

OPTIMALISASI SUHU PRODUKSI ENZIM SELULASE DARI BAKTERI SELULOLITIK YANG DIISOLASI DARI SUNGAI SIAK

Mary Rumiris, Silvera Devi, Andi Dahliaty
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau

PENDAHULUAN

Enzim selulase adalah suatu enzim yang dapat menghidrolisis ikatan β (1-4) glikosidik yang terdapat pada polisakarida selulosa menjadi molekul-molekul kecil seperti glukosa. Enzim selulase dapat diproduksi oleh mikroba selulolitik yaitu bakteri dan jamur. Bakteri yang dapat memproduksi enzim selulase antara lain *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Acetobibrio*, *Mikrobispora* dan *Streptomyces*. *Sclerotium rolfisii*, *P. Chrysosporium*, sedangkan dari golongan jamur antara lain spesies *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* dan *Penicillium*.

Penguraian selulosa oleh enzim selulase memiliki peranan yang penting karena banyak limbah pertanian yang mengandung selulosa (komponen utama dinding sel tanaman), sehingga limbah dapat diubah menjadi produk glukosa, yang kemudian dapat menjadi bahan baku untuk produksi alkohol. Untuk memaksimalkan produksi enzim ini maka perlu dilakukan optimalisasi produksi enzim selulase dari bakteri selulolitik dengan memvariasikan beberapa variabel yang dapat mempengaruhi produksi enzim selulase dari bakteri tersebut, antara lain suhu, waktu produksi, agitasi, komposisi media, dan pH. Bakteri selulolitik yang diisolasi dari sungai Siak di daerah Tandun mengandung limbah pabrik *crude palm oil* (CPO) dan limbah perkebunan kelapa sawit dan dari analisis pendahuluan ternyata bakteri hasil isolasi ini mampu menghasilkan enzim selulase. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan analisis suhu optimum untuk produksi enzim selulase oleh isolat S-22 dalam media produksi cair.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Autoklaf All American Model 1925 X/KY-23D Wisconsin Aluminium Foundry Co. Inc; pH meter 210 A orion (Orion research Inc. USA); Waterbath thermostat WK-24 (Sibata Scientific Technology Ltd); Rotary shaker (Stuart scientific Inggris); Spektrofotometer Genesis

II keluaran Milton Roy Co., USA (No. Catalog 4001/4); Laminar Flow (ESCO Micro PTE LTD HD 3); Pompa vakum β -169 (Fisher General Scientific Private Limited, Singapura); Vortex mixer Genie 2TM Cat, no 12-82; alat-alat gelas biasa digunakan di laboratorium sesuai dengan prosedur kerja.

Bahan hidup yang digunakan yaitu isolat S-22 hasil isolasi dari Daerah Aliran Sungai (DAS) Siak provinsi Riau dan menjadi koleksi Laboratorium Biokimia FMIPA UR. Sedangkan bahan kimia yang digunakan antara lain karboksi metil selulosa (CMC), agar batang dan bahan-bahan lain yang digunakan adalah bahan tingkat analisis (analytical grade), sesuai cara kerja.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dua tahap. Tahap pertama mencari suhu optimum produksi enzim selulase dalam 3 tabung (variabel suhu yaitu : 25°C, 35°C, 50°C). Setelah diketahui suhu optimum, maka suhu optimum ini digunakan untuk produksi enzim pada tahap kedua yaitu menggunakan variabel waktu produksi selama 24 jam dengan selang waktu 3 jam (variabel waktu produksi yaitu : 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 jam). Dari kedua tahap ini akan didapatkan informasi suhu dan waktu produksi optimum.

Prosedur Penelitian

Peremajaan bakteri

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat S-22 dari penelitian sebelumnya. Peremajaan isolat S-22 dilakukan dengan mengambil satu ose isolat secara aseptis dan digoreskan pada NA (*Nutrient Agar*) miring yang sudah steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Pembuatan stok inokulum

Bakteri dari 1 tabung agar miring diambil dan dimasukkan ke dalam 50 ml media NB (*Nutrient Broth*) lalu diinkubasi di dalam *waterbath shaker* dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 37°C selama 6 jam untuk digunakan sebagai starter. Bakteri yang sudah diinkubasi selama 6 jam diukur OD nya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm.

Pembuatan media produksi enzim selulase

Tabel 1. Susunan nutrisi dari medium produksi selulase (Meryandini dkk., 2009)

Susunan Nutrisi	Berat atau Volume
K ₂ HPO ₄	0,2 gram
KCl	0,04 gram
MgSO ₄	0,1 gram
FeSO ₄	0,04 gram
NaNO ₃	0.01 gram
CMC 1 %	0,2 gram

Optimalisasi suhu produksi enzim selulase dalam media produksi

Produksi enzim dilakukan pada suhu 25°C, 35°C, 50°C dengan cara yaitu 5 ml inokulum yang telah diukur OD nya, masing-masing dimasukkan dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi media fermentasi yang mengandung K₂HPO₄ 0,2 gram, KCl 0,04 gram, MgSO₄ 0,1 gram, FeSO₄ 0,04 gram, NaNO₃ 0.01 gram, CMC 1 % 0,2 gram dalam buffer fosfat 25 ml kemudian diinkubasi selama 24 jam. OD untuk ketiga tabung ini sama. Analisis aktivitas enzim masing-masing suhu inkubasi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan dengan menggunakan metode Nelson Somogyi. Dari analisis akan diperoleh aktivitas tertinggi pada suhu optimum.

Pengukuran aktivitas enzim selulase dengan metode Nelson-Somogyi

Untuk persiapan sampel, CMC (*Carboxymethyl cellulose*) 2% sebanyak 2 gram dilarutkan dalam 100 ml buffer fosfat 0,05 M pH 7 (sebagai substrat). Substrat diambil ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi, selanjutnya dimasukkan ke dalam *waterbath thermostat* (temperatur 40°C) selama 5 menit. Tanpa mengeluarkan tabung reaksi dari *waterbath* ditambahkan ml larutan enzim. Larutan diaduk (tanpa mengeluarkan dari dalam *waterbath*) dengan hati-hati setiap 5 menit, jangan sampai larutan berbusa. Inkubasi dilanjutkan selama 30 menit. Setelah 30 menit campuran dipanaskan selama 10 menit dalam air mendidih. Tutup mulut tabung reaksi dengan kelereng.

Pada kontrol, tabung reaksi kosong dimasukkan dalam *waterbath* bersamaan dengan tabung reaksi sampel. Pra inkubasi selama 5 menit tanpa mengeluarkan tabung reaksi dari *waterbath* ditambahkan ml larutan enzim. Larutan diaduk hati-hati jangan sampai larutan berbusa. Inkubasi dilanjutkan selama 30 menit. Setelah 30 menit tabung kontrol dikeluarkan dari

waterbath dan tambahkan ml substrat dan langsung dididihkan selama 10 menit dalam air. Tutup mulut tabung reaksi dengan kelereng.

Blanko disiapkan dengan memasukkan dalam tabung reaksi 2 ml larutan bufer fosfat 0,05 M (pH 7). Blanko diperlakukan dengan cara yang sama dengan sampel dan kontrol. Selanjutnya sampel, kontrol dan blanko disentrifugasi selama 25 menit. Gula pereduksi hasil reaksi diukur dengan metoda Nelson-Somogyi sebagai berikut: Larutan sampel, blanko, dan kontrol dipipet 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 1 ml reagen Nelson-Somogyi, tutup mulut tabung dengan kelereng dan letakkan dalam penangas air mendidih selama 20 menit. Kemudian dinginkan dalam air es sampai suhu tabung sama dengan suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan 1 ml reagen arsenomolibdat, tambahkan 7 ml aquades lalu diaduk dengan vortex. Serapan sampel dan kontrol diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Perhitungan aktivitas enzim

Dari data absorban yang diperoleh, dapat ditentukan konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan. Aktivitas enzim diketahui dari gula pereduksi yang dihasilkan permililiter (μmol gula pereduksi/mL menit⁻¹)

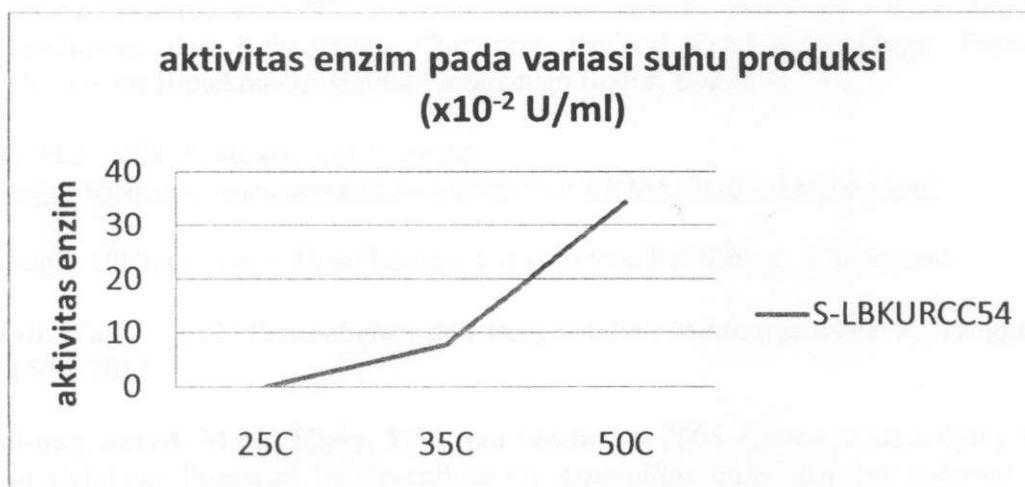
$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\mu\text{mol gula pereduksi sampel} - \mu\text{mol gula pereduksi kontrol}}{\text{Volume ekstrak enzim} \times \text{jam} \times \text{menit}}$$

Satu unit (IU) selulase adalah sejumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1,0 mikromol ($\mu\text{mol} = 10^{-6} \text{ mol}$) gula pereduksi per menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi enzim oleh mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh faktor internal (faktor genetik) dan faktor eksternal (kondisi fermentasi). Faktor eksternal tersebut antara lain suhu, pH, senyawa penginduksi, sumber karbon dan waktu produksi (Goodenough, 1989). Untuk memaksimalkan produksi enzim ini maka perlu dilakukan optimalisasi produksi enzim selulase dari bakteri selulolitik dengan memvariasikan beberapa variabel yang dapat mempengaruhi produksi enzim selulase dari bakteri tersebut, antara lain suhu, waktu produksi, agitasi, komposisi media, dan pH. Variasi suhu dan waktu produksi bakteri selulolitik diduga akan memberikan pengaruh yang berbeda terhadap produksi enzimnya. Peningkatan produksi dan aktivitas enzim dapat ditentukan dengan mengukur ekstrak kasar enzim yang terdapat dalam media produksinya menggunakan metode nelson somogyi.

Suhu pada media fermentasi salah satu faktor yang berpengaruh dalam produksi enzim (Ahmed dkk., 2009). Enzim adalah suatu protein, maka kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi, sehingga bagian aktif enzim akan terganggu dan dengan demikian aktivitas enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya pun akan menurun (Poedjaji, 1994). Hasil uji aktivitas untuk optimalisasi suhu tertinggi dimulai dari suhu 50°C yaitu sebesar $3435 \times 10^{-4} > \text{suhu } 35^\circ\text{C } 779 \times 10^{-5}$, sedangkan pada suhu 25°C tidak ada aktivitas enzim (Gambar 1). Suhu memainkan peranan yang sangat penting dalam reaksi enzimatik. Ketika suhu bertambah sampai suhu optimum, kecepatan reaksi enzim naik karena energi kinetik bertambah. Bertambahnya energi kinetik akan mempercepat gerak vibrasi, translasi, dan rotasi baik enzim maupun substrat. Hal ini akan memperbesar peluang enzim dan substrat bereaksi. Ketika suhu lebih tinggi dari suhu optimum, protein berubah konformasi sehingga gugus reaktif terhambat. Perubahan konformasi ini dapat menyebabkan enzim terdenaturasi. Substrat juga dapat berubah konformasinya pada suhu yang tidak sesuai, sehingga substrat tidak dapat masuk ke dalam sisi aktif enzim. Enzim yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 50°C disebut termozim. Oleh karena itu selulase yang dihasilkan isolat S-16 termasuk termozim (Meryandini, 2009).



Gambar 1. Hubungan antara aktivitas enzim dan suhu produksi

UCAPAN TERIMA KASIH

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

- Ahmed, Sibtain., Bashir, Ammara., Saleem, Huma., Saadia, Mubshara., Jamil, Amer. 2009. Production and Purification of Cellulose Degrading Enzymes from A Filamentous Fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal Botany* 41(3): 1411-1419.
- Anonim. 2012. Produksi Enzim Selulase dari Jerami Padi.
http://eprints.undip.ac.id/13064/1/BAB_I_-_V.pdf. Tanggal akses 15/01/2012.
- Ashory, Anggraeni., Fitriany, Faujiah., Sendy, Febrianto. 2011. Media Pertumbuhan Bakteri Bernutrisi Tinggi dari Limbah Hasil Perikanan. PKM-GT. IPB, Bogor.
- Black, Jacquelyn G. 1999, *Microbiology, Principles and Explorations*, Pretince Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Buckle. K. A., Edwards, R. A., Fleet, G. H., dan Wobtoon, M. 1985. Ilmu Pangan. Terjemahan Hari Purnomo dan Adiono. UI Press, Jakarta.
- Darwis, A.A., Sukara, E. 1990. *Isolasi, Purifikasi dan karakterisasi Enzim*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Farabeel. M.J, 2008, Reactions and Enzymes,
<http://www.emc.maricopa.edu/faculy/farabee/BIOBK/BioBookEnzym.html>.
- Goodenough. 1989. *Genetics*. Third Edition, CBS Colloge Publishing, Washington.
- Hamdiyati, Yanti. 2012. Pertumbuhan dan Pengendalian Mikroorganisme II. Tanggal akses 15/01/2012.
- Ikram-ul-haq, Javed, M.M., Khan, T.S., dan Siddiq, Z. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Celulases Produced by Co-culture Of *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viridae*. *Res. Journal of Agriculture & Biology. Sci.* 1 (3): 241-245.
- Lamiya., & Mareta. 2012. Laporan Final.
http://eprints.undip.ac.id/11310/1/Laporan_final_Lamiya%26Mareta.pdf. Tanggal akses 15/01/2012
- Lehninger, A.L. 1995. Dasar-dasar Biokimia I. Erlangga. Jakarta.

- Meryandini, A., Wahyu, W., Besty, M., Titi, C.S., Nisa, R., dan Hasrul, Satria. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Jurnal Sains*. 33-38.
- Page, D. S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Terjemahan; R. Soendoro. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Pathak, A.N dan Ghose, T.K. 1973. Enzymatic Activity of Fungi. *Journal Biochem*. 8:35.
- Pelzcar, M.j, Chan, E.C.S. 1988. Dasar- dasar mikrobiologi 2, Terj. Ratna Sri Hadioetomo, UI Press, Jakarta.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press, Jakarta.
- Supiandi, J. 1995. Produksi Enzim Kitinase dan Selulase *Trichoderma* sp. Isolat Perkebunan Lada Di Lampung. Skripsi. FMIPA-UNRI, Pekanbaru.
- Volk, W.A dan Wheeler, M.F. 1993. Mikrobiologi Dasar. Terjemahan Markam. Erlangga , Jakarta.
- Winarno, F. G. 1995. Kimia Pangan dan Gizi. Penerbit PT. Gramedia, Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 1989. Biokimia, Protein, Enzim, dan Asam Nukleat. ITB, Bandung.
- Yinbo, Q., Zhu, M., Liu, K., Bao, X., Lin, J. 2006. Studies on cellulosice ethanol production for sustainable supply of liquid fuel in China. *J. Biotechnol*. **1 (11)** : 1235-1240.