

Pengaruh Variasi Suhu Dan Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Selulase Dari Bakteri *Serratia marcescens*

Effect of Variation of Temperature and Incubation Time on Activity Cellulase Enzyme From Bacteria *Serratia marcescens*

Laily Kurniawati, Endang Kusdiyantini dan Wijanarka

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang

Corresponding Author : lailylailyk@gmail.com

Abstract

Enzymes are biocatalysts in living cells when cells metabolize. All living organisms are produced enzymes, both humans, animals, plants and microorganisms. One of the bacteria that has the potential to produce cellulose (EC 3.2.1.4) enzymes is *Serratia marcescens*. These bacteria can be isolated from water, soil and digestive tract. This research aims to find out the types of enzymes produced by *S. Marcescens*, to examine the effect of temperature and incubation time on selected enzyme activity. The type of enzyme test was qualitatively determined by *S. marcescens* growth on the amylolytic, cellulolytic, pectinolytic and chitinolytic selective medium based on the clear zone. This research was used a Completely Randomized Design (CRD). The first factor was the incubation time (T) which were 4 hours (T_4), 8 hours (T_8) and 12 hours (T_{12}). The second factor was the treatment of incubation temperature (S) which were 40°C (S_1), 50°C (S_2) and 60°C (S_3). Each treatment was repeated in 3 times. The data were obtained then analyzed using Anova ($\alpha = 0.05$). If it is significantly different, furthermore proceed with the T test (BNT). The results showed that *S. marcescens* qualitatively produced only clear zones in the cellulolytic medium of 5.1 mm. The ANOVA results showed that incubation temperature (S), the interaction between incubation time (T) and incubation temperature (S) were did not have effect on cellulase activity, whereas incubation time (T) gives a significant effect on cellulase activity were obtained at the incubation time for 12 hours (T_{12}) with a value of 0.27 U / mL.

Keywords: Cellulose enzyme, Incubation temperature, Serratia marcescens

Abstrak

Enzim merupakan biokatalisator didalam sel hidup disaat sel melakukan metabolisme. Semua makhluk hidup di dunia ini menghasilkan enzim, baik manusia, hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Salah satu bakteri yang berpotensi menghasilkan enzim selulase (EC 3.2.1.4) adalah *Serratia marcescens*. Bakteri ini dapat diisolasi dari air, tanah, dan saluran pencernaan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis enzim yang dihasilkan oleh *S. marcescens*, mengkaji pengaruh suhu dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim terpilih. Uji jenis enzim secara kualitatif ditentukan dengan menumbuhkan *S. marcescens* pada medium selektif amilolitik, selulolitik, pektinolitik dan kitinolitik berdasarkan zona bening. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Faktor pertama adalah waktu inkubasi (T) yaitu 4 jam (T_4), 8 jam (T_8), dan 12 jam (T_{12}). Faktor kedua perlakuan suhu inkubasi (S) yaitu 40°C (S_1), 50°C (S_2), dan 60°C (S_3). Masing – masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Anova ($\alpha=0,05$). Apabila berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji T (BNT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *S. marcescens* secara kualitatif hanya menghasilkan zona bening pada medium selulolitik yaitu sebesar 5,1 mm. Hasil Anova menunjukkan bahwa suhu inkubasi (S), interaksi antara waktu inkubasi (T) dan suhu inkubasi (S) tidak terdapat pengaruh terhadap aktivitas selulase, sedangkan waktu inkubasi (T) memberikan pengaruh nyata terhadap aktivitas selulase diperoleh pada waktu inkubasi 12 jam (T_{12}) dengan nilai 0,27 U/mL.

Kata kunci : Enzim selulase, Suhu Inkubasi, Serratia marcescens

PENDAHULUAN

Enzim merupakan biokatalisator berperan sebagai katalis yaitu mempercepat reaksi suatu senyawa kimiawi didalam sel tanpa habis bereaksi. Penggunaan enzim didalam berbagai bidang telah berkembang pesat karena sifat enzim yaitu dapat mempercepat reaksi, hal ini yang menjadi salah

satu alasan enzim banyak digunakan sebagai katalis didalam laboratorium maupun industri.

Jenis – jenis enzim antara lain adalah enzim amilase, selulase, kitinase dan pektinase. Masing-masing enzim memiliki peranan yang berbeda – beda karena enzim bersifat spesifik. Amilase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis bahan-bahan berupa pati menjadi monomer yang

lebih sederhana dalam bentuk glukosa, dekstrosa, fruktosa dan maltose. Pektinase adalah enzim yang digunakan dalam degradasi molekul pektin. Pektinase merupakan salah satu jenis enzim pangan dunia yang banyak digunakan oleh industri pangan. Kitinase adalah enzim yang dapat mendegradasi kitin dan banyak dimanfaatkan sebagai agen biokontrol terutama bagi tanaman yang terserang infeksi mikroba (Hamid *et al.*, 2013). Enzim selulase mampu mendegradasi selulosa melalui proses katalis yang bekerja secara sinergis untuk melepaskan gula (glukosa) (Santos *et al.*, 2012).

Semua makhluk hidup di dunia ini menghasilkan enzim, baik tubuh manusia, hewan dan tumbuhan bahkan mikroorganisme. Salah satu bakteri yang berpotensi menghasilkan enzim adalah *Serratia marcescens*. *S. marcescens* yang digunakan dalam penelitian ini telah diisolasi dari saluran pencernaan keong emas yang dilakukan oleh Septiani (2017). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa *S. marcescens* terbukti menghasilkan enzim selulase. *S. marcescens* yang ditumbuhkan di substrat jerami tidak berpengaruh terhadap aktivitas selulase (Budi, 2017).

Berdasarkan uraian diatas menunjukkan bahwa penelitian tentang enzim yang dihasilkan oleh *S. marcescens* perlu dikaji lebih lanjut. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui jenis enzim yang dihasilkan dari *S. marcescens* secara kualitatif berdasarkan zona bening dan mengkaji pengaruh perlakuan suhu dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim terpilih. Uji enzimatik diawali dengan mengetahui zona bening yang dihasilkan oleh *S. marcescens*. Zona bening yang dihasilkan oleh bakteri kemudian dikaji lebih lanjut. Enzim yang diperoleh kemudian dilakukan pengujian aktivitas enzim menggunakan metode DNS berdasarkan variasi suhu dan waktu inkubasi.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan media selektif

Medium selulolitik dengan komposisi terdiri MgSO₄ 0,05 g, Na₂HPO₄ 0,05g; NaCl 0,23 g; yeast extract 0,2g; CMC 1 g, agar 2,5 g, dilarutkan dalam aquades 100 mL (Al- Arif *et al.*, 2012).

Medium amilolitik ditimbang dengan komposisi starch soluble 1%, yeast ekstrak 0,2 %; pepton 0,5 %; NaCl 0,05 %; MgSO₄ 0,05 %; CaCl 0,015 %; dan agar 2%, kemudian ditambahkan dengan aquades sebanyak 250 mL (Santos dan Martin, 2003).

Medium pektinase ini antara lain 0,2 g bacto pepton; 0,2 g yeast extract; 0,3 g K₂HPO₄; 0,01 g

CaCl₂; 0,05 g MgSO₄; 0,5 g Na₂CO₃; 1,0 g pektin dan 1,5 g bacto agar. Semua bahan dilarutkan dengan 100 mL aquades (Rohishoh, 2012).

Medium kitinase dibuat dengan mencampurkan koloidal kitin 0,5%, K₂HPO₄ 0,1 g; MgSO₄·7H₂O 0,01 g; yeast extract 0,05 g; pepton 0,1 g; bacto tripton 0,1 g; NaCl, (NH₄)₂SO₄ 0,1 g, dan agar 1 g kedalam erlenmeyer yang berisi 100 mL aquades (Haedar dkk, 2017).

Uji Bakteri Penghasil Enzim secara Kualitatif

Sebanyak 10µL bakteri *S. marcescens* ditumbuhkan dengan cara diteteskan di atas cawan petri yang diletakkan di tiap - tiap medium selektif yang berbeda kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Indeks enzim yang dihasilkan di ukur dengan membandingkan diameter zona bening dengan diameter koloni menggunakan jangka sorong. Zona bening yang memiliki diameter paling besar maka digunakan sebagai enzim terpilih.

Pembuatan Medium Produksi

Enzim yang terpilih adalah enzim selulase. Komposisi bahan yang digunakan adalah CMC 2 g; MgSO₄ 0,1 g; Na₂HPO₄ 1 g; NaCl 0,46 g; yeast extract 0,4 g dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL ditambahkan dengan aquades sebanyak 200 mL.

Pembuatan Inokulum / Starter Bakteri

Isolat dari kultur peremajaan diambil sebanyak 1 ose dan dimasukkan kedalam medium NB. Inokulum starter dibuat dalam volume 25 ml dan diinkubasi pada rotary shaker selama ± 18 jam. Starter diukur kerapatansel menggunakan spektrofotometer dengan λ 520 nm.

Proses Fermentasi

Starter berumur ±18 jam diinokulasikan sebanyak 2,5 mL kedalam 50 mL medium produksi atau 5% (v/v) dari medium produksi sebanyak tiga kali ulangan. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang dengan kecepatan agitasi 120 rpm dengan menggunakan rotary shaker selama 24 jam. Pengambilan medium kultur sebanyak 6 mL dilakukan dengan interval waktu 4 jam sekali selama 24 jam untuk mengukur kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim. Medium kultur sebanyak 6 mL, 4 mL digunakan untuk pengukuran OD pertumbuhan, 1 mL untuk pengukuran aktivitas selulase, dan 1 mL untuk cadangan.

Pengukuran Pertumbuhan Sel

Pengambilan kultur pada medium produksi sebanyak 4 mL setiap interval 4 jam sekali yaitu pada 0 jam, 4 jam, 12 jam, 18 jam, 20 jam, dan 24 jam. Pertumbuhan sel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada λ 520 nm. Langkah selanjutnya dibuat kurva pertumbuhan.

Pengukuran Aktivitas Selulase

Pengujian aktivitas enzim secara kuantitatif dengan menggunakan reagen 3,5-Di Nitro Salisilic Acid (DNS) berdasarkan estimasi jumlah gula reduksi yang dihasilkan dari substrat. Pemanenan enzim kasar membutuhkan 1 mL medium kultur pada interval waktu 4 jam, 8 jam, dan 12 jam. Langkah selanjutnya sampel di sentrifugasi menggunakan sentrifuge dengan kecepatan 2.100 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim kasar yang digunakan untuk uji aktivitas enzim selulase dengan metode gula reduksi. Supernatan hasil sentrifugasi disimpan dalam kulkas pada suhu 4°C (Anggarawati, 2012).

Langkah selanjutnya sebanyak 3 buah tabung reaksi disiapkan. Sebanyak 3 tabung reaksi tersebut untuk masing – masing sampel yang diberi label blanko, kontrol, dan sampel. Sampel yang digunakan untuk pengujian aktivitas enzim adalah sampel ekstrak kasar enzim / crude enzyme yang dihasilkan pada saat fase logaritmik/eksponensial, dimana pada saat fase tersebut bakteri menghasilkan metabolit primer berupa enzim. Sampel merupakan reaksi substrat dengan enzim dengan perlakuan inkubasi, kemudian ditambahkan dengan DNS. Kontrol merupakan campuran antara substrat dan enzim tanpa inkubasi yang kemudian ditambahkan dengan DNS. Sedangkan blanko merupakan campuran antara substrat, DNS dan aquades. Tabung berisi blanko dimasukkan 0,9 mL substrat dan 0,1 mL akuades. Tabung berisi kontrol dimasukkan 0,9 mL substrat CMC dan 0,1 crude enzyme. Tabung berisi sampel dimasukkan 0,9 mL substrat CMC dan 0,1 crude enzyme, selanjutnya reaksi dihentikan ke dalam penangas selama 2-3 menit. Ketiga tabung di inkubasi dengan masing – masing perlakuan yaitu pada suhu 40 °C, 50 °C, 60 °C selama 30 menit. Tahap berikutnya reaksi kembali di dihentikan dengan cara direbus ke dalam penangas selama 2-3 menit dan ditambahkan 1mL reagen DNS, selanjutnya dipanaskan kembali selama 2-3 menit. Tahap berikutnya ditambahkan 4 mL akuades dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada λ 570 nm (Wijanarka dkk, 2016).

Pengujian Aktivitas Enzim dengan Metode DNS

Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan pada kurva standar untuk mengetahui konsentrasi produk glukosa pada sampel. Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah μ mol produk glukosa hasil hidrolisis enzim tiap satu menit pada kondisi pengujian. Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan pada kurva standar pada prosedur sebelumnya (Putri, 2016).

Nilai aktivitas enzim ditentukan dengan perhitungan sebagai berikut :

$$AE = \frac{\mu\text{g glukosa} \times \text{faktor pengenceran} \times 1000}{V \times \text{BM} \times \text{glukosa} \times t}$$

Keterangan:

Faktor Pengenceran : faktor pengenceran enzim
(1/5)
V : volume enzim (0,1 mL)
t (waktu inkubasi) : waktu inkubasi 3 menit
BM glukosa : Berat molekul glukosa
(180,2 dalton)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Enzim Secara Kualitatif oleh Bakteri *S. marcescens*

Pengujian enzim secara kualitatif oleh *S. marcescens* dilakukan pada medium amilolitik, selulolitik, pektinolitik dan kitinolitik. Pengujian enzim secara kualitatif bertujuan untuk mengetahui jenis enzim yang dihasilkan *S. marcescens* dengan melihat zona bening. Zona bening yang dihasilkan menandakan bahwa bakteri telah mendegradasi nutrisi yang ada pada medium selektif. Bakteri *Serratia* dilaporkan menghasilkan berbagai enzim, salah satunya adalah enzim kitinase, selulase, dan xylanase. *Serratia liquefaciens* yang diisolasi dari saluran pencernaan ulat sutera telah terbukti memiliki aktivitas enzim selulase, xilanase dan amylase yang besar (Anand *et al.*, 2009). Penelitian yang dilakukan oleh vyas dan kumar (2018), mengisolasi 15 bakteri yang berasal dari kotoran ternak mendapatkan 10 isolat yang menunjukkan aktivitas selulase pada media CMC. Aktivitas enzim selulase terlihat oleh munculnya zona bening di sekitar koloni yang menunjukkan aktivitas hidrolisis pada media. Dari sepuluh isolat terpilih 3 isolat yang memiliki aktivitas selulase tertinggi yaitu *Pseudomonas otitidis*, *Stenotrophomonas koreensis* dan *Serratia marcescens*.

Hasil uji menunjukkan bahwa *S. marcescens* tidak menghasilkan zona bening pada medium selektif amilolitik, pektinolitik dan kitinolitik. *S. marcescens* hanya menghasilkan zona bening pada medium CMC (Tabel 1). *S. marcescens* yang digunakan dalam penelitian hanya mampu mendegradasi nutrisi di dalam medium CMC yang mengandung selulosa. Hal ini disebabkan karena perbedaan strain sehingga setiap bakteri memiliki kemampuan yang berbeda dalam mendegradasi substrat. Hal ini diperkuat dengan Wang (2014), bahwa isolat *Serratia marcescens* JPP1 yang diisolasi dari kulit kacang di Provinsi Jiangsu, Cina, menghasilkan enzim kitinase. Bakteri *S. marcescens* yang digunakan dalam penelitian ini diduga memiliki strain yang sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Itani (2017), mengisolasi bakteri selulase yang berasal dari dekomposer di Lebanon. Hasil isolasi diperoleh 2 isolat bakteri yaitu *Pseudomonas aeruginosa* dan *Serratia marcescens* yang menunjukkan perubahan warna parsial dari selulosa pada cawan yang ditetesi dengan *congo red*.

Penelitian kali ini, koloni yang diperoleh ditetesi dengan larutan iodin untuk memperjelas pengamatan zona bening. Koloni yang mampu memproduksi selulase terdeteksi dengan terbentuknya zona bening berwarna orange muda sampai kekuningan setelah ditetesi dengan larutan iodin. Menurut Kasana (2008), penggunaan larutan iodin sangat meningkatkan ketajaman zona bening. Hal ini bertujuan untuk membuat proses skrining saat memproduksi mikroorganisme selulase lebih mudah, efisien dan cepat. Penggunaan larutan iodin terletak pada kesederhanaannya, kecepatan kinerja dan efektivitas sejumlah besar mikroorganisme. Selain itu, penggunaan larutan iodin menghindari penggunaan bahan kimia beracun.

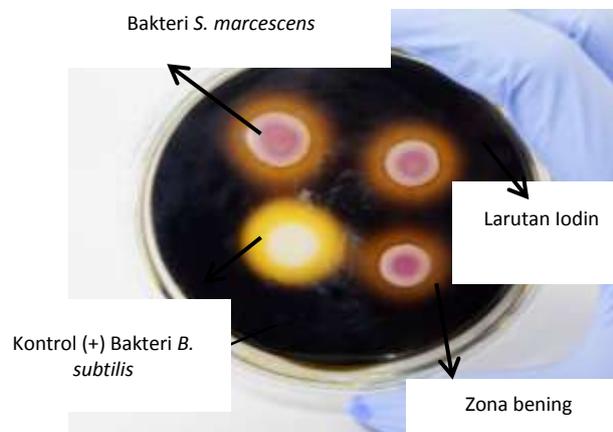
Tabel 1. Uji enzim secara kualitatif oleh bakteri *S. Marcescens*

No	Nama Enzim	Zona Bening
1	Amilase	-
2	Selulase	+
3	Kitinase	-
4	Pektinase	-

Keterangan : + : menghasilkan zona bening
 - : tidak menghasilkan zona bening.

Aktivitas enzim selulase diukur secara semi kuantitatif berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk disekitar koloni *S.marcescens* menggunakan rumus indeks selulolitik (IS). Hasil

pengukuran IS dengan metode *drop plate* sebesar 5,1 mm (Gambar 1). Hasil penelitian diperoleh bakteri mampu mendegradasi selulosa menjadi glukosa sehingga digolongkan sebagai bakteri selulolitik. *S. marcescens* telah terbukti menghasilkan enzim selulase berdasarkan penelitian Septiani (2017), bahwa bakteri *S. marcescens* yang diisolasi dari saluran pencernaan keong menghasilkan enzim selulase. Penelitian yang dilakukan oleh Fawzya (2013), indeks aktivitas selulase yang dihasilkan dari isolat *Serratia marcescens* SGS 1609 sebesar 2,25 mm. Sukmawati (2018) melakukan isolasi bakteri selulolitik yang berasal dari limbah kulit pisang menghasilkan zona bening paling besar adalah pada isolat B dengan indeks selulolitik sebesar 3mm. Zona bening yang dihasilkan *S.marcescens* jika dibandingkan dengan isolat B memiliki indeks selulolitik lebih besar. Isolat *Lactobacillus plantarum* memiliki indeks selulolitik sebesar 1,98 mm pada inkubasi 48 jam (Putri, 2016). *S. marcescens* pada penelitian ini menghasilkan indeks selulase sebesar 5,51 mm pada masa inkubasi ± 3 minggu. Menurut Putri (2016), nilai indeks aktivitas selulase yang dihasilkan oleh mikroba dapat ditingkatkan dengan menambah waktu inkubasi sehingga enzim dapat mendegradasi lebih banyak substrat CMC.



Gambar 1. Uji Kualitatif Bakteri *S. marcescens* pada medium CMC dengan metode *drop plate* usia ± 3 minggu

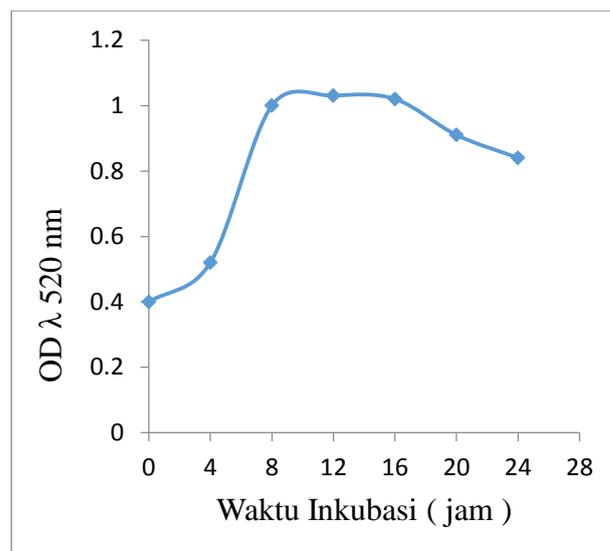
Pertumbuhan *S. marcescens*

Pertumbuhan *S. marcescens* dibutuhkan untuk mengetahui waktu yang tepat untuk memproduksi enzim selulase. Kurva pertumbuhan merupakan bagian yang penting dari suatu penelitian karena dapat menggambarkan karakteristik kolonisasi bakteri. Selain itu,

perhitungan waktu generasi juga diperlukan untuk mengetahui prediksi populasi setiap mikroorganisme dalam jangka waktu yang sama dengan keaktifannya dalam proses metabolisme (Annisa dkk, 2015). Pengukuran pertumbuhan bakteri *S. marcescens* menggunakan alat spektrofotometer dengan λ 520 nm (Septiani, 2017).

Inokulum *S. marcescens* diambil ketika berusia ± 18 jam berada pada fase eksponensial. Kurva pertumbuhan pada Gambar 2. menunjukkan bahwa pertumbuhan sel pada jam ke-0 hingga jam ke-4 menunjukkan fase lag yaitu fase penyesuaian dimana bakteri melakukan adaptasi dengan lingkungan yang baru. Bakteri tidak memerlukan waktu yang lama untuk beradaptasi karena inokulum bakteri yang digunakan berasal dari media cair (NB), sehingga bakteri mengalami fase adaptasi yang cepat ketika ditumbuhkan pada media CMC cair.

Pertumbuhan bakteri mulai mengalami perubahan yang signifikan pada jam ke-4 hingga jam ke-8, tahapan ini dinamakan fase log/fase eksponensial dimana bakteri mengalami periode pertumbuhan yang sangat cepat. Menurut Sonia dan Kusnadi (2015), tahapan ini disebut dengan fase log dimana sel bakteri mulai berkembang, pertumbuhan bakteri berlangsung dengan cepat hingga dua kali lipat dari jumlahnya semula. Jam ke-8 sampai jam ke-16 pertumbuhan bakteri mengalami fase stationer dimana pada tahap ini laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya. Jam ke-20 hingga jam ke-24 bakteri mulai mengalami penurunan jumlah sel dimana terjadi penurunan populasi bakteri dan peningkatan kematian dikarenakan sumber nutrisi untuk pertumbuhan sel mulai habis.

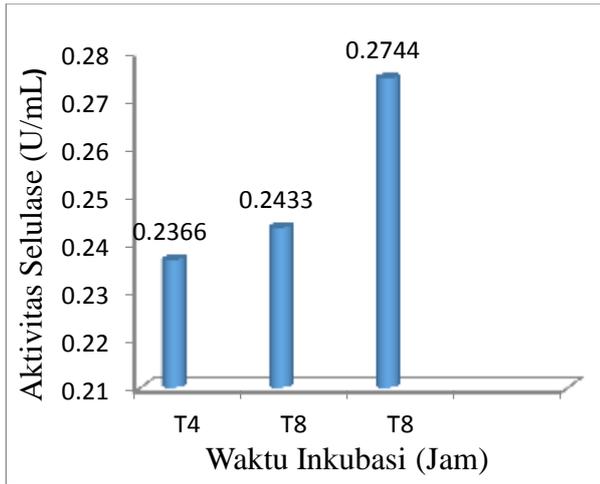


Gambar 2. Kurva pertumbuhan bakteri *S. Marcescens*

Apabila dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Das (2011), strain *S. marcescens* yang diisolasi dari batang jerami, maka kurva pertumbuhan tidak berbeda jauh. Bakteri ini menunjukkan fase lag pada jam ke-0 hingga jam ke-3, selanjutnya bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat yaitu fase log/eksponensial dari jam ke 4 hingga jam ke-16.

Produksi selulase oleh *S. marcescens*

Produksi enzim yang merupakan metabolit primer terjadi dari pertumbuhan sel hingga akhir fase logaritmik atau awal fase stationer (Sonia dan Kusnadi, 2015). Hal tersebut yang mendasari pemilihan waktu inkubasi untuk aktivitas selulase. Penentuan waktu inkubasi yang digunakan untuk pengukuran aktivitas selulase berdasarkan dari kurva pertumbuhan (Gambar 2). Berdasarkan hasil penelitian maka produksi enzim selulase dihasilkan pada jam ke-4 hingga jam ke-12, menunjukkan bahwa pada kondisi tersebut bakteri mengalami metabolisme primer dimana bakteri memproduksi enzim. Hasil tertinggi dari kurva pertumbuhan akan digunakan sebagai waktu panen enzim saat produksi enzim selulase.



Gambar 3. Pengaruh waktu inkubasi (jam) terhadap aktivitas Selulase

Keterangan :

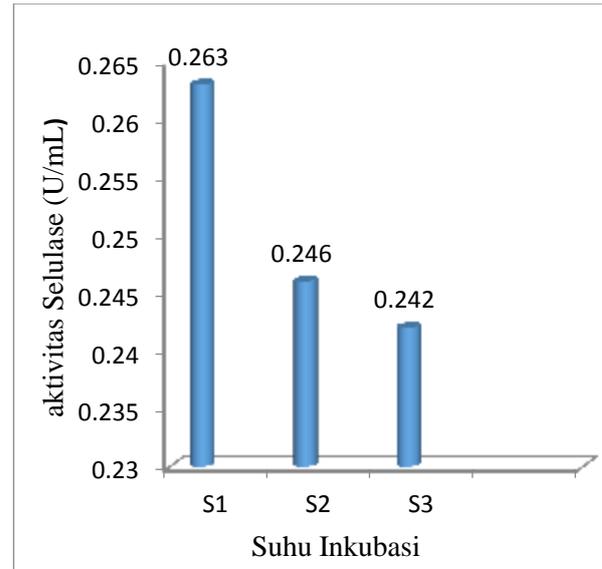
T₄ = Waktu Inkubasi 4 jam

T₈ = Waktu Inkubasi 8 jam

T₁₂ = Waktu Inkubasi 12 jam

Variasi waktu inkubasi yang digunakan dalam penelitian adalah T₄, T₈, T₁₂ (Gambar 3). Variasi waktu inkubasi yang digunakan sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Budi (2017), bahwa waktu inkubasi yang digunakan dalam pemanenan enzim selulase adalah waktu inkubasi ke-4 jam, ke-8 jam dan ke-12 jam dan aktivitas selulase tertinggi dihasilkan pada waktu inkubasi ke 12 jam dengan nilai 0,26 U/mL. Jika dibandingkan maka aktivitas selulase tertinggi adalah sama yaitu pada waktu inkubasi 12 jam diperoleh rata-rata 0,27 U/mL. Hal ini disebabkan karena pada saat bakteri mengalami kenaikan waktu inkubasi maka akan mengalami kenaikan jumlah biomassa sel sehingga akan meningkatkan produksi enzim selulase.

Penelitian yang dilakukan oleh Shashidhar (2018), menyatakan bahwa *Serratia marcescens* L4 yang diisolasi dari tanah, positif menghasilkan avielase. Zona bening yang dihasilkan 25 mm dan indeks enzimatik sebesar 1,8. Aktivitas avielase maksimum yang dihasilkan sebesar 8.2 U/ml pada pH 7.0 dan suhu 30°C dalam medium CMC (5 g / L). *S.marcescens* L4 dengan aktivitas avielase maksimum yang dihasilkan pada inkubasi 48 jam dapat dieksplorasi untuk aktivitas *biofinishing* denim dengan mengurangi *backstaining*.



Gambar 4. Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas selulase

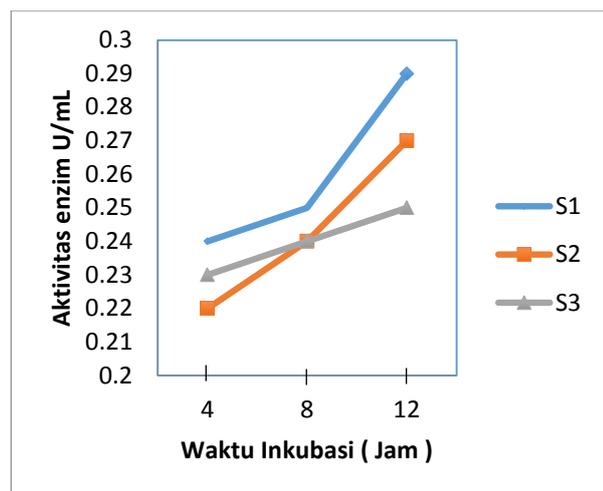
Keterangan :

S1 = Suhu Inkubasi 40 °C

S2 = Suhu Inkubasi 50 °C

S3 = Suhu Inkubasi 60 °C

Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas selulase (Gambar 4) dilakukan pada suhu yang berbeda yaitu S₁ , S₂, dan S₃. Berdasarkan perlakuan suhu tersebut menghasilkan nilai yang berbeda tetapi tidak nyata. Rata – rata nilai aktivitas selulase secara berurutan adalah 0,26 U/mL, 0,24 U/mL dan 0,24 U/mL. Hasil ini mendekati dengan Sethi (2013) yang mengisolasi bakteri penghasil selulase dari tanah dan diidentifikasi sebagai *Serratia marscens*, melakukan optimasi terhadap medium fermentasi untuk produksi selulase seperti kondisi lingkungan (pH, suhu, sumber karbon, dan sumber nitrogen) yang dioptimalkan. Variasi suhu yang digunakan adalah 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, dan 60°C. Hasil menunjukkan bahwa kondisi optimum suhu untuk produksi selulase adalah 40°C pada pH 10 dengan glukosa sebagai sumber karbon dan amonium sulfat sebagai sumber nitrogen, dan bungkil kelapa untuk menstimulasi produksi selulase. Produksi selulase dari ke empat bakteri yang diuji, bahwa *Pseudomonas fluorescens* merupakan produsen selulase terbaik diikuti oleh *Bacillus subtilis*, *E. coli*, dan *Serratia marscens*. Aktivitas selulase dari *S. marscens* yang diperoleh adalah 0,6 U/mL.



Gambar 5. Grafik aktivitas enzim selulase U/mL

Keterangan :

S1 = Suhu Inkubasi 40 °C

S2 = Suhu Inkubasi 50 °C

S3 = Suhu Inkubasi 60 °C

Berdasarkan analisis sidik ragam (ANOVA) terhadap aktivitas selulase (Gambar 5) menunjukkan bahwa perlakuan antara variasi suhu dan waktu inkubasi tidak mempengaruhi aktivitas selulase. Hal ini dapat diartikan bahwa perlakuan suhu yang berbeda-beda belum optimum untuk meningkatkan aktivitas selulase. Hal ini diduga bahwa variasi jarak interval suhu yang kurang sempit menjadikan hasil yang didapat tidak berpengaruh nyata. Interval suhu yang digunakan adalah 10 °C, hal ini dipilih karena setiap kenaikan 10°C maka enzim akan mengalami kenaikan laju aktivitas. Namun karena perlakuan yang dilakukan hanya suhu 40°C, 50°C dan 60°C maka aktivitas enzim yang didapat tidak terlihat signifikan. Sethi (2013), menggunakan interval suhu 5°C untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *S. marcescens*. Suhu yang digunakan adalah 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, dan 60°C. Hasil menunjukkan bahwa kondisi optimum suhu untuk produksi selulase adalah 40°C. Berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Putri (2016), aktivitas enzim selulase tertinggi yang dihasilkan oleh *L. plantarum* adalah pada perlakuan suhu 65°C dengan aktivitas selulase sebesar 0,052 U/mL. Berdasarkan hasil tersebut, maka suhu optimum untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan *L. plantarum* adalah suhu 65°C. Penelitian yang dilakukan Sonia dan Kusnadi (2015), aktivitas selulase dari isolat bakteri OS-16 asal Padang Pasir Tengger- Bromo adalah 0,045 U/mL dengan suhu dan pH optimum 85°C dan 8. Bakteri OS-16 asal Padang Pasir Tengger- Bromo mengalami penurunan aktivitas pada suhu 95 °C.

Menurut Sonia dan Kusnadi (2015), pada suhu rendah atau suhu - suhu dibawah optimal akan mengakibatkan enzim kekurangan energi sehingga tidak mampu beraktivitas secara maksimal, peningkatan suhu hingga mencapai suhu optimal akan meningkatkan aktivitas enzim pula, setelah melebihi suhu optimal, enzim akan mengalami denaturasi termal dan mengubah struktur enzim, sehingga aktivitas enzim menurun.

Interaksi antara waktu inkubasi dan suhu inkubasi menghasilkan nilai yang tidak berbeda nyata. Hasil ketiga perlakuan diperoleh aktivitas tertinggi yaitu pada perlakuan T₁₂S₁ dengan nilai 0,29 U/mL. Hasil aktivitas selulase antar perlakuan waktu inkubasi jam ke-4 dan jam ke-8 tidak berbeda nyata, namun berbeda nyata dengan waktu inkubasi jam ke-12. Grafik aktivitas selulase bisa dilihat pada Gambar 4.6 Hal ini disebabkan karena pada saat jam ke-12 merupakan fase logaritmik dimana metabolit primer berupa enzim dapat dihasilkan secara optimal. Menurut Sonia dan Kusnadi (2015), produksi enzim selulase yang merupakan metabolit primer terjadi pada fase logaritmik atau awal fase stasioner.

Berdasarkan analisis sidik ragam (ANOVA) terhadap aktivitas enzim selulase menunjukkan bahwa waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim selulase. Oleh karena itu dilakukan uji lanjut yaitu uji BNT 5%. Hasil uji lanjut BNT 5% didapatkan bahwa waktu inkubasi T₁₂ berbeda nyata dengan waktu inkubasi T₄ dan T₈. Hasil rerata waktu inkubasi T₁₂ mencapai 0.27 U/mL

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa *S. marcescens* tergolong bakteri selulolitik ditunjukkan dengan zona bening yang dihasilkan. Hasil perlakuan suhu inkubasi yang berbeda – beda belum optimum untuk meningkatkan aktivitas selulase sedangkan perlakuan waktu inkubasi berpengaruh signifikan terhadap aktivitas selulase diperoleh pada waktu inkubasi 12 jam (T₁₂) dengan nilai 0,27 U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Arif, M. A., Darmanto, W., & Nurhajati, N. N. T. (2012). Isolasi dan identifikasi bakteri selulolitik dengan aktivitas tinggi dalam saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*). *Jurnal JBP Biosains*, 14(2), 86-92
- Anand, A.P.P., S. John Vennison, S. Gowri Sankar, D. Immanuel Gilwax Prabhu, P. Thirumalai Vasanth, T. Raghuraman, C. Jerome Geoffrey, S. Ezhil Vendan. 2018.

- Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science* Vol. 10
- Anggarawati, D. 2012. Aktivitas Enzim Selulase Isolat SGS 2609 BBP4B-KP Menggunakan Substrat Limbah Pengolahan Rumpuh Laut yang Dipretreatment dengan Asam. *Skripsi*. Depok: Universitas Indonesia.
- Annisa S, Rahman K dan Desmelati. 2015. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Selulase *Rastrellinger* sp. *Skripsi*. Universitas Riau, Riau.
- Budi, K.L., Wijanarka, Kusdiyantini, E. 2018. Aktivitas Enzim Selulase Yang Dihasilkan Oleh Bakteri *Serratia marcescens* Pada Substrat Jerami. *Jurnal Biologi*, Volume 7 No 1.
- Das, M. 2011. Chitinase produced by *Serratia marcescens* SMG isolated from decomposed *Volvariella volvacea*. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5(20), pp. 3220-3222,
- Haedar, N., Natsir, H., Fahrudin, Aryanti, W. 2017. Produksi dan Karakterisasi Enzim Kitinase dari Bakteri Kitinolitik Asal Kerang *Anadara Granosa*. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*. 8 (15) (2017) 14 – 21
- Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Musarrat, J., Javed, S. 2013. Chitinases: An update. *J PHarm Bioallied Sci*. US National Library of Medicine National Institutes of Health.
- Itani, A., Olama, Z., Holail, H. 2017. Optimization of the Nutritional Requirements of Two Novel Bacterial Cellulose Decomposers Isolated From Lebanese Habitat. *International Journal of Micro*
- Kasana, C.R., Salwan, R., Dhar, H., Som, D., Gulati, A. 2008. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol* 57:503–507
- Kusmiati dan Agustini N.W.S. 2010. Pemanfaatan Limbah Onggok untuk Produksi Asam Sitrat dengan Penambahan Mineral Fe dan Mg pada Substrat Menggunakan Kapang *Trichoderma* Sp dan *Aspergillus Niger*. *Seminar Nasional Biologi*. 856-866
- Preeti Vyas dan Ashwani Kumar. 2018. Biochemical and molecular characterization of cellulase producing bacterial isolates from cattle dung samples. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*. 2475-4714
- Putri, S. 2016. Karakterisasi Enzim Selulase yang dihasilkam oleh *Lactobacillus plantarum* pada Variasi Suhu, pH , dan Konsentrasi Substrat
- Rohishoh, N. 2012. Produksi dan Pemurnian Enzim Pektinase (Poligalakturinase) dari Bakteri *Pseudomonas stutzeri*. *Skripsi*. Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.
- Santos, T.C., Gomes, D.P.P., Bonomo. R.C.F., Franco, M. 2012. Optimisation of Solid State Fermentation of Potato Peel for The Production of Cellulolytic Enzyme. *Food Chermistry*. 133; 1299 – 1304
- Septiani, A. 2017. Produksi Enzim Selulase Dari Bakteri *Serratia marcescens* KE-B6 Dengan Penambahan Sumber Karbon, Nitrogen dan Kalsium Pada Medium Produksi. Jur Biologi Universitas Diponegoro, Semarang
- Shashidhar, A., S Arza, A Das, S Bhattacharya and S Shivakumar. 2018. Neutral Avicelase from *Serratia marcescens* with Denim Biofinishing Potential. *Journal of Scientific & Industrial Research* Vol. 77
- Sonia N.M.O. dan Kusnadi J. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Selulase dari Isolat Bakteri OS-16 Asal Padang Pasir Tengger-Bromo. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol. 3 No 4 p.11-19
- Sukmawati. 2018. Isolasi Bakteri dari Limbah Kulit Pisang. *BIOTROPIC The Journal of Tropical Biology* Vol 2 No 1
- Tari, C., Dogan, N., and Gogus, N., 2008. Biochemical and Thermal Characterization of Crude Exo-polygalacturonase Produces by *Aspergillus sojae*. *Food Chemistry*. 111: 824-829.
- Wang, K., Pei-Shen Yang, and Li-xin Cao. 2014. Chitinase from a Novel Strain of *Serratia marcescens* JPP1 for Biocontrol of Aflatoxin: Molecular Characterization and Production Optimization Using Response Surface Methodology. *BioMed Research International*.
- Wijanarka, E. Kusdiyantini and S. Parman. 2016. Screening Cellulolytic Bacteria from the Digestive Tract Snail (*Achantina fulica*) and Test the Ability of Cellulase Activity. *Journal of Biologi & Biologi Education* 8 (3): 385-391