

UJI AKTIVITAS ENZIM SELULASE ISOLAT BAKTERI DARI SEDIMEN LAMUN PERAIRAN RENDANI MANOKWARI

The Test of Cellulase Enzyme Activity of Isolate Cellulolytic Bacteria from Seagrass Sediment, Rendani Manokwari

Tirzah E. Bandi, Hermawaty Abubakar, Rina A. Moge^a*

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Papua Manokwari, Manokwari 98314, Indonesia

*Korespondensi: rinamogea@gmail.com

ABSTRACT

Indonesia has the potential of renewable natural resource which are abundant both in number and types of plants containing cellulose fiber. In nature cellulose cannot be completely degraded because it needs of microorganisms such as fungi and bacteria which will produce cellulase enzymes so that it can degrade cellulose in nature. The purpose of this study was to analyse the activity of cellulase enzymes produced by bacterial isolates obtained from seagrass sediments. Cellulase activity of 11 bacterial isolates was determined by the cellulosic index value passing through the Congo Red staining method on 1% CMC solid media. A total of seven isolates indicated a positive result and the highest index value was produced by SI-E isolates, that is 4.7 mm. After that the value of cellulase enzyme activity from the seven positive isolates was determined by counting substrate reducing sugars through the 3,5-dinitrosalicylic (DNS) method. The results showed that SI-H isolates had the highest activity of 0.071 U/mL.

ABSTRAK

Indonesia memiliki potensi berupa sumber daya alam terbarukan yang melimpah baik dalam jumlah maupun jenis tumbuhan yang mengandung serat selulosa. Di alam selulosa tidak dapat terdegradasi secara sempurna oleh karena itu dibutuhkan bantuan mikroorganisme seperti jamur dan bakteri yang akan menghasilkan enzim selulase sehingga dapat mendegradasi selulosa yang berada di alam. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh isolat bakteri yang digunakan. Aktivitas selulase dari 11 isolat bakteri ditentukan dengan nilai indeks selulolitik melalui metode pewarnaan merah kongo pada media padat CMC 1%. Sebanyak tujuh isolat yang menandakan hasil positif dan nilai indeks tertinggi dihasilkan oleh isolat SI-E yaitu 4.7 mm. Setelah itu nilai aktivitas enzim selulase dari ketujuh isolat positif ditentukan dengan menghitung gula pereduksi substrat melalui metode 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Hasil menunjukkan isolat SI-H memiliki aktivitas tertinggi yaitu 0.071 U/mL.

Keywords: Cellulase, Enzyme, Bacteria, Sedimen, Lamun

PENDAHULUAN

Selulosa dapat dihidrolisis secara enzimatis oleh enzim selulase yang dihasilkan oleh jenis mikroorganisme yang kemampuan untuk mendegradasi substrat yang mengandung selulosa. Enzim selulase adalah enzim ekstraseluler yang dihasilkan di dalam sel kemudian dikeluarkan ke medium pertumbuhannya. Enzim ini sangat penting dalam proses

biokonversi (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*, *Sarcina*, dan *Vibrio* diketahui mampu menghasilkan enzim selulase (Mosier *et al.*, 2005).

Dunia industri menggunakan enzim selulosa untuk berbagai keperluan sebab biaya produksi tidak mahal dan waktu produksi singkat. Selulase digunakan dalam industri tekstil yaitu mencegah penumpukan noda, mengembalikan warna, menghaluskan permukaan dan menghilangkan noda tanah pada kain, industri makanan yaitu untuk melembutkan sayuran, mengeluarkan kulit biji-bijian, mengeluarkan agar-agar dari rumput laut. Selulase banyak digunakan dalam industri pulp dan kertas untuk modifikasi serat, pengelolaan limbah, industri farmasi, dan juga digunakan dalam industri bioethanol.

Meningkatnya pertumbuhan sektor perkebunan, kehutanan, pertambangan di Papua Barat menyebabkan banyaknya limbah yang dibuang ke lingkungan perairan dan limbah yang dihasilkan mengandung polimer karbohidrat. Polimer ini dimanfaatkan oleh mikroorganisme sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya dengan cara memproduksi enzim. Limbah karbohidrat yang stabil di perairan adalah selulosa dan untuk mendegradasinya diperlukan bakteri yang bersifat selulolitik. Penelitian yang dilakukan Hamel (2015) memperoleh 11 isolat bakteri dari sedimen Lamun dari Pantai Rendani Manokwari yang mampu menghasilkan enzim selulase secara kualitatif. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas enzim selulase secara kualitatif dari 11 isolat yang diperoleh dari penelitian Hamel.

METODE

Peremajaan Isolat Bakteri

Isolat bakteri koleksi Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNIPA sebanyak 11 isolat dengan kode SI diinokulasikan pada media

miring NA, dan diinkubasi pada suhu 27°C selama ± 24 jam. Jika sudah murni dan tidak terkontaminasi maka isolat tersebut akan digores pada media NA di *petridish* untuk digunakan pada tahap uji kualitatif bakteri selulolitik.

Uji Kualitatif Bakteri Selulolitik (Modifikasi Metode Meryandini *et al.*, 2009)

Uji kualitatif menggunakan metode Meryandini *et al.*, (2009) yang dimodifikasi yaitu dengan cara melihat adanya zona bening pada media padat selektif CMC 1% dalam 500 mL mengandung NH₄.2SO₄ 0.5g; MgSO₄.7H₂O 0.5g; MnSO₄ 0.5g; Yeast extract 0.5g; FeCl₃.7H₂O 0.5g; CMC 5g; Agar 11g. Diinkubasi pada suhu 27°C selama ± 24 jam. Uji kualitatif bakteri yaitu isolat murni yang tumbuh pada media NA, diinokulasikan pada media padat selektif CMC 1% dan diinkubasi pada suhu 27° selama 3 hari. Isolat yang terlihat atau tumbuh pada media selektif kemudian ditambahkan 3-4 tetes reagen *congo red* dan di *spreader* secara merata ke seluruh media selektif dan dibiarkan selama 30 menit. Setelah 30 menit, dilakukan pengamatan untuk melihat terbentuknya zona bening pada media selektif CMC 1% serta mengukur besar zona tersebut. Aktivitas selulolitik dapat ditentukan dengan nilai indeks selulolitik. Indeks selulolitik merupakan nisbah antara diameter zona bening dengan diameter koloni (Zahidah *et al.*, 2013).

$$IS = \frac{X1 - X2}{X2}$$

Keterangan:

- IS = Indeks Selulolitik
- X1 = Rata-rata diameter zona bening
- X2 = Rata-rata diameter koloni

Produksi Enzim Selulase

Enzim diproduksi dengan dikultur pada media NB yang digunakan sebagai media produksi enzim selulase. Produksi enzim selulase yaitu dibuat media NB, kemudian inokulasikan inokulum isolat bakteri SI ke media cair produksi enzim selulase. Kultur cair tersebut *dishaker* dengan kecepatan agitasi 115 rpm pada suhu 37°C selama ± 24 jam. Setiap kultur yang mengandung enzim dipisahkan dari bakteri menggunakan *centrifuge* berkecepatan 9000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh akan digunakan pada tahap selanjutnya yaitu tahap

pengujian aktivitas enzim selulase secara kuantitatif.

Aktivitas Enzim Selulase

Uji aktivitas enzim selulase ekstraseluler dilakukan dengan cara menghitung jumlah kadar glukosa dari hasil hidrolisis selulosa menggunakan enzim selulase dengan metode DNS. Tabung untuk sampel diisi dengan 1.75 mL ekstrak enzim kemudian ditambahkan 1 mL larutan CMC Broth 1% dan divortex. Kemudian tabung sampel tersebut diinkubasi selama 15 menit dalam *waterbath* suhu 55°C. Tambahkan 1.5 mL reagen DNS pada tabung sampel dan dididihkan lagi selama 15 menit dalam *waterbath*. Setelah itu tabung sampel akan dikeluarkan dari dalam *waterbath* untuk didinginkan. Sedangkan untuk tabung kontrol berisi 1.75 mL ekstrak enzim ditambah 1mL CMC broth 1% dan 1.5 mL reagen DNS namun tidak diinkubasi dalam *waterbath*. Untuk tabung blanko berisi 1 mL CMC broth 1% dan 1.5 mL DNS dan tidak diinkubasi. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 540 nm. Nilai aktivitas selulase ditentukan berdasarkan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas selulase (U/mL)} = \frac{\text{Kadar glukosa} \times \text{Faktor Pengenceran}}{\text{BM glukosa} \times \text{Waktu inkubasi}}$$

Analisis Data

Hasil pengamatan di Laboratorium dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif yang disajikan dalam bentuk gambar dan tabel. Analisis secara kualitatif meliputi terbentuknya zona bening dan perubahan warna pada media sedangkan secara kuantitatif meliputi indeks selulolitik dan nilai aktivitas enzim selulase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

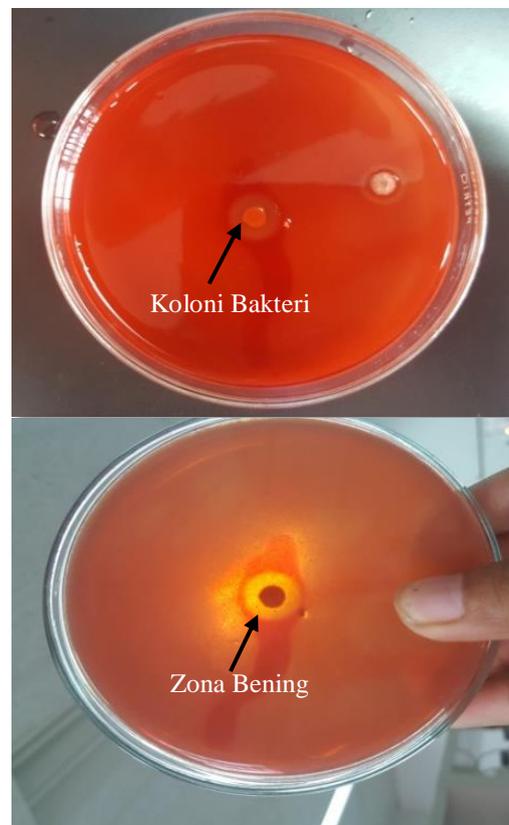
Isolat bakteri murni yang diinokulasikan pada media selektif CMC 1% untuk mendeteksi bakteri yang dapat menghasilkan enzim selulase dengan membentuk zona bening disekitar koloni bakteri setelah ditetesi reagen *congo red*.

Kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim selulase ditunjukkan dalam Gambar 1. Dari 11 isolat bakteri yang diinokulasikan pada

media selektif CMC 1% hanya tujuh isolat yang mampu menghasilkan enzim selulase dengan membentuk zona bening pada media (Tabel 1). Ke-tujuh isolat yang menunjukkan adanya aktivitas enzim selulase kemudian dilanjutkan ke tahap selanjutnya yaitu perhitungan indeks selulolitik untuk mengetahui besar dan kecilnya zona yang terbentuk pada media selektif CMC 1%.

Tabel 1. Isolat Bakteri Penghasil Enzim Selulase

No.	Kode Isolat	Hasil Uji Aktivitas Enzim	
		Positif	Negatif
1	SI - C	√	
2	SI - D		√
3	SI - E	√	
4	SI - F	√	
5	SI - H	√	
6	SI - J		√
7	SI - L	√	
8	SI - M		√
9	SI - O		√
10	SI - P	√	
11	SIII - C	√	



Gambar 1. Aktivitas enzim selulase secara kualitatif

Pengukuran diameter zona bening pada tujuh isolate yang menunjukkan hasil positif bertujuan untuk menentukan berapa besar zona bening yang dibentuk oleh bakteri tersebut. Hasil pengukuran menunjukkan adanya perbedaan ukuran zona bening dan ukuran koloni yang terbentuk antara isolat yang satu dengan isolat yang lainnya (Tabel 2).

Tabel 2. Indeks Aktivitas Selulolitik

No.	Kode Isolat	Ukuran Zona Bening (cm)	Ukuran Koloni (cm)	Indeks Selulolitik (mm)
1	SI-C	1.8	0.6	2
2	SI-E	1.7	0.3	4.7
3	SI-F	1.5	0.7	1.1
4	SI-H	2	0.6	2.3
5	SI-L	1.5	0.5	2
6	SI-P	1.3	0.4	2.2
7	SIII-C	2	0.5	3

Tujuh isolat yang berhasil menghasilkan enzim selulase secara kualitatif kemudian akan diuji secara kuantitatif. Uji kuantitatif dilakukan dengan mengetahui aktivitas selulase yang diukur berdasarkan jumlah gula pereduksi menggunakan metode asam dinitrosalisilat (DNS). Berdasarkan hasil uji kuantitatif tujuh isolat bakteri yang diuji memiliki nilai aktivitas enzim yang bervariasi (Tabel 3), dimana isolat bakteri SI-H yang memiliki nilai aktivitas tertinggi yaitu 0.071 U/mL dan nilai aktivitas terendah dimiliki oleh isolat bakteri SI-E yaitu 0.004 U/mL.

Tabel 3. Aktivitas Enzim Selulase

No.	Kode Isolat	Aktivitas Enzim Selulase (U/mL)	Golongan Bakteri	
			Gram -	Gram +
1.	SI-C	0.042	√	
2.	SI-E	0,004	√	
3.	SI-F	0,016		√
4.	SI-H	0,071	√	
5.	SI-L	0,014	√	
6.	SI-P	0,008	√	
7.	SIII-C	0.039	√	

Keterangan: Golongan bakteri dari tujuh isolat bersumber dari penelitian Hamel (2016)

Seleksi mikroba selulolitik secara kualitatif bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas enzim selulolitik dari suatu isolat. Salah

satu uji kualitatif yang umum digunakan yaitu pewarnaan dengan larutan merah kongo atau yang biasa dikenal dengan sebutan *congo red*. Uji ini dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada media agar yang mengandung karboksilmetil selulosa (CMC) dan diinkubasi pada suhu ruang (27°C). Karboksilmetil selulosa (CMC) merupakan suatu polimer anionik yang umum digunakan pada pengujian aktivitas selulase (Lee, 2008). CMC merupakan polimer dengan bobot molekul tinggi sehingga tidak dapat ditranspor ke dalam sel mikroorganisme (Kim *et al.*, 2004). Enzim selulase merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat ekstraseluler (Imas, 2009). Hal ini menyebabkan enzim tersebut akan disekresikan dalam media tumbuh isolat tersebut.

Isolat bakteri dengan kode SI yang berjumlah 11 isolat ditumbuhkan pada media agar CMC 1% dan diinkubasi selama tiga hari pada suhu ruang (27°C). Zona bening akan terlihat ketika pewarna merah kongo atau *congo red* ditambahkan pada media tumbuh. Tahap pewarnaan dilakukan pada media tumbuh selama 30 menit, dalam selang waktu ini pewarna merah kongo atau *congo red* akan mendeteksi zona yang mampu dihidrolisis oleh selulase. Prinsip pewarnaan ini adalah zat pewarna akan berdifusi ke dalam media agar dan hanya akan diabsorpsi oleh rantai panjang polisakarida yang memiliki ikatan β-D-Glukan (Zhang *et al.*, 2006).

Isolat bakteri dengan kode SI-C, SI-E, SI-F, SI-H, SI-L, SI-P, SIII-C adalah isolat bakteri yang bereaksi positif, ditandai dengan perubahan warna pada media tumbuh yang semula berwarna merah setelah ditetesi pewarna merah kongo atau *congo red* akan berubah menjadi bening atau tidak berwarna, selain itu ditandai juga dengan terbentuknya zona pada media tumbuh. Zona bening yang terbentuk memiliki ukuran diameter yang berbeda-beda antara isolat yang satu dengan isolat yang lain, dimana isolat bakteri dengan kode SI-E yang memiliki nilai indeks selulolitik terbesar yaitu 4.7 mm sedangkan isolat bakteri dengan kode SI-F memiliki nilai indeks selulolitik terkecil.

Perbedaan ukuran zona bening yang dihasilkan oleh ketujuh isolat bakteri berhubungan erat dengan kemampuan masing-masing isolat bakteri dalam menghasilkan enzim selulase. Isolat bakteri yang memiliki aktivitas enzim selulase yang tinggi dapat menghidrolisis

selulosa menjadi glukosa sehingga mampu menunjukkan zona bening yang berukuran besar di sekitar koloni pada media tumbuhnya.

Hasil produksi enzim dapat diketahui melalui nilai aktivitas enzim yang dihasilkan oleh ketujuh isolat bakteri yang diuji. Berdasarkan hasil penelitian isolat bakteri dengan kode SI-H memiliki nilai aktivitas tertinggi yaitu 0,071 U/mL dan aktivitas terendah dimiliki oleh isolat bakteri dengan kode SI-E yaitu 0,004 U/mL. Perbedaan nilai aktivitas yang dimiliki oleh isolate bakteri dipengaruhi oleh gen dari masing-masing isolat dan sumber karbon yang digunakan (Meryandini *et al.*, 2009).

Selulosa yang digunakan dalam penelitian ini adalah substrat selulosa komersil yaitu karboksimetil selulos (CMC) cair dengan konsentrasi 1%. CMC merupakan substrat yang dipakai untuk menginduksi sintesis enzim selulolitik ekstraseluler (Alam *et al.* 2004) dan konsentrasi 1% merupakan konsentrasi yang optimum untuk produksi selulase. CMC juga merupakan jenis selulosa murni yang berbentuk *amorphous* dan hanya dapat dihidrolisis menggunakan enzim selulase jenis endo-1,4- β -glukanase. Hal tersebut berarti isolat bakteri SI-H merupakan isolat yang menghasilkan enzim selulase jenis endo-1,4- β -glukanase terbanyak sehingga memiliki nilai aktivitas enzim yang tinggi dibandingkan dengan isolat yang lainnya.

Hasil uji kualitatif isolat bakteri SI-H merupakan isolat yang mempunyai indeks selulolitik terbesar ketiga setelah isolat bakteri SI-E, sedangkan uji kuantitatif isolate SI-E memiliki nilai aktivitas terendah dibandingkan isolat bakteri SI-H. Seleksi mikroba secara kuantitatif merupakan suatu konfirmasi dan hasilnya belum tentu tepat dengan hasil yang diperoleh pada saat uji kualitatif, hal ini disebabkan oleh kondisi lingkungan mikro yang berbeda antara medium padat dan kultur terendam atau medium cair saat pengujian sehingga mempengaruhi produksi enzim (Purwadaria *et al.*, 2013). Isolat SI-H yang berdasarkan hasil kuantitatif memiliki nilai aktivitas tertinggi sedangkan secara kualitatif tidak memungkinkan bahwa isolate bakteri SI-H merupakan mikroba yang memerlukan kadar oksigen yang tinggi untuk pertumbuhannya, sehingga ketika ditumbuhkan pada media padat CMC 1% isolat bakteri SI-H menghasilkan

enzim yang sedikit ditandai dengan ukuran zona bening yang terbentuk pada media tumbuhnya.

SIMPULAN

Secara kuantitatif diperoleh tujuh isolat bakteri yang mampu membentuk zona bening dengan nilai indeks selulolitik yang berbeda. Nilai indeks selulolitik terbesar dimiliki oleh isolat bakteri SI-E yaitu 4.7 mm dan nilai indeks terkecil dimiliki oleh isolat bakteri SI-F yaitu 1.1 mm. Berdasarkan uji kuantitatif isolat bakteri SI-H menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu 0.071 U/mL sedangkan aktivitas enzim selulase terendah yaitu 0.004 U/mL dihasilkan oleh isolat bakteri SI-E.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, M, M. Manchur., M. Anwar. 2004. Isolation, purification, characterization of cellulolytic enzymes produced by the isolate *Streptomyces omiyaensis*. Pak J. Biol Sci. 7(10): 1647–1643.
- Hamel, J.W., H. Abubakar., S. Ratnawati. 2016. Skrining Isolat Bakteri Penghasil Enzim Hidrolisis (Amilase, Lipase, Protease, dan Selulase) Dari Sedimen Ekosistem Lamun di Perairan Rendani Manokwari. Prosiding Seminar Nasional: Biodiversitas, Sains dan Matematika. Hal 138-144.
- Hartanti. 2010. Isolasi dan Seleksi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Kawah Air Panas Gunung Panccar, Bogor. Skripsi FMIPA IPB Bogor.
- Imas, T. 2009. Microbiology Essensial. Jakarta.
- Kim, K.H., J.S. Ham, C.B. Yang., I.B. Chung; M.K. Kim; K.N. Kim. 2004. Isolation and characterization pH cellulose secreting bacterium from cattlemanure: Application to composting. Compost Science & Utilization, 12:242-248.
- Lee, Y. 2008. Purification and characterization of cellulose produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. Bioresource Technology 99:378-386.
- Marks, D. B. A. D., C.M. Marks., Smith. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Meryandini, A.W. Widosari., B. Maranatha, T. C. Sunarti, N. Rahmania., H. Satria. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakteristik Enzimnya. *Makara Sains*, 13:33–38.

- Mosier, N.C. Wyman. 20015. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*, 96(6):673-686
- Narasimha, G. 2005. Nutrient effects on productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *Journal Biothechnol* 5:472-476
- Purwadaria, T., P. Marbun., Arnold., P. Kentaren. 2003. Perbandingan aktivitas enzim selulase dari bakteri dan kapang hasil isolasi dari rayap. *JITV*. 8: 4.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzime Bioteknologi*. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi. IPB
- Sumardjo, Damin. 2009. *Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Bioeksakta*. Jakarta: EGC.
- Zahidah, D. S. Maya. 2013. Isolasi, Karakterisasi dan Potensi Bakteri Aerob sebagai Pendegradasi Limbah Organik. *Jurnal Sains dan semi Pomits*. 2(1)
- Zhang, Y., M.E. Himmel., J.R. Miellenz. 2006. Outlook for cellulase improvement screening and selection strategies. *Biothechnol Adv*. 24:452- 454.