

Isolasi dan Karakterisasi Selulase dari Bakteri Selulolitik Termofilik Kompos Pertanian Desa Bayat, Klaten, Jawa Tengah

Moch Syaiful Alam, Purbowatiningrum R Sarjono, Agustina L N Aminin
Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Email: agustina_ina@undip.ac.id

ABSTRAK

Hidrolisis selulosa secara enzimatis dilakukan oleh selulase. Selulase termostabil lebih disukai oleh industri karena mempunyai aktifitas optimum pada suhu tinggi dan tahan kontaminan. Selulase termostabil dapat diisolasi dari bakteri yang berasal dari kompos termofilik. Penelitian ini bertujuan mendapatkan isolat bakteri selulolitik termofilik dari kompos pertanian fase termofil, mendapatkan selulase termostabil dan mendapatkan data karakteristik selulase termostabil yang meliputi pH dan suhu optimum. Hasil penelitian mendapatkan dua isolat bakteri selulolitik (KB dan KK), dimana isolat KB relatif lebih optimal tumbuh dibanding KK. Unit aktifitas spesifik selulase tertinggi isolate KB didapatkan pada 20-40% amonium sulfat sebesar 5,539 unit/mg, dengan aktifitas optimum pada suhu 55 °C dan pH 8.

Kata kunci: selulase, bakteri selulolitik, kompos termofilik

PENDAHULUAN

Dalam beberapa dekade terakhir ini, studi tentang bioenergi telah banyak dilakukan antara lain, studi tentang biofuel menjadi subjek utama penelitian sejak adanya krisis energi mulai tahun 1970, biofuel yang dibuat dari bahan baku bahan pangan (Patzek, 2004) dan (Pimentel D, 2005) selain bersumber dari bahan pangan, bahan baku yang murah dan paling potensial untuk produksi bioenergi yaitu dari bahan baku lignoselulosa (Pettersson dkk., 2007). Selulosa merupakan biomassa yang jumlahnya berlimpah di alam, murah dan masih kurang maksimal pemanfaatannya karena mahalnya proses pengolahan selulosa (Lee dkk., 2007). Selulosa merupakan polimer glukosa yang berikatan dengan ikatan 1,4- β glikosidik, sehingga proses hidrolisis selulosa merupakan proses yang paling penting dalam produksi bioenergi. Hidrolisis selulosa dapat dilakukan secara biologis, kimia, maupun enzimatis (Askarieh dkk., 2000). Hidrolisis selulosa secara enzimatis lebih efektif untuk dilakukan karena menghasilkan produk yang spesifik dan lebih banyak, hasil samping sedikit, ramah lingkungan (Nishida, 2007). Hidrolisis selulosa secara enzimatis dilakukan oleh selulase (Beguin, 1994). Selulase dapat dihasilkan oleh bakteri dan jamur.

Mikroorganisme ini dapat bersifat aerob atau anaerob dan mesofilik atau termofilik (Duff, 1996). Selulase dapat diproduksi dari mikroorganisme yang berasal dari berbagai sumber, antara lain dari mikroorganisme yang berasal dari lambung sapi (Bai, 2012), kompos pertanian (Baharuddin, 2010) dan juga dari hewan invertebrata pemakan selulosa seperti ulat dan siput (Gupta, 2011). Selulase dibutuhkan dalam berbagai jenis industri, antara lain industri makanan dan minuman, industri pulp dan kertas, industri tekstil, industri deterjen, industri pakan ternak dan pertanian (Bath, 2000). Sebagian besar proses produksi dalam industri tersebut dilakukan pada suhu tinggi sehingga selulase yang bersifat termostabil lebih efektif untuk digunakan karena tahan terhadap suhu tinggi dan tetap mempunyai aktivitas optimum pada suhu tinggi. Selulase termostabil mempunyai beberapa keunggulan, antara lain dapat meningkatkan laju reaksi dengan jumlah enzim yang lebih sedikit dan mempunyai kemungkinan yang rendah terhadap kontaminasi bakteri (Baharuddin, 2010). Enzim termostabil merupakan enzim yang tahan terhadap suhu tinggi (Maloney, 2002). Selulase termostabil dapat diproduksi oleh bakteri termofilik yang diisolasi dari kompos pada fase termofilik (Baharuddin, 2010). Mikroorganisme termofilik merupakan mikroorganisme yang

tahan terhadap suhu tinggi dengan suhu optimum pertumbuhan mencapai lebih dari 60 °C (Trismilah dkk., 2005). Bakteri pada kompos yang dapat memproduksi selulase antara lain, *Bacillus* spp., *Thermus* spp., *Streptomyces* spp., *Aspergillus* spp. (Strom, 1985); (Beefa dkk., 1996) ; (McCaig dkk., 2001) dan (Song dkk., 2001). Pada penelitian ini dilakukan isolasi bakteri penghasil selulase dari kompos pertanian desa Bayat, Klaten. Selulase kemudian diisolasi dari isolat bakteri kompos pertanian terpilih dan dilakukan karakterisasi terhadap enzim yang dihasilkan. Karakterisasi selulase meliputi pH optimum enzim dan suhu inkubasi optimum aktivitas enzim.

METODOLOGI

Bahan

ekstrak ragi, *beef extract*, pepton, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , FeCl_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CMC (*Carboxymethylcellulose*), asam 3,5-dinitrosalisilat, NaH_2PO_4 , kalium natrium tartrat, NaOH , Fenol, Na_2SO_3 , glukosa, bacto agar, buffer natrium fosfat pH 6 ; 6,5; 7; 7,5; 8, buffer Glisin- NaOH pH 8,5; Larutan BaCl_2 , membran selofan, BSA (*Bovine Serum Albumin*), Ammonium Sulfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, larutan *Folin Ciocalteu's Phenol*.

Inokulasi Isolat Bakteri Kompos Termofil pada Media CMC Cair

Sebanyak 0,5 mL suspensi kompos diinokulasikan dalam 50 mL media CMC cair, diinkubasi pada suhu 55 °C selama 3 hari (Al Bashori, 2011). Setiap 100 mL media CMC cair mengandung ekstrak ragi 0,2 g, *beef extract* 0,4 g, pepton 0,51 g, KH_2PO_4 0,1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g, CaCl_2 0,3 g, FeCl_3 0,028 g, Na_2HPO_4 0,1 g, dan CMC 0,5 g (Baharuddin dkk., 2010). Suhu optimum pertumbuhan dilakukan dengan diinkubasi selama 3 hari dengan variasi suhu 50°C, 55°C, dan 60°C yang diukur kekeruhannya dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada $\lambda = 600$ nm.

Seleksi Isolat Bakteri Selulolitik Termofilik

Isolat bakteri ditumbuhkan kembali pada media CMC padat untuk mendapatkan isolat-isolat tunggal dengan metode sebar dan gores media CMC padat, diinkubasi pada suhu optimum selama 3 hari. Setiap 100 mL media CMC padat

mengandung ekstrak ragi 0,2 g, *beef extract* 0,4 g, pepton 0,51 g, KH_2PO_4 0,1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g, CaCl_2 0,3 g, FeCl_3 0,028 g, Na_2HPO_4 0,1 g, CMC 0,5 g dan bacto agar 2,5 g (Baharuddin dkk., 2010). Masing-masing isolat diinokulasikan dalam media CMC cair, diinkubasi pada suhu optimum selama 3 hari, pada kondisi non-aerasi dan ditentukan jumlah selnya.

Isolasi Selulase

Sebanyak 10 mL kultur isolat ditambahkan ke dalam 1 L media CMC cair. Kultur diinkubasi dalam inkubator pada suhu optimum dan waktu optimum. Kultur disentrifugasi dan supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar selulase (EK).

Pemurnian Selulase

Ekstrak kasar selulase yang telah didapatkan, ditambahkan dengan amonium sulfat secara perlahan-lahan dengan pengadukan menggunakan pengaduk magnetik dalam keadaan dingin hingga larut dan disimpan selama semalam dalam kulkas. Jumlah amonium sulfat yang ditambahkan berdasarkan tabel kejenuhan amonium sulfat yaitu F1(0-20%), F2 (20-40%), F3 (40-60%), F4 60-80% dan F5 (80-100%). Campuran disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada 4°C, kemudian endapan yang diperoleh dipisahkan dan disuspensikan dalam 0,05 M bufer natrium fosfat pH 7. Dilanjutkan dengan dialisis menggunakan membran selofan.

Penentuan Aktivitas Selulase

Aktivitas selulase diukur dari selisih absorbansi dari hasil inkubasi selulase aktif dan selulase inaktif. Aktivitas selulase diukur pada tiap fraksi enzim dengan cara mencampurkan 0,1 mL selulase, 1 mL substrat CMC dalam bufer fosfat 0,05 M pH 7 dan diinkubasi pada suhu inkubasi optimum selama 30 menit. Untuk menghentikan reaksi, ditambahkan 0,1 mL TCA. Selulase inaktif dibuat dengan cara menambahkan 0,1 mL TCA. Selulase inaktif ditambahkan 1 mL substrat CMC dalam bufer fosfat 0,05 M pH 7 lalu diinkubasi selama 30 menit. Sebanyak 1 mL hasil inkubasi ditambahkan dengan 1 mL reagen DNS. Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit, kemudian diencerkan dengan akuades hingga volume 10 mL dan absorbansi

diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Unit aktivitas spesifik ditentukan berdasarkan unit aktivitas enzim terhadap kadar protein yang ditentukan dengan metode Lowry.

Karakterisasi pH dan Suhu Optimum

Karakterisasi pH dan suhu optimum enzim dilakukan seperti penentuan aktivitas selulase. Variasi pH bufer yang digunakan untuk melarutkan substrat CMC yaitu pH 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5. Sedangkan karakterisasi suhu dilakukan dengan memvariasikan suhu inkubasi selulase pada 40, 45, 50, 55 dan 60 °C.

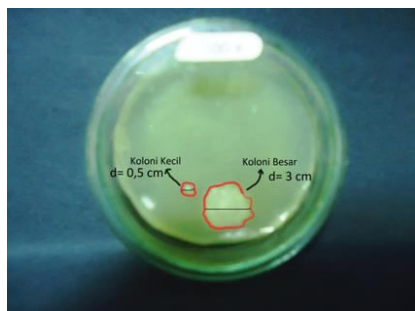
HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi Isolat Bakteri yang Paling Efektif Menghasilkan Enzim Selulase

Isolat bakteri ditanam pada media padat CMC dengan metode *streak*, *spread* dan *pengenceran* untuk memperoleh isolat tunggal bakteri selulolitik termofilik dalam bentuk koloni yang tumbuh pada suspensi kompos, dikultivasi pada suhu 50 °C. Pada hari ketiga tampak dua koloni bakteri, yang diberi nama KB (Koloni Besar) dan KK (Koloni Kecil), berdasarkan karakteristiknya seperti pada tabel 1. Langkah selanjutnya masing-masing koloni ditumbuhkan pada media CMC baru untuk penentuan isolat yang paling efektif dalam menghasilkan enzim selulase.

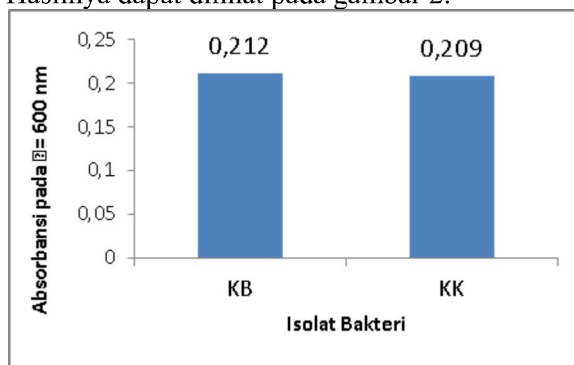
Tabel 1. Karakteristik isolat bakteri KK dan KB

Isolat Koloni	Morfologi		
	Warna	Bentuk	Tepi
KB	Putih tulang	Bulatan besar, menyatu	tidak beraturan
KK	Bening	Bulatan kecil, menyebar	Tidak beraturan



Gambar 1. Isolat bakteri KK dan KB

Seleksi isolat bakteri koloni kecil (KK) dan isolat koloni besar (KB) dilakukan untuk mengetahui kemampuan tumbuh masing-masing isolat tunggal bakteri selulolitik termofilik dalam media CMC, dimana kemampuan tumbuh bakteri selulolitik berbanding lurus dengan enzim selulase yang dihasilkan. Isolat bakteri yang tumbuh efektif dalam media CMC cair pada kondisi kultivasi non-aerasi ditunjukkan dengan banyaknya sel yang tumbuh pada media CMC. Hal ini dikarenakan pada kondisi sebenarnya bakteri kompos berada pada tempat yang tertimbun didalam kompos yang minim oksigen (mikroaerofil). Kondisi optimum bakteri KB dalam dalam menghasilkan enzim selulase dilihat dari kekeruhannya, semakin keruh berarti semakin banyak sel yang ada, sehingga enzim selulase yang dihasilkan akan semakin banyak. Adanya oksigen menjadi faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan sel bakteri, namun bagi sebagian isolat bakteri, adanya oksigen justru menghambat pertumbuhan sel (Yung dkk., 2010). Jumlah sel yang tumbuh diasumsikan berbanding lurus dengan banyaknya enzim yang diproduksi. Banyaknya sel ditunjukkan dengan kekeruhan media yang diukur dengan Spektrofotometer *UV-Vis* dengan $\lambda = 600$ nm. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Grafik efektifitas pertumbuhan isolat KB dan KK

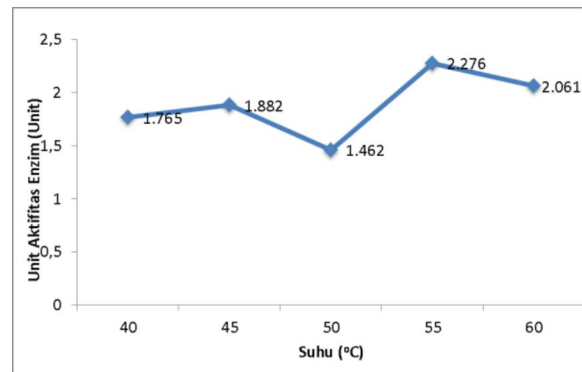
Dari gambar IV.2 terlihat bahwa pada isolat KB (Koloni Besar) dengan kondisi kultivasi non-aerasi menunjukkan serapan yang sedikit lebih besar dari isolat KK (koloni Kecil). Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri KB tumbuh sedikit lebih optimal dari pada isolat bakteri KK.

Karakterisasi Selulase

Enzim merupakan biokatalisator yang tersusun atas bagian protein, oleh karena itu sistem kerja

enzim sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti pH dan suhu. Penentuan kondisi optimum kerja enzim penting untuk dilakukan agar reaksi enzimatik dapat berjalan dengan optimal. Penelitian ini dilakukan penentuan karakteristik selulase hasil isolasi dan purifikasi yang meliputi penentuan suhu optimum dan pH optimum. Suhu dan pH akan mempengaruhi konformasi protein enzim dan berpengaruh terhadap kemungkinan pengikatan substrat oleh enzim.

Temperatur dalam reaksi enzimatik merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kecepatan dan aktivitas enzim dalam menghasilkan produk, pada kondisi temperatur optimum, reaksi enzimatik akan lebih cepat dan mempunyai aktivitas enzim maksimum. Peningkatan temperatur menyebabkan aktivitas selulase meningkat. Hal ini disebabkan oleh temperatur yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dengan enzim membentuk kompleks enzim-substrat akibatnya produk yang dihasilkan juga semakin meningkat. Peran suhu dalam reaksi enzimatik yaitu meningkatkan interaksi antara substrat dengan enzim. Adanya perubahan suhu juga akan mempengaruhi ikatan hidrogen atau interaksi hidrofobik yang berperan dalam menjaga konformasi molekul enzim (Wijaya, 2005); (Van de Burg, 2003) dan (Bruins dkk., 2001). Jauh di atas temperatur optimum enzim akan mengalami denaturasi dan kehilangan aktivitas katalitiknya (inaktivasi). Proses inaktivasi enzim pada temperatur yang sangat tinggi diawali dengan pembukaan struktur molekul enzim akibat putusannya ikatan hidrogen, sehingga terjadi perubahan konformasi pada struktur asam amino-asam amino tertentu baik pada sisi aktif maupun pada protein pendukung pada enzim, akibatnya enzim menjadi inaktif atau mengalami penurunan aktivitas enzim. Pengaruh temperatur pada aktivitas selulase dapat dilihat pada gambar 3.

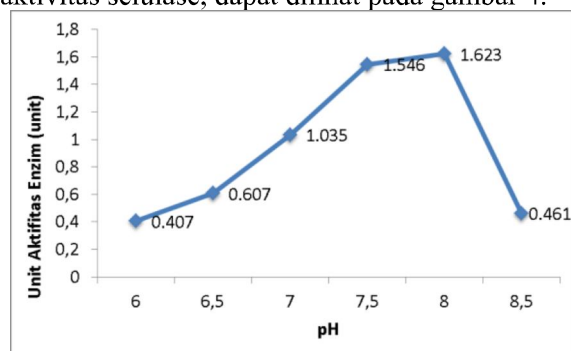


Gambar 3. Grafik pengaruh temperature terhadap aktivitas enzim

Berdasarkan gambar 3 terlihat bahwa aktivitas enzim maksimal pada saat suhu inkubasi 55 °C. Hal ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Baharuddin (2010), sedangkan Jang dan Chen (2003) mengisolasi selulase yang mempunyai aktivitas optimum pada suhu inkubasi 50 °C. 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. Denaturasi protein akan menyebabkan perubahan konformasi pada protein enzim. Substrat juga dapat berubah konformasinya pada suhu yang tidak sesuai, sehingga substrat tidak dapat masuk ke dalam sisi aktif enzim (Meryandini, 2009). Pada suhu 55 °C merupakan suhu optimum bagi selulase yang diisolasi dari isolat bakteri KB kompos pertanian desa Bayat, Klaten.

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh pH, karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Perubahan pH atau pH yang tidak sesuai akan menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim berubah, selain itu perubahan pH juga menyebabkan denaturasi enzim dan mengakibatkan turunnya aktivitas enzim (Meryandini, 2009). Pengaruh pH dalam larutan enzim akan melibatkan konsentrasi ion H⁺. Perubahan konsentrasi H⁺ dapat mempengaruhi sifat ionik rantai samping residu asam amino di sisi aktif maupun di luar sisi aktif

enzim tersebut. Aktivitas enzim yang menurun disebabkan adanya perubahan pH akibat berubahnya keadaan ion enzim ataupun keadaan ion substrat (Palmer, 1981) sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat tidak optimal, akibatnya aktivitas enzim menurun. Berikut merupakan grafik pengaruh pH terhadap aktivitas selulase, dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas selulase

Berdasarkan gambar 3.4 dapat dilihat bahwa pH 8 merupakan pH optimum dimana aktivitas enzim mencapai maksimum yaitu sebesar 1,623 U/mL. Hasil ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Meryandini (2009) yang menemukan bahwa pH optimum selulase yang diisolasi dari bakteri tanah pada pH 7. Perbedaan ini disebabkan karena sumber isolat dan *strain* bakteri yang berbeda, sehingga menghasilkan karakteristik selulase yang berbeda pula, dimana asam amino penyusun enzim juga berbeda, tentunya pengaruh terhadap pH juga akan menghasilkan perbedaan aktivitas enzim.

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mendapatkan isolat bakteri selulolitik termofilik dari kompos pertanian desa Bayat, Klaten Jawa Tengah yakni isolat bakteri KB dan KK. Selulase termotabil berhasil diisolasi dari isolat KB dengan unit aktivitas spesifik selulase tertinggi pada fraksi 20-40% ammonium sulfat sebesar 5,539 unit/mg. Karakteristik optimum selulosa diperoleh pada suhu 55 oC dan pH 8.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Al Bashori, K.A., 2011, Isolasi Komunitas Bakteri Termofilik Selulolitik dari Kompos Identifikasi secara Fenotipik dan Genotipik

- dengan Metode SSCP, *Skripsi*, Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro, Semarang
- [2] Aminin, A.L.N., Madayanti, F., Aditiawati, P., dan Akhmaloka, 2007, 16S Ribosomal RNA-Based Analysis of Thermophilic Bacteria in Gedongsongo Hot Spring, *Microbiology Indonesia*, Vol. 1, No.1, ISSN 1978-3477
- [3] Baharuddin, A.S., Razak, M.N.A., Hock, L.S., Ahmad M.N., Aziz, S.A., Rahman, N.A.A dan Shah, U.K.M., 2010, Isolation and Characterization of Thermophilic Cellulase-Producing Bacteria from Empty Fruit Bunches-Palm Oil Mill Effluent Compost, *American Journal of Applied Sciences*, 7: 56-62
- [4] Bai, S., Kumar, R.M., Kumar, D.J., Mukesh, Balashanmugam P, Kumaran. Bala M.D., dan Kalaichelvan P.T., 2012, Cellulase Production by *Bacillus subtilis* isolated from Cow Dung, Department of Biotechnology, *KSR College of Arts and Science*, Tiruchengode, TN, India
- [5] Bhat, M.K., 2000, Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnol Adv.*, 18, 355–383
- [6] Bruins, Janssen dan Boom, 2001, Thermoenzyme And Their Application, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 90, 156-184
- [7] Jang, H.D., dan Chen, K.S., 2003, Production and Characterization of Thermostable Cellulases from *Streptomyces* Transformant T3-1, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19: 263–268
- [8] Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T.C., Rachmania, N., dan Satria, H., 2009, Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya, *Makara Sains*, Vol. 13, No. 1, 33-38
- [9] Palmer ,T., 1981, *Understanding Enzymes*, England : Ellis Horwood
- [10] Rahayu, s, Fredy T, Maggy T., J.K. Hwang, dan Y.R. Pyun, 1999, Eksplorasi Bakteri Termofilik Penghasil Kitinase asal Indonesia, *Penelitian Ilmu Hayat*, IPB
- [11] Tika, I.N, Redhana I.W dan Ristiati, N.P, 2007, Isolasi Enzim Lipase Termotabil Dari Bakteri Termofilik Isolat Air Panas Banyuwedang Kecamatan Gerogak,

- Buleleng Bali, *Akta Kimindo Vol. 2 No. 2: 109 – 112*
- [12] Trismilah, D dan Sumaryanto, 2005, Produksi Xilanase Pengaruh Komposisi Media Pada Produksi Xilanase dari *Bacillus stearothermophilus* DSM 22 Menggunakan Substrat Kulit Pisang, *Jurnal Sains dan Teknologi BPPT*, vol.II, 66-69
- [13] Van den Burg, B., 2003, Extremophiles as a Source for Novel Enzymes, *Elsevier: Current Opinion in Microbiology*, 6, 213-218
- [14] Wijaya, Rudi, 2005, Karakteristik Enzim Serupa Tripsin dari Cacing Tanah, *Tesis*, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- [15] Yung-Chung Lo, Wei-Chung Lu, Chun-Yen Chen, Wen-Ming Chen, dan Jo-Shu Chang, 2010, Characterization and high-level production of xylanase from an indigenous cellulolytic bacterium *Acinetobacter junii* F6-02 from southern Taiwan soil, *Biochemical Engineering Journal* 53 77–84