Optimalisasi Komposisi Media dan Konsentrasi Sumber Karbon untuk Produksi Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Strain Lokal Selulolitik LBKURCC54 dan LBKURCC55

Fajra Latifa Rahmi[1*], Andi Dahliaty[2], Silvera Devi[1]

[1]*Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau 28293

ABSTRACT

Isolates of S-16 and S-22 are some of the local strains producing cellulases that have been isolated from the Siak River water. Cellulase enzyme can be degrades of cellulosewaste containing that enable for the processing of waste to economically priced products such as glucose. In this research, optimization of the production of cellulase enzymes from isolates of S-16 and S-22 with a variety of media composition, temperature and concentration of carbon source production. The quantitative assay for enzyme activity was determined by Nelson Somogyi method with carboxymethyl of cellulose (CMC) as a substrate. The highest cellulase enzyme activity of S-16 obtained in a media production (KH2PO4; MgSO4.7H2O; NaNO3; CaCl2; NaCl; CMC) of 88x10-3 U / mL, and the optimum concentration of source of carbon at 1% obtained for 50.36 x10-3 U / mL, whereas of S-22 obtained in a media production (KH2PO4; MgSO4.7H2O; FeSO4.7H2O; NaNO3; KCl; CMC) of 14x10-3 U / mL, and the optimum concentration of sources of carbon at 1% obtained for 14 , 7x10-3 U / mL. Comparison of cellulase enzyme activity of isolate S-16 and S-22 by using Duncan test multiple range at level 5%.

Keywords: *Cellulosa, Cellulase,Carboxymethil Cellulosa*

ABSTRAK

Isolat S-16 dan S-22 merupakan beberapa strain lokal penghasil selulase yang telah diisolasi dari air Sungai Siak. Enzim selulase dapat mendegradasi limbah yang mengandung selulosa sehingga dapat dimanfaatkan untuk pengolahan limbah menjadi produk yang bernilai ekonomis misalnya glukosa. Pada penelitian ini dilakukan optimalisasi produksi enzim selulase dari isolat S-16 dan S-22 dengan variasi komposisi media,konsentrasi sumber karbon dan suhu produksi. Uji kuantitatif untuk aktivitas enzim ditentukan dengan metode Nelson Somogyi dengan karboksimetil selulosa (CMC) sebagai substrat. Aktivitas enzim selulase tertinggi dari S-16 diperoleh dalam media produksi (KH_2PO_4; $MgSO_4.7H_2O$; $NaNO_3$; $CaCl_2$; NaCl; CMC) sebesar $88x10^{-3}$ U/mL dan konsentrasi sumber karbon 1% sebesar $50,36x10^{-3}$ U/mL, sedangkan dari isolat S-22 diperoleh dalam media produksi (KH_2PO_4; $MgSO_4.7H_2O$; $FeSO_4.7H_2O$; $NaNO_3$; KCl; CMC) sebesar $14x10^{-3}$ U/mL dan konsentrasi sumber karbon 1% sebesar $14,7x10^{-3}$ U/mL. Perbandingan aktivitas enzim selulase dari isolat S-16 dan S-22 dengan menggunakan uji Duncan jarak berganda pada taraf 5%.

Kata kunci: *Selulosa, Selulase,Karboksimetil Selulosa*

PENDAHULUAN

Selulosa dapat dihidrolisis oleh enzim selulase yang merupakan multienzim yaitu Endo-1,4-β-D-glukanase, Ekso-1,4-β-D-glukanase dan β–glukosidase. Aktivitas yang sinergis dari ketiga enzim ini membantu merusak struktur selulosa dengan cara melemahkan ikatan-ikatan hidrogen sehingga mengakibatkan penguraian sempurna selulosa menjadi glukosa (Meryandini dkk., 2009). Selulase dapat dihasilkan oleh mikroba dan juga tanaman. Beberapa mikroba (bakteri) yang diketahui berpotensi menghasilkan selulase adalah *Pseudomonas, Cellumonas, Basillus, Micrococcus, Cellovibrio*, dan *Sporosphytophaga* (Usama dkk, 2008).

Penguraian selulosa oleh enzim selulase memiliki peranan yang penting karena banyak limbah pertanian yang mengandung selulosa (komponen utama dinding sel tanaman), yang dapat diubah menjadi produk glukosa, yang kemudian dapat menjadi bahan baku untuk produksi alkohol (Yinbo dkk., 2006).

BAHAN DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan adalah Isolat S-16 dan S-22, CMC (*Carboxymethyl cellulose*), Nutrient agar, Nutrient Broth, dan pengukuran serapan sinar tampak digunakan Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer. Media selektif 100 mL $FeSo_4.7H_2O$ 0,0005 g; KNO_3 0,01875 g; $MgSO_4.7H_2O$ 0,005 g; $CaCl_2$ 0,001 g; KH_2PO_4 0,0125 g; CMC 0,25 g.(Komposisi media I). KH_2PO_4 0,1 g; Na_2CO_3 0,1 g; $MgSO_4.7H_2O$ 0,029 g; Pepton 0,5 g; CMC 0,1 g.(Komposisi media II). KH_2PO_4 0,1 g; $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 g; KCL 0,2 g; $FeSo_4.7H_2O$ 0,02 g; $NaNO_3$ 0,5 g; CMC 1 g.(Komposisi media III).KH_2PO_4 0,5 g; $MgSO_4.7H_2O$ 0,25 g; $NaNO_3$ 0,25 g; $CaCl_2$ 0,1 gram; NaCl 0,2 gram; CMC 0,2 g.(Komposisi media IV).

Peremajaan isolat bakteri selulolitik dilakukan dengan mengambil satu ose isolat secara aseptis dan ditanam pada *Nutrient Agar* (NA) miring yang 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.

Media selektif yang tertera di atas menunjukkan susunan nutrisi dari media cair untuk produksi enzim selulase. Semua bahan mineral dicampurkan dalam 100 mL dapar fosfat. Media ini dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL. Pada media ditambahkan CMC

(karboksi metil selulosa), kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 15 lb, 121^{0}C selama 20 menit. Media siap ditanami apabila tidak ada tanda-tanda kontaminasi setelah diinkubasi satu malam pada suhu kamar.

Isolat S-16 dan S-22 yang terdapat pada nutrient broth yang sudah dihitung OD nya diinokulasi ke dalam masing-masing media cair produksi enzim. Volume inokulum (10%) yang ditambahkan disetarakan untuk semua pengulangan kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan suhu 37^{0}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. Supernatan dipisahkan dengan penyaringan melalui *filter glass fiber* (Whatman GF/C). Jika enzim tidak langsung digunakan, filtrat steril berupa 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*.

Setelah didapatkan media yang paling optimum untuk menghasilkan enzim selulase, selanjutnya dilakukan optimalisasi konsentrasi sumber karbon yaitu CMC (karboksi metil selulosa) dengan variasi konsentrasi (0%; 0,25%; 0,5%; 1,0%; 1,5%) yang dimasukkan kedalam 5 erlenmeyer. Masing-masing inokulum (10%) dengan OD yang sama ditambahkan ke 100 ml media produksi optimum kemudian diinkubasi pada *shaker inkubator* dengan suhu 37^{0}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. Supernatan dipisahkan dengan penyaringan melalui *filter glass fiber* (Whatman GF/C). Jika enzim tidak langsung digunakan, filtrat steril berupa 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 ekstrak kasar enzim selulase ditentukan dengan metode Nelson-Somogyi (Green III dkk., 1989). Aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah gula pereduksi yang dilepaskan oleh kerja enzim per satuan waktu. Uji aktivitas enzim menggunakan 1 mL larutan CMC 2% yang dilarutkan dengan dapar 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 μmol gula pereduksi permenit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimalisasi produksi enzim selulase dari S-16 dan S-22 dengan variasi komposisi media (media I,media II,media III dan media IV) dan konsentrasi sumber karbon (0%, 0,25%, 0,5%, 1%, 1,5%) serta variasi suhu (25□C, 35□C, 50□C) menggunakan suhu 37^0C dan waktu produksi enzim 24 jam. menggunakan suhu 37^0C dan waktu produksi enzim 24 jam.

Penentuan aktivitas enzim selulase. Perbedaan spesies akan berpengaruh terhadap jumlah dan aktivitas enzim. Selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan di dalam sel lalu diekskresikan ke medium tumbuhnya yaitu media yang mengandung selulase. CMC digunakan sebagai sumber substrat pada media fermentasi untuk uji enzim.Ekstrak kasar enzim selulase diisolasi dari media produksi enzim yang mengandung selulosa sebagai substrat dan dilakukan penyaringan dengan kertas saring Whatmann GF/C untuk memisahkan filtrat dengan endapan yang ada di dalam media.

Aktivitas selulolitik diinduksi dalam media pertumbuhan dengan adanya CMC sebagai sumber karbon. Adanya nilai aktivitas enzim selulase yang dihasilkan dilihat dari kadar gula pereduksi yang ditentukan dengan metode Nelson-Somogyi. Rata-rata aktivitas enzim yang dihasilkan dari kedua isolat tidak berbeda secara nyata ($p \leq 0,05$) berdasarkan uji Duncan jarak berganda pada variasi komposisi media isolat S-16 dan berbeda secara nyata ($p \geq 0,05$) pada variasi konsentrasi sumber karbon.

Hasil uji Duncan menunjukkan aktivitas enzim selulase pada variasi komposisi media dari isolat S-16 tertinggi dimulai dari media IV yaitu sebesar 88×10^{-3} U/mL > media I 40,3x10-3 U/mL > media III 21×10^{-3} U/mL > media II 94×10^{-3} U/mL. Pada variasi konsentrasi sumber karbon tertinggi dimulai pada konsentrasi 1% yaitu sebesar $50,36 \times 10^{-3}$ U/mL > konsentrasi 1,5% yaitu $31,21 \times 10^{-3}$U/mL > konsentrasi 0,5% yaitu $20,7 \times 10^{-3}$ U/mL > konsentrasi 0,25% yaitu 19×10^{-3} U/mL > konsentrasi 0% tidak ada aktivitas.

Hasil uji Duncan dari isolat S-22 tertinggi dimulai dari media III yaitu sebesar 14×10^{-3} U/mL > media II yaitu sebesar $12,3 \times 10^{-3}$ U/mL dan media I dan media IV tidak memiliki

aktivitas. Pada variasi konsentrasi sumber karbon yang tertinggi dimulai dari konsentrasi 1% yaitu sebesar 14,7x10-3 U/mL > konsentrasi 1,5% yaitu $12,2x10^{-3}$ U/mL > konsentrasi 0,5% yaitu $44x10^{-4}$ U/mL, sedangkan pada konsentrasi 0% dan 0,25% tidak ada aktivitas enzim. Adanya perbedaan dari kedua isolat, menunjukkan kemampuan isolat S-16 lebih tinggi dalam menghasilkan enzim selulase dibanding isolat S-22 sehingga memungkinkan kemampuan isolat S-16 akan lebih baik untuk penggunaan lebih lanjut.

KESIMPULAN

Aktivitas enzim selulase tertinggi dari isolat S-16 diperoleh dari media IV sebesar $88x10^{-3} \pm 39,6x10^{-4}$ U/mL sedangkan dari isolat S-22 diperoleh dalam media produksi III sebesar $14x10^{-3} \pm 50,37x10^{-3}$ U/mL. Aktivitas enzim selulase tertinggi dari isolat S-16 dalam media produksi dengan sumber karbon CMC konsentrasi 1% sebesar 50,3x10-3 ± $0x10^{-3}$ U/mL sedangkan dari isolat S-22 dalam media produksi dengan sumber karbon CMC konsentrasi 1% sebesar $14,7x10^{-3} \pm 39,25x10^{-3}$ U/mL. Kedua isolat menggunakan konsentrasi yang sama yaitu 1% tetapi aktivitas enzim yang tertinggi diperoleh dari isolat S-16.

DAFTAR PUSTAKA

Ali Usama F., Hala Sm Saad El-Dein. 2008. Production And Partial Purification Of Cellulase Complex By *Aspergilus niger* and *A. nidulans* Grown On Mater Hiacinth Blend. *Jurnal of Applied Scinces Research*, 4 (7): 875-891.

A. Prabowo, S. Padmowijoto, Z. Bachrudin , dan A. Syukur. 2007. Potensi Mikrobia Selulolitik Campuran Dari Ekstrak Rayap, Larutan Feses Gajah Dan Cairan Rumen Kerbau. *J.Indon.Trop.Anim.Agric.* 32 (3). Diakses tanggal: 25 Januari 2012.

Berg, J. M., Tymoclezko, J. L. and Sheyer, L. 2007. *Biochemistry. Sixth edition.* W. H. Freeman & Co., New York.

Buckle. K. A., Edwards, R. A., Fleet, G. H., dan Wobtoon, M. 1985. *Ilmu Pangan.* Terjemahan Hari Purnomo dan Adiono. UI Press, Jakarta.

Eida, M. F., Nagaoka, T., Wasaki, J., Kouno, K. 2011. Isolation and Characterization of Cellulose-decomposing Bacteria Inhabiting Sawdust and Coffee Residue Compost. *Microbes Environ.* 26: 220-227.
Diakses tanggal: 5 Februari 2012

Endriani, S. 1995. Isolasi Enzim Polifenol Oksidase Dari Nenas (*Ananas Comosus L MERR*). *Skripsi S-1*. Jurusan Kimia FMIPA UNRI, Pekanbaru.

Fitriani, N. 1996. Hidrolisa Enzimatis Ampas Tapioka (Onggok) Untuk Produksi Glukosa. *Skripsi S-1*. Jurusan Kimia FMIPA UNRI, Pekanabru.

Ginting, P. 2001. Optimalisasi pH, Suhu, Dan Waktu Inkubasi Proses Likuifikasi Pati Ganyong (*Canna edulis Ker*) Menggunakan Enzim α-Amilase. *Skripsi*. FMIPA. UR. Pekanbaru.

Goodenough. 1989. *Genetics*. Third Edition, CBS College Publishing, Washington.

Gupta, P., Samant, K., Sahu, A. 2012. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of their Cellulolytic Potential. *International Journal of Microbiology*; 2012: 578925.

Hidayat, N., Padaga, M.C. dan Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. ANDI, Yogyakarta.

Huang, S., Sheng, P., dan Zhang.,H. Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). 2012. Int J Mol Sci.; 13(3): 2563–2577.
Diakses tanggal: 5 Februari 2012.

Jahangeer, S., Nazia. K., Saman., Muhamad. S., Saleem. S., Aqeel. A., Shakeel. A.K, 2005. Screening and Characterization of Fungal Cellulase Isolated From The Native Enviromental Source. *Pak. J. Bot*.,(3):739-748.

Lehninger, A. L. 1998. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid 1. Penerbit Erlangga, Jakarta.

Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, C.S., Rachmania, N., Satria, H. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik Dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Sains*, Vol. 13(1): 33-38.
Diakses tanggal: 24 Januari 2012.

Nugroho, T.T., Devi, S., Chainulfifah., Dahliaty, A. 2007. *Penuntun Praktikum Biokimia Dasar*. FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru.

Page, D. S. 1997. *Prinsip-prinsip Biokimia*. Terjemahan R. Soendoro. Penerbit Erlangga. Jakarta.

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.

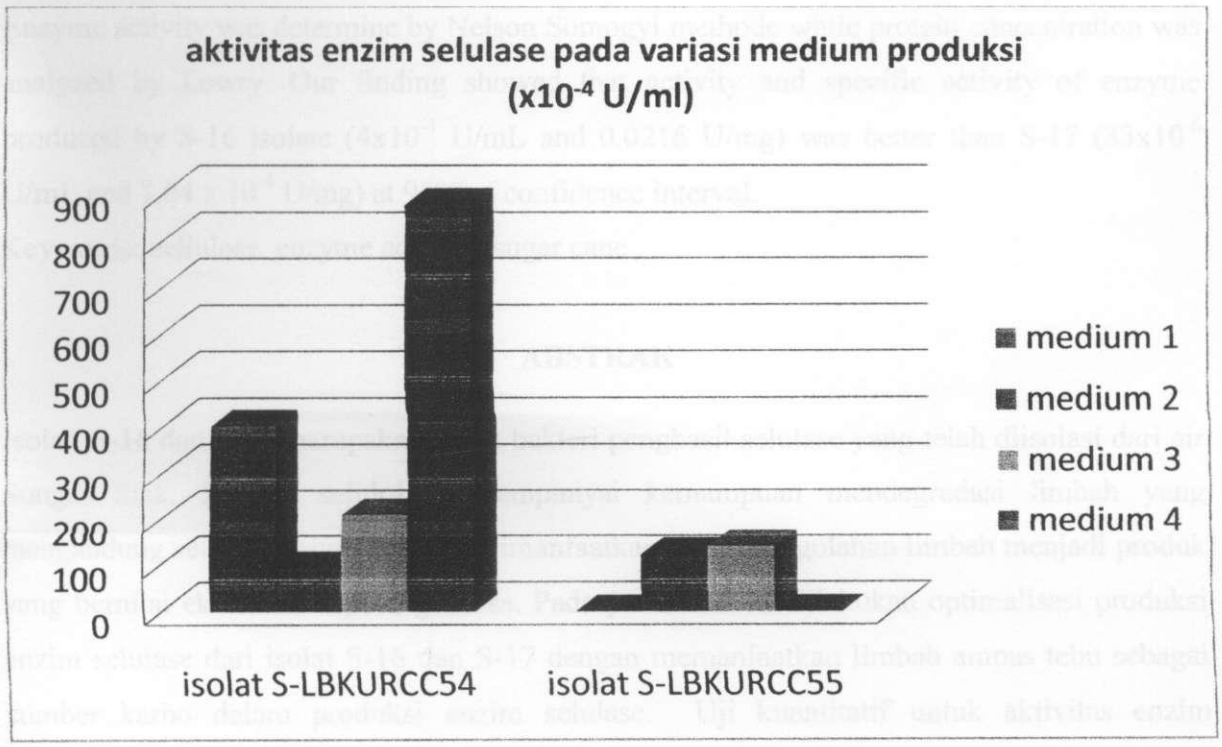
Pratiwi, Silvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga, Jakarta.

Rivai, Harizul. 1995. *Asas Pemeriksaan Kimia*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.

Schlegel, H.G., Schmidt, K. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Terjemahan RMT Baskoro. UGM Press. Yogyakarta.

Smith, J.E. 1993. *Prinsip Bioteknologi*. Penerbit PT Gramedia Pustaka Umum, Jakarta.

Volk, W.A., Wheeler, M.F. 1993. *Mikrobiologi Dasar. Edisi kelima. Jilid 1*. Adisoemaro, S., Editor., Markahm, Penerjemah. Erlangga, 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.