrobifahmi dkk., 2017).



Gambar 3. Media pembawa yang telah disterilisasi (A. gambut; B. serbuk gergaji; C. sekam).



Gambar 4. Viabilitas isolat di media pembawa setelah 2 jam Inkubasi (P U3: *Pseudomonas* sp. U3; B U4: *Bacillus* sp. U4; SG: serbuk gergaji; S: sekam; G: gambut).

Media pembawa dengan inokulan yang mempunyai viabilitas tinggi adalah sekam, sedangkan media dengan viabilitas rendah adalah media gambut. Jumlah koloni dengan pengenceran 10^{-3} pada media pembawa ditunjukkan pada Tabel 1.

Menurut Simanungkalit *et al* (2006), standar baku mutu pembumbuhan mikroorganisme yang dapat digunakan untuk *biofertilizer* adalah minimal mencapai konsentrasi $\geq 10^7$

(Simanungkalit dkk., 2006). Pada uji viabilitas bakteri setelah 2 jam inkubasi belum mencapai kisaran 10^7 dikarenakan bakteri belum menyerap nutrisi media pembawa dengan baik sehingga jumlahnya belum dapat dikatakan sebagai jumlah standar *biofertilizer*. Uji viabilitas pada media pembawa dengan inokulan 0% beberapa koloni isolate masih tumbuh yang menandakan bahwa media tersebut belum sepenuhnya steril.

Tabel 1. Jumlah CFU pada media pembawa setelah inkubasi 2 jam

No	Media Pembawa	Isolat	Konsentrasi (%)	CFU/gr
1	Serbuk Gergaji	<i>Pseudomonas sp. U3</i>	0	0,00
			5	$7,2 \times 10^4$
			10	$9,7 \times 10^4$
		<i>Bacillus sp. U4</i>	0	$4,0 \times 10^3$
			5	$1,5 \times 10^4$
			10	$3,4 \times 10^4$
2	Sekam	<i>Pseudomonas sp. U3</i>	0	$4,1 \times 10^4$
			5	$30,2 \times 10^4$
			10	$30,9 \times 10^4$
		<i>Bacillus sp. U4</i>	0	$1,8 \times 10^4$
			5	$30,4 \times 10^4$
			10	$30,8 \times 10^4$
3	Gambut	<i>Pseudomonas sp. U3</i>	0	$3,0 \times 10^2$
			5	$4,0 \times 10^2$
			10	$4,2 \times 10^3$
		<i>Bacillus sp. U4</i>	0	$1,4 \times 10^3$
			5	$3,8 \times 10^3$
			10	$3,3 \times 10^3$

KESIMPULAN

Bacillus sp. U4 dan *Pseudomonas sp. U3* dapat menghasilkan enzim amilase dan selulase sehingga berpotensi digunakan sebagai dekomposer bahan organik. Media pembawa yang dapat menghasilkan viabilitas terbaik setelah diinkubasi 2 jam adalah sekam dengan konsentrasi inokulan 10%. Viabilitasnya $30,8 \times 10^4$ pada *Bacillus sp. U4* dan $30,9 \times 10^4$ *Pseudomonas sp. U3*.

DAFTAR PUSTAKA

- Capuccino, J. G., & Natalie, S. (2000). *Microbiology A Laboratory Manual*. California: Benjamin Cummings Publishing Company.
- Iftita, W. D., Shovitri, M., & Zulaika, E. (2014). Pengaruh HgCl₂ terhadap Viabilitas *Bacillus S1* dan Potensi Enzim Pendegradasi Senyawa Organik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 3(1): E26-E29.
- Indriati, G., Megahati, R. R. P., & Rosba, E. (2018). Potency of Amylase-producing Bacteria and

- Optimization Amylase Activities. *In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 35(1): 012023.
- Lay, Z., Than, W. M. & Myint, M. (2015). Study on the Cellulase Enzyme Producing Activity of Bacteria Isolated from Manure Waste and Degrading Soil. *International Journal of Technical Research and Applications*, 3(6): 165-169.
- Liang, Y.-L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y., & Feng, J.-X. (2014). Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *BioMed Research International*, 1-13.
- Muraleedharan, H., Seshadri, S., & Parumal, K. (2010). *Biofertilizer (Phosphobacteria)*. Chennai: Shri AMM Murungappa Chettiar Research Center.
- Muzaiyanah, S., & Subandi, S. (2018). Peranan Bahan Organik dalam Peningkatan Produksi Kedelai dan Ubi Kayu pada Lahan Kering Masam. *Iptek Tanaman Pangan*, 11(2).
- Noviana, L. & Raharjo, B. (2009). Viabilitas Rhizobakteri Bacillus sp. DUCC-BR-K1. 3 pada Media Pembawa Tanah Gambut Disubstitusi dengan Padatan Limbah Cair Industri Rokok. *BIOMA*, 11(1): 30-39.
- Nurrobifahmi, N., Lahan, S. D., Setiadi, Y., Ishak, I., Isotop, P. A., & Lebak, R. B. T. N. N. (2017). Pengaruh Metode Sterilisasi Iradiasi Sinar Gamma Co-60 terhadap Bahan Pembawa dan Viabilitas Spora *Gigaspora margarita*. *Jurnal Tanah dan Iklim*, 41(1).
- Razie, F., Anas, I., Sutandi, A., Gunarto, L., & Sugiyanta, S. (2011). Aktivitas Enzim Selulase Mikroba Yang Diisolasi Dari Jerami Padi Di Persawahan Pasang Surut Di Kalimantan Selatan. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan*, 13(2) 43-48.
- Rohmah, N. & Muslihatin, W. (2016). Pengaruh Kombinasi Media Pembawa Pupuk Hayati Bakteri Penambat Nitrogen Terhadap pH dan Unsur Hara Nitrogen dalam Tanah. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 5(2).
- Santos, G. (2014). *Probiotics An Essentials Tool in Intensive Shrimp Aquaculture*. England : 5m Publishing.
- Saraswati, R., Santosa, E., & Yuniarti, E. (2006). *Organisme Perombak Bahan Organik*. Bogor: Balai Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian.
- Shariati, S., Alikhani, H.A. & Pourbabaei, A. (2013). Application of vermicompost as a carrier of phosphate solubilizing bacteria (*Pseudomonas fluorescens*) in increase growth parameters of maize. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(8): 2010-2017.
- Simanungkalit, R. D. M., Husein E., & Saraswati. (2006). *Baku Mutu Pupuk Hayati dan Sistem Pengawasannya*. Bogor : Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian.
- Singh, J. S, Pandey, V. C., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agric Ecosyst Environ*, 140: 339-353.
- Soeka, Y. S., Suharna, N., Triana, E., & Yulinery, T. (2019). Characterization of cellulase enzyme produced by two selected strains of *Streptomyces macrosporeus* isolated from soil in Indonesia. *Makara Journal of Science*, 65-71.
- Solikhah, F., & Zulaika, E. (2016). Tinjauan Filogenetik Bakteri Lignoselulolitik Endogenik Untuk Dekomposisi Serat Gambut. *Tesis*. Departemen Biologi, Fakultas Ilmu

Alam Institut Teknologi Sepuluh
Nopember, Surabaya.
Swandi, M. K. (2020). Isolation,
Characterization and Activity Test
of Soil Origin Bacteria Amilage.
Biosfer: Jurnal Tadris Biologi,
11(2): 181-189.