

**OPTIMALISASI PRODUKSI ENZIM SELULASE DARI BAKTERI SELULOLITIK
DENGAN MEMANFAATAN LIMBAH AMPAS TEBU SEBAGAI SUMBER
KARBON**

Helvetia Suri*, Christine Jose, Yuli Haryani

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau 28293

ABSTRACT

S-16 and S-17 isolates are cellulose-producing bacteria isolated from Siak River water. The purpose of this research was to optimize the production of cellulose by using the dregs of sugar cane. This substrate chosen in order to minimize the cost of cellulose production. Enzyme activity was determine by Nelson Somogyi methode while protein concentration was analyzed by Lowry. Our finding showed that activity and specific activity of enzyme produced by S-16 isolate (4×10^{-4} U/mL and 0.0216 U/mg) was better than S-17 (33×10^{-6} U/mL and 1.04×10^{-4} U/mg) at 95% of confidence interval.

Keywords: cellulose, enzyme activity, sugar cane

ABSTRAK

Isolat S-16 dan S-17 merupakan isolat bakteri penghasil selulase yang telah diisolasi dari air Sungai Siak. Bakteri selulolitik mempunyai kemampuan mendegradasi limbah yang mengandung selulosa sehingga dapat dimanfaatkan untuk pengolahan limbah menjadi produk yang bernilai ekonomis seperti glukosa. Pada penelitian ini dilakukan optimalisasi produksi enzim selulase dari isolat S-16 dan S-17 dengan memanfaatkan limbah ampas tebu sebagai sumber karbo dalam produksi enzim selulase. Uji kuantitatif untuk aktivitas enzim ditentukan dengan metode Nelson Somogyi dan kadar protein ditentukan dengan metode Lowry. Aktivitas enzim selulase tertinggi dari S-16 diperoleh dalam media produksi (NaNO_3 0,25 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g; CaCl_2 0,1 g; KH_2PO_4 0,5 g; NaCl 0,2 g; 0,2 g ampas tebu) sebesar 4×10^{-4} U/mL dan aktivitas spesifik enzim selulase sebesar 0,0216 U/mg, sedangkan dari isolat S-17 diperoleh dalam media produksi (NaNO_3 0,25 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g; CaCl_2 0,1 g; KH_2PO_4 0,5 g; NaCl 0,2 g; 0,2 g) sebesar 33×10^{-6} U/mL dan aktivitas spesifik enzim selulase sebesar $1,04^{-4}$ U/mg. Perbandingan aktivitas enzim selulase dari isolat S-16 dan S-17 dengan menggunakan uji Duncan jarak berganda pada taraf 5%.

Kata kunci: selulase, aktivitas enzim, tebu

I. PENDAHULUAN

Selulosa dapat dihidrolisis secara enzimatik oleh enzim selulase. Enzim selulase adalah enzim ekstraseluler yang dihasilkan di dalam sel kemudian dikeluarkan ke medium pertumbuhannya. Enzim selulase diproduksi untuk mengkatalisis pemecahan selulosa menjadi glukosa dengan pemutusan ikatan β -1,4-glukosidik yang terdapat pada selulosa. Enzim ini sangat penting dalam proses biokonversi atau perubahan secara biologi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa. Enzim selulase ini dapat dihasilkan oleh Bakteri selulolitik karena kemampuannya mendegradasi selulosa yang terdapat dalam media pertumbuhannya. Beberapa spesies Bakteri seperti genus *Acetobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cytopaga*, *Pseudomonas*, *Sarcina* dan *Vibrio* diketahui mampu menghasilkan enzim selulase (Mosier dkk.,2005)

Di daerah Tandun terdapat pabrik *crude palm oil* (CPO) dan perkebunan kelapa sawit yang banyak menghasilkan limbah dan terbuang ke badan sungai. Umumnya limbah-limbah ini banyak mengandung lignin-selulosa. Keberadaan limbah alami di sungai menyebabkan hidupnya mikroorganisme selulolitik yang dapat memanfaatkan limbah tersebut sebagai makanan atau sumber karbon dalam pertumbuhannya dan dapat berperan dalam penghasil enzim selulase. Dari penelitian sebelumnya telah diisolasi 2 isolat bakteri selulolitik dari Sungai Siak. Isolat tersebut telah diuji untuk memperoleh media produksi optimum, serta waktu dan suhu produksi optimum. Penelitian ini dilakukan untuk memanfaatkan ampas tebu sebagai substrat produksi selulosa agar diperoleh kondisi produksi dengan cost yang rendah.

II. BAHAN DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan adalah Isolat bakteri S-16 dan S-22 koleksi laboratorium FMIPA UR yang di isolasi dari Sungai Siak. Ampas tebu yang diambil dari 3 (tiga) pedagang air tebu di sekitar kampus UR; *Albumin bovine serum fraction V* (ex. Hopkin & Williams, (Cat. No. 114255); Pengukuran serapan sinar tampak digunakan Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer; reagen Nelson Somogyi, reagen arsenomolibdat, media selektif (NaNO_3 0,25 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g; CaCl_2 0,1 g; KH_2PO_4 0,5 g; NaCl 0,2 g; ampas tebu 0,2 g sebagai sumber karbon) (Gupta, 2012).

Persiapan substrat ampas tebu: Ampas tebu disortir, Selanjutnya ampas tebu dipotong-potong kecil dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40 °C selama 24-48 jam. Setelah kering ampas tebu digiling sampai ukurannya lolos pada ayakan 100 mesh. Suspensi ampas tebu dibuat dengan konsentrasi 0,2% dan 0,4% dengan buffer fosfat 0,5M (pH 7).

Sebanyak 0,2 ml suspensi ampas tebu dimasukkan kedalam tabung analisis dan tambahkan 1,8 ml buffer fosfat 0,05 M (pH 7). Analisis kandungan kadar glukosa pada ampas tebu ditentukan menggunakan metoda Nelson-Somogy. Absorbansi suspensi diukur dengan spektrofotometer Genesis 10 S UV-VIS pada panjang gelombang 540 nm (Clark dan Switzer, 1997).

Peremajaan isolat: bakteri selulolitik penghasil selulose diinokulasikan (*spread plate*) pada permukaan *nutrient agar* (NA) steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri dari 1 tabung agar miring diambil dan dimasukkan ke dalam 50 ml media NB (*Nutrient Broth*), lalu diinkubasi di dalam *shaker inkubator* dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 37°C selama 24 jam untuk digunakan sebagai starter.

Produksi enzim selulase: produksi dilakukan dalam media produksi yang dicampurkan dalam 100 ml buffer fosfat 0,05 M pada pH 7 di dalam erlenmeyer. Setelah itu, ke dalam media ditambahkan 0,2 g ampas tebu kemudian disterilisasi dan diinkubasi selama satu malam. Suspensi bakteri dalam media *nutrient broth* yang sudah dihitung OD nya dan sebanyak 10 % inokulum diinokulasi ke dalam masing media cair produksi enzim pada *shaker incubator* dengan suhu 37°C selama 24 jam. Medium produksi enzim didinginkan dalam lemari es selama ± 2 jam pada suhu 5-10°C. Kemudian media disentrifugasi dingin pada kecepatan 9500 rpm selama 10 menit untuk memisahkan biomassa bakteri. Jika enzim tidak langsung digunakan, ekstrak kasar enzim ditambahkan NaN_3 hingga 0,02%. Enzim tersebut dimasukkan ke dalam eppendorf masing-masing sebanyak 1 mL dan disimpan pada suhu 5-10°C di dalam *freezer*.

Aktivitas enzim: Aktivitas ekstrak kasar enzim selulase ditentukan dengan metode Nelson-Somogyi (Clark dan Switzer 1977). Aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah gula pereduksi yang dilepaskan oleh kerja enzim per satuan waktu. Sedangkan aktivitas spesifik selulase ditentukan dengan metode Lowry (Boyer 1993). Uji aktivitas enzim menggunakan 1 mL suspensi ampas tebu 0,2 % yang disuspensi dengan buffer pospat 0,05 M pH 7 kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam *waterbath* pada suhu 40°C. Tanpa mengeluarkan tabung reaksi dari *waterbath* dimasukkan 1 mL larutan enzim. Larutan diinkubasi selama 30 menit. Substrat sebanyak 1 mL ditambahkan pada tabung sampel pada waktu nol sedangkan pada tabung kontrol setelah penambahan reagen Nelson (Green III dkk., 1989) lalu dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit. Setelah larutan dingin, larutan ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat dan divortex lalu dibiarkan dingin pada suhu kamar selama 5 menit dan ditambahkan 6 mL akuades. Sebagai blanko, digunakan buffer pospat pada pH 7 (0,05

M) dan sebagai standar, digunakan larutan glukosa dengan berbagai konsentrasi (antara 0,02 s/d 0,1 mg/mL). Absorbansi dari masing-masing larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Pengukuran aktivitas dilakukan masing-masing untuk empat kali pengulangan untuk setiap sampel. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat melepaskan 1 μ mol gula pereduksi permenit

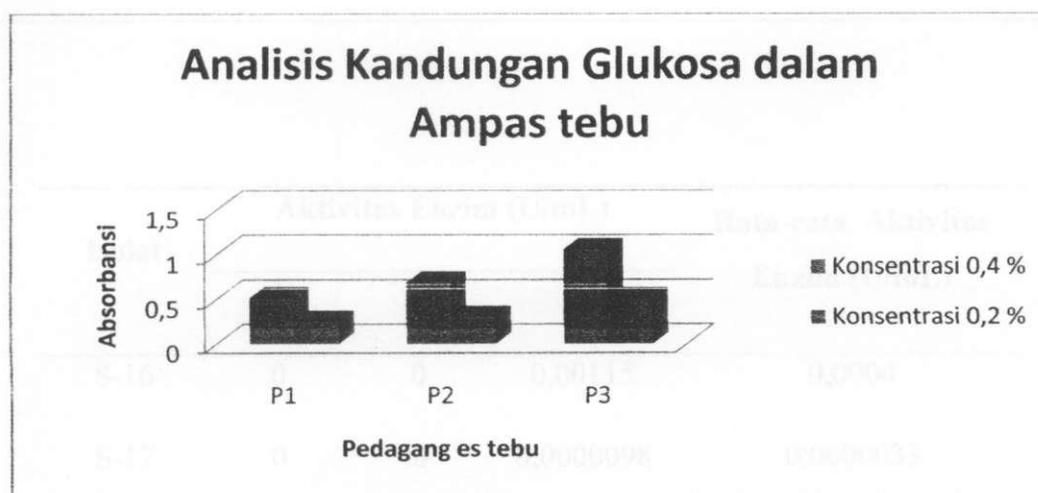
Kadar protein: Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry (Boyer 1993) menggunakan *bovine serum albumin* sebagai standar. Serapan dari masing-masing larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 700 nm.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis kandungan kadar glukosa pada ampas tebu ditentukan menggunakan metoda Nelson-Somogyi dan hasilnya ditunjukkan pada tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Kadar glukosa pada ampas tebu

	Konsenttrasi 0,4 %	Konsentrasi 0,2 %
P1	0,521	0,254
P2	0,693	0,308
P3	1,061	0,514



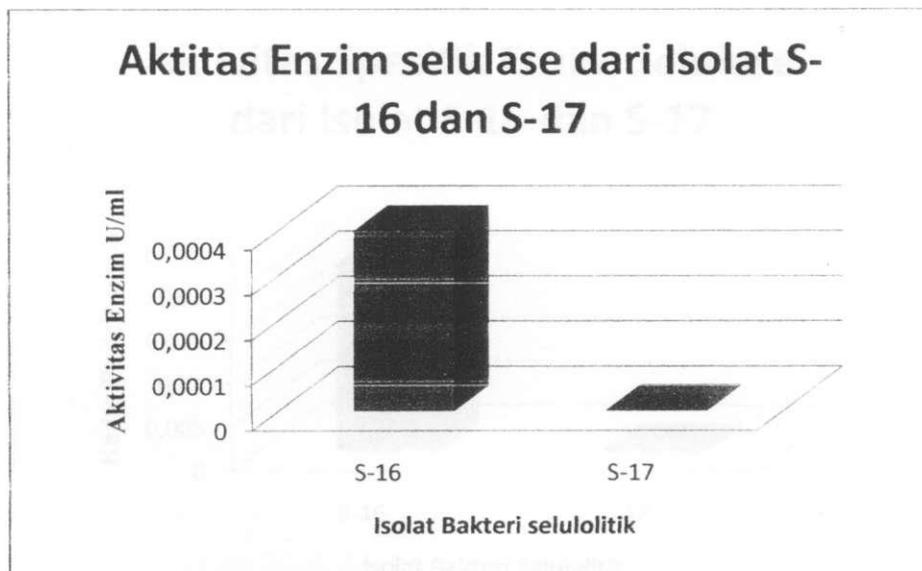
Penentuan aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase. Perbandingan nilai rata-rata aktivitas enzim dan aktivitas spesifik selulase dapat dilihat pada Tabel 2 dan 3. Perbedaan isolat bakteri selulolitik dan sumber karbon yang digunakan akan memberikan pengaruh terhadap jumlah dan aktivitas enzim yang dihasilkan. Selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan di dalam sel lalu diekskresikan ke medium tumbuhnya yaitu media yang mengandung selulosa. Ampas tebu yang digunakan sebagai sumber karbon pada media fermentasi untuk uji enzim. Ekstrak kasar enzim selulase diisolasi dari media produksi enzim yang mengandung ampas tebu sebagai substrat. Pada Tabel 2 menunjukkan bahwa kedua isolat memiliki aktivitas selulase. Rata-rata aktivitas enzim yang dihasilkan dari kedua isolat tidak berbeda nyata ($p \geq 0,05$) pada suhu 37°C dan pH 7, tetapi memiliki aktivitas spesifik dalam ekstrak kasar (Tabel 3).

Tabel 2. Data absorban, kadar gula pereduksi dan aktivitas enzim selulase isolat S-16 dan S-17 dengan substrat ampas tebu

Replikasi	S-16		S-17		Kadar gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)			
					Rata-rata Au-Ak			
	Uji	Kontrol	Uji	Kontrol	S-16	S-17	S-16	S-17
I	0,290	0,602	0,546	0,613	-0,312	-0,067	-33,3689	-7,1658
II	0,578	0,586	0,582	0,598	-0,008	-0,016	-0,8556	-1,7112
III	0,580	0,522	0,666	0,615	0,058	0,053	6,2032	5,6684

Tabel 3. Data absorban dan konsentrasi protein S-16 dan S-17 dengan substrat ampas tebu

Isolat	Aktivitas Enzim (U/mL)			Rata-rata Aktivitas Enzim (U/mL)
	I	II	III	
S-16	0,076	0,098	0,098	0,091
S-17	0,000	0,000	0,000	0,000
S-16	0	0	0,00115	0,0004
S-17	0	0	0,0000098	0,0000033

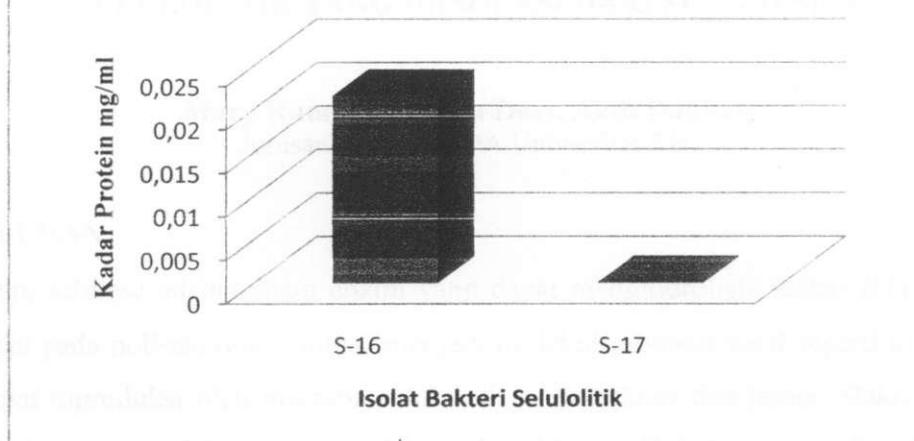


Kemurnian dari suatu enzim, didasarkan pada aktivitas spesifik enzim (Bintang, 2010), karena semakin murni suatu enzim, maka semakin besar nilai aktivitas spesifiknya. Nilai aktivitas spesifik ditentukan dengan metode Lowry (Boyer, 1993) yaitu dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein yang diperoleh. Dalam menentukan kadar protein, tahap awal perlu dilakukan pemekatan enzim dengan cara pengendapan larutan ekstrak kasar enzim dengan aseton dingin (-20°C). Larutan diendapkan semalam di dalam *freezer* agar enzim tidak terdenaturasi. Endapan protein dipisahkan dari filtrat menggunakan sentrifugasi dingin pada kecepatan 13000 rpm sehingga protein tidak tercampur lagi dengan gula pereduksi terlarut yang dapat mengganggu penentuan kadar protein. Gula pereduksi pada enzim dapat mereduksi Cu^{+2} yang ada pada reagen Lowry. Penentuan kadar protein secara Lowry berdasarkan atas pengukuran serapan cahaya oleh ikatan kompleks protein dengan Cu^{+2} yang berwarna biru.

Tabel 3. Data absorban dan konsentrasi protein S-16 dan S-17 dengan substrat ampas tebu 0,2%

Isolat	Absorban		Konsentrasi (mg/ mL)		Rerata (mg/ mL)
	1	2	1	2	
S-16	0,076	0,098	0,00407	0,03303	0,01855
S-17	0,093	0,096	0,03134	0,03235	0,03185

Aktivitas Spesifik Enzim Selulase dari Isolat S-16 dan S-17



IV. KESIMPULAN

Aktivitas enzim selulase tertinggi ditunjukkan oleh isolat S-16 sebesar 4×10^{-4} sedangkan dari isolat S-17 sebesar 33×10^{-6} U/mL dalam media produksi dengan sumber karbon ampas tebu konsentrasi 0,2 %. Sebaliknya pada aktivitas spesifik enzim selulase kedua isolat menunjukkan kadar protein yang berbeda, kadar protein tertinggi ditunjukkan oleh isolat S-17 sebesar 0,0216 U/mg dan pada isolat S-16 sebesar 0,000104 U/mg.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Penelitian Universitas Riau atas bantuan dana riset dari Dana DIPA Universitas Riau dengan No. Kontrak 15/UN19/PL/2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Bintang, M.** 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga.
- Boyer, R.** 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. 3rd ed. Benjamin Cummings, San Francisco.
- Clark, J.M. & Switzer R.L.** 1977. *Experimental Biochemistry*. 2nd edition. WH. Freeman & Co. San Fransisco.
- Gupta, P., Samant, K., Sahu, A.** 2012. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of their Cellulolytic Potential. *International Journal of Microbiology*; 2012: 578925.