

OPTIMALISASI PRODUKSI ENZIM SELULASE BAKTERI SELULOLITIK DENGAN MEMANFAATKAN LIMBAH AMPAS TEBU SEBAGAI SUBSTRAT

H. Suri¹, C. Jose², Y. Haryani²

¹Mahasiswa Program Studi S1 Kimia

²Bidang Biokimia Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia

helvetia.suri@gmail.com

ABSTRACT

The S-16 and S-22 cellulolytic bacterias isolated from Siak River water were used in this study to produce cellulase using sugarcane bagasse. Sugarcane bagasse contains \pm 50% cellulose that can be used as a substrate in the production of cellulase. Cellulase is an enzyme that catalyses the hidrolisis of β -1-4-glycosidic bond of cellulose. The objectives of this study were to determine the optimum concentration of sugarcane bagasse (0.25%, 0.5%, 1.0% and 1.5%) The results indicated that 1% bagasse substrate with 24 hours of production time gave the optimum enzyme activity. The enzyme activity of S-16 and S-22 were $0,000233 \pm 0,00091$ U/mL and $0,01259 \pm 0,00042$ U/mL.

Keywords: cellulolytic bacteria, Cellulase activity, Sugarcane bagasse

ABSTRAK

Isolat S-16 dan S-22 merupakan bakteri selulolitik yang diisolasi dari air Sungai Siak. Pada penelitian ini produksi enzim selulase dari isolat S-16 dan S-22 menggunakan limbah ampas tebu. Ampas tebu mengandung \pm 50% selulosa sehingga dapat digunakan sebagai media dalam produksi enzim selulase. Selulase adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan β -1-4-glikosidik dalam selulosa. Pada penelitian ini dilakukan penentuan konsentrasi optimum (0,25; 0,5; 1,0; and 1,5) (% $\frac{b}{v}$) . Dari hasil menunjukkan konsentrasi substrat ampas tebu 1% dengan waktu produksi 24 jam memberikan aktivitas optimum untuk S-16 sebesar $0,000233 \pm 0,00091$ U/mL dan S-22 sebesar $0,01259 \pm 0,00042$ U/mL.

Kata Kunci : Bakteri selulolitik, Aktivitas Selulase, Tebu

PENDAHULUAN

Isolat S-16 dan S-22 merupakan bakteri selulolitik yang diisolasi dari Sungai Siak di daerah Tandun (Siagian, 2012). Di daerah ini terdapat perkebunan kelapa sawit dan pabrik *Crude Palm Oil* (CPO) yang menghasilkan limbah dan terbuang ke badan sungai (Irawan dkk., 2008). Keberadaan limbah selulosa di sungai menyebabkan hidupnya mikroorganisme selulolitik yang dapat memanfaatkan limbah tersebut sebagai

sumber karbon untuk pertumbuhannya. Bakteri selulolitik ini merupakan kelompok bakteri yang dapat menghasilkan enzim selulase karena kemampuannya mendegradasi selulosa yang terdapat dalam media pertumbuhannya (Amini, 1997).

Selain waktu fermentasi, produksi enzim selulase dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi substrat. Ampas tebu berpotensi menjadi substrat bagi bakteri selulolitik untuk menghasilkan enzim selulase. Ampas tebu diketahui mengandung 50% lebih serat dan mengandung kadar selulosa yang cukup tinggi dan zat mineral lainnya yang terkandung dalam ampas tebu sehingga selulosanya dapat digunakan sebagai sumber energi dan nutrisi mikroorganisme. Ampas tebu ini mudah didapat dari pedagang es tebu di kota Pekanbaru dan dibuang sebagai limbah. Pada penelitian ini akan dilakukan optimalisasi produksi enzim selulase dari isolat selulolitik yang diisolasi dari Sungai Siak dengan memanfaatkan limbah ampas tebu sebagai substratnya.

METODE PENELITIAN

a. Pembuatan tepung dari ampas tebu

Ampas tebu diambil dari tiga pedagang es tebu yang berbeda disortir, diambil yang bagus yang tidak ada bercak merah, jamur, dan gangguan lainnya. Selanjutnya ampas tebu dipotong-potong kecil dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40 °C selama 24–48 jam. Setelah kering (massa ampas berbentuk seperti kerupuk), ampas tebu digiling sampai ukurannya lolos pada ayakan 100 mesh. Kemudian dianalisis kadar glukosa dengan metode Nelson-Samogyi. Setelah diketahui ampas tebu dengan kadar glukosa terendah yang selanjutnya digunakan dalam optimalisasi konsentrasi substrat dan waktu produksi.

b. Peremajaan Bakteri

Isolat bakteri S-16 dan S-22 dari stok *nutrient agar* (NA) diambil dengan ose secara aseptis, diinokulasikan pada media *nutrient broth* (NB), lalu diinkubasi selama ± 24 jam dalam *shaker incubator* dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 37°C . Selanjutnya inokulum tersebut diukur kekeruhan sel bakterinya atau *optical density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm.

c. Pembuatan media cair untuk produksi enzim selulase

Bahan yang digunakan untuk media produksi enzim selulase dari isolat selulolitik sesuai dengan media Gupta dkk. (2012) yang dimodifikasi dengan sumber karbon lain : KH_2PO_4 0,05 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g; NaNO_3 0,025 g; CaCl_2 0,005 g; NaCl 0,02 g; Ampas tebu 0,25 g. Semua bahan mineral dilarutkan ke dalam 100 ml buffer fosfat 0,05 M pH 7, kemudian disterilisasikan dengan autoklaf pada tekanan 15lb, 121°C selama 20 menit. Media siap diinokulasi apabila tidak ada tanda-tanda kontaminasi setelah diinkubasi selama satu malam pada suhu kamar.

d. Optimalisasi Konsentrasi Sumber Karbon produksi selulase

Inokulum isolat S-16 dan S-22 sebanyak 10% dimasukkan masing-masing ke dalam media cair produksi enzim 100 mL kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan suhu 25°C selama 24 jam dengan variasi konsentrasi substrat ampas tebu (0,25%, 0,5%, 1%, dan 1,5%). Ekstrak kasar enzim selulase yang terdapat dalam media

dipisahkan dari sel isolatnya dengan menggunakan sentrifugasi dalam keadaan dingin dengan kecepatan 9500 rpm selama 10 menit. Sebelum sentrifugasi, media kultur berisi enzim tersebut didinginkan pada suhu 10°C selama kurang lebih 1 jam. Supernatan disaring dan jika enzim tidak langsung digunakan untuk analisis aktivitas enzim, kemudian ditambahkan NaN₃ sebanyak 0,02% (b/v) ke dalam setiap larutan supernatant. Aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dianalisis dengan menggunakan substrat Ampas tebu 1% suhu 40°C, pH 7, kemudian konsentrasi glukosa yang dihasilkan dari aktivitas enzim selulase ditentukan dengan metode Nelson-somogyi

e. Penentuan aktivitas enzim selulase

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 suspensi ampas tebu 1% yang dilarutkan dengan buffer fosfat 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 fosfat pada pH 7 (0,05 M).

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim} &= \frac{\mu\text{mol gula pereduksi sampel} - \mu\text{mol gula pereduksi kontrol}}{\text{volume ekstrak enzim} \times \text{waktu inkubasi}} \\ &= \frac{X \mu\text{mol gula pereduksi}}{\text{mL. menit}} \\ &= X \text{ unit/ml ekstrak kasar enzim} \end{aligned}$$

Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang melepaskan 1 μmol gula pereduksi permenit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Penentuan kandungan kadar glukosa pada ampas tebu

Analisis kandungan kadar glukosa pada ampas tebu ditentukan menggunakan metoda Nelson-Somogyi dan hasilnya ditunjukkan pada Tabel 1. Analisis glukosa menunjukkan bahwa pada limbah masih mengandung glukosa terlarut dengan konsentrasi yang berbeda. Hal ini disebabkan karena tebu yang didapat berbeda jenis, mengandung kadar glukosa yang berbeda dan cara ekstrak air tebu yang berbeda.

Tabel 1 : Kadar glukosa pada ampas tebu

Pedagang Es Tebu	Konsentrasi Substrat	Kadar Glukosa (μg/mL)
P1	0,2%	11,705
P2	0,2%	14,193
P3	0,2%	23,686

Ampas tebu yang digunakan untuk optimalisasi produksi enzim selulase adalah ampas tebu dari pedagang es tebu 1 yang memiliki kadar glukosa terendah.

b. Optimalisasi konsentrasi substrat ampas tebu

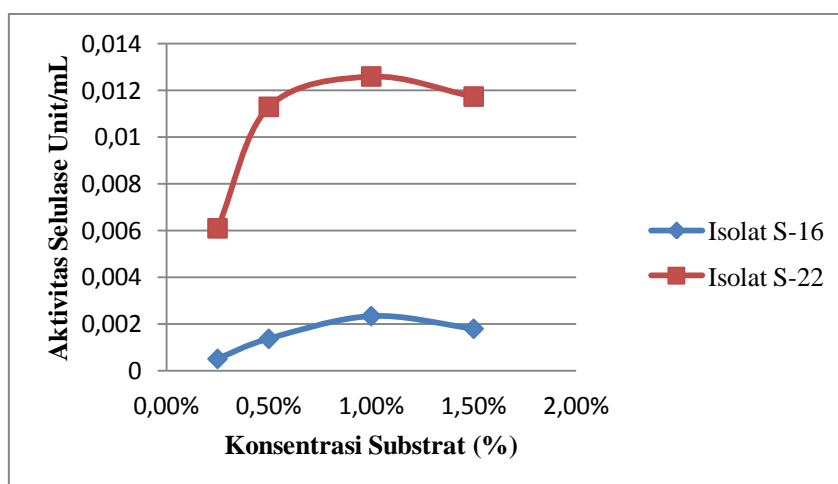
Optimalisasi produksi enzim selulase dari isolat bakteri selulolitik S-16 dan S-22 dengan variasi konsentrasi sumber karbon ampas tebu (0,25%, 0,5%, 1% dan 1,5%)(^b/_v) pada suhu 25°C selama 24 jam dapat dilihat hasilnya pada Tabel 2.

Tabel 2 : Variasi konsentrasi sumber karbon ampas tebu terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolat bakteri selulolitik S-16 dan S-22.

Variasi konsentrasi Substrat	Aktivitas Enzim Selulase * (U/mL)	
	Isolat S-16	Isolat S-22
0,25%	0,00050 ± 0,00023 ^a	0,00609 ± 0,00287 ^a
0,50%	0,00136 ± 0,00069 ^{ab}	0,01129 ± 0,00028 ^b
1,00%	0,00233 ± 0,00091 ^b	0,01259 ± 0,00042 ^b
1,50%	0,00179 ± 0,00115 ^{ab}	0,01173 ± 0,00057 ^b

Catatan :*) nilai rata-rata aktivitas selulase dari tiga kali pengulangan. Pangkat huruf menyatakan tidak berbeda nyata pada tingkat 5% (p≥0,05) berdasarkan uji Duncan jarak berganda

Isolat bakteri S-16 dan S-22 menghasilkan aktivitas enzim selulase yang cukup baik pada konsentrasi 1,0%, walaupun pada perlakuan konsentrasi 1,0% tidak terlihat perbedaan yang nyata terhadap konsentrasi 0,5% dan 1,5%. Aktivitas ekstrak kasar enzim selulase menunjukkan perbedaan yang signifikan (p<0,05) antara konsentrasi 0,25% dan 1,0%. Grafik optimalisasi konsentrasi sumber karbon ampas tebu dapat dilihat pada Gambar 1. Dari grafik menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulase meningkat dari konsentrasi 0,25% sampai konsentrasi substrat optimum 1,0%, setelah itu aktivitas enzim selulase menurun jika konsentrasi substrat semakin besar.



Gambar 1. Hubungan konsentrasi sumber karbon dengan produksi enzim selulase dari isolat bakteri selulolitik S-16 dan S-22

Gambar 1. menunjukkan bahwa Perubahan konsentrasi substrat ampas tebu berhubungan terhadap kecepatan reaksi enzimatik. Besarnya kecepatan reaksi enzimatik hampir sebanding dengan kenaikan konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat rendah kecepatan reaksi relatif rendah dan pada konsentrasi substrat tinggi kecepatan reaksi enzimatik pun berjalan cepat. Pada konsentrasi optimum, semua enzim telah jenuh dengan substrat sehingga penambahan substrat tidak akan meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik dan dapat menurunkan aktivitas enzim. Hal ini berhubungan dengan kemampuan bakteri dalam mendegradasi selulosa yang terdapat pada ampas tebu untuk ketersediaan sumber karbon selama pertumbuhan bakteri dalam media produksi enzim.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kedua isolat bakteri selulolitik S-16 dan S-22 mampu mendegradasi substrat limbah ampas tebu. Isolat ini memiliki aktivitas optimum selulase yang diperoleh dari media produksi dengan konsentrasi substrat ampas tebu 1,0% pada suhu 25°C selama 24 jam dengan aktivitas S-16 sebesar $(0,00233 \pm 0,00091)$ U/mL dan S-22 $(0,01259 \pm 0,00042)$ U/mL.

Pada penelitian ini, isolat bakteri selulolitik S-16 dan S-22 mampu mendegradasi substrat selulosa dari limbah ampas tebu dengan aktivitas selulase yang cukup baik. Melalui penelitian ini, penulis menyarankan penelitian lebih lanjut untuk dapat dilakukan identifikasi spesies dari masing-masing isolat bakteri selulolitik tersebut. Optimalisasi produksi selulase dengan memanfaatkan limbah pertanian yang bervariasi sebagai sumber karbon perlu juga diteliti lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dana Penelitian Berbasis Lab DIPA Universitas Riau dengan nomor kontrak 15/UN19/2012 a.n. Laboratorium Biokimia yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, R. R., Griffiths, J. M. 1993. *Basic Biochemical Methods*. Willey-Liss, New York
- Clark, J. M., Switzer, R. L. 1977. *Experimental Biochemistry*. 2nd edition. WH. Freeman & Co. San Fransisco.
- Martins IM, Cortés JCG, Munoz J, Moreno MB, Ramos M, Clemente-Ramos JA. 2011. Differential activities of three families of specific $\beta(1,3)$ glucan synthase inhibitors in wild-type and resistant strains of fission yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 5(286): 3484-3496.
- Shakar, A., Mariappan, V., Isaiarasu, L. 2011. Screening Cellulolytic Bacteria from The Mid-Gut of The Popular Composting Earthworm, *Eudrilus Eugeniae* (Kinberg). *World Journal of Zoology* 6(2): 142-148

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