

ISOLASI BAKTERI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM SELULOLITIK DARI SEDIMEN MUARA DAERAH ALIRAN SUNGAI SIAK WILAYAH KABUPATEN BENGKALIS DAN PERAIRAN DUMAI

Dian Permata Sari, Silvera Devi, Yuli Haryani

**Mahasiswa Program Studi S1 Kimia
Bidang Biokimia Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau
Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia
*dianpermatasari92.ds@gmail.com***

ABSTRACT

Isolation of cellulolytic bacteria has been investigated because this bacteria produces cellulase enzyme which has important role in various industry applications. In this research, isolation of cellulolytic bacteria was originated from sediment samples that was taken from 4 sampling points in estuary watershed of Siak River Bengkalis area and Dumai waters, which were 925 point (Siak River), 929 point (Pelabuhan Roro Pakning), 930 point (Bengkalis Strait), and 931 point (Dumai). Isolates of cellulolytic bacteria were identified with Gram staining method, the enzyme activities were measured with Nelson-Somogyi method. The results of identification showed 1 isolate was Gram positive and 15 isolates were Gram negative. The highest cellulase activity was obtained from 931-3S isolate $(0.735 \pm 0.03) \times 10^{-3}$ U/mL, and it was not significant different with 929-1S, 929-2S, 929-3S, 930-3S isolates.

Keywords: Cellulolytic bacteria, cellulase enzyme, enzyme activity, Gram staining.

ABSTRAK

Isolasi bakteri selulolitik sampai saat ini masih terus dilakukan karena bakteri ini dapat menghasilkan enzim selulase yang memiliki peranan penting dalam berbagai bidang industri. Isolasi bakteri selulolitik pada penelitian ini berasal dari sampel sedimen yang diambil dari empat titik sampling di Muara DAS Siak wilayah Kabupaten Bengkalis dan perairan Dumai yaitu titik 925 (Sungai Siak), 929 (Pelabuhan Roro Pakning), 930 (Selat Bengkalis) dan 931(Dumai). Isolat bakteri selulolitik yang diperoleh dianalisis dengan pewarnaan Gram untuk identifikasi bakterinya dan uji aktivitas enzim selulase dengan metode Nelson-Somogyi. Hasil identifikasi diperoleh 1 isolat bakteri Gram positif dan 15 isolat bakteri Gram negatif. Aktivitas enzim selulase tertinggi dihasilkan oleh isolat 931-3S yaitu sebesar $(0,735 \pm 0,03) \times 10^{-3}$ U/mL, dan tidak berbeda nyata dengan isolat 929-1S, 929-2S, 929-3S, dan 930-3S.

Kata Kunci: Aktivitas enzim, bakteri selulolitik, enzim selulase, pewarnaan Gram.

PENDAHULUAN

Sungai Siak merupakan salah satu dari empat sungai besar yang terdapat di Provinsi Riau. Daerah Aliran Sungai (DAS) Siak melewati empat wilayah kabupaten dan satu wilayah kota yang seluruhnya terdapat di Provinsi Riau yaitu, Kabupaten Rokan Hulu, Kabupaten Kampar, Kabupaten Siak, Kabupaten Bengkalis, dan Kota Pekanbaru (Departemen Pekerjaan Umum, 2005). Di sepanjang DAS Siak banyak terdapat aktivitas industri seperti industri perkayuan, pengolahan karet, perkebunan sawit, dan pabrik pengolahan sawit yang menghasilkan limbah industri (Amri, 2007). Salah satu jenis limbah yang biasa ditemukan dari aktivitas industri tersebut adalah selulosa. Selulosa merupakan polisakarida yang terdiri dari monomer-monomer glukosa berantai lurus, yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glikosidik (Gupta dkk, 2012).

Limbah selulosa berpotensi mencemari DAS Siak, limbah tersebut akan terus mengalir sampai ke muara Sungai Siak yang berada di daerah Kabupaten Bengkalis hingga menuju ke perairan laut. Sebagian dari limbah tersebut akan mengendap pada sedimen. Adanya selulosa yang mengendap pada sedimen dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme selulolitik sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya. Salah satu mikroorganisme yang mampu memutuskan ikatan β -1,4 glikosidik pada molekul selulosa menghasilkan unit-unit glukosa dengan bantuan enzim selulase adalah bakteri selulolitik (Singh dkk., 2013). Bakteri selulolitik yang diketahui dapat memproduksi enzim selulase secara efektif adalah *Bacillus amyloliquefaciens* dan *Streptomyces omiyaensis* dengan aktivitas enzim selulase sebesar 0.079

Unit dan 269,44 Unit (Alam dkk., 2004; Singh dkk., 2013).

Pada saat ini isolasi bakteri yang dapat menghasilkan enzim selulase terus dilakukan untuk mendegradasi limbah-limbah selulosa yang mengandung selulosa, disamping itu enzim selulase juga memiliki peranan penting dalam berbagai bidang industri seperti industri bioetanol, tekstil, kertas, makanan, dan juga dimanfaatkan dalam penanganan limbah pertanian yang mengandung selulosa (Meryandini dkk., 2009; Prasad dkk., 2013). Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi bakteri selulolitik dan uji aktivitas kemampuan selulolitik dari sampel sedimen yang diambil pada empat titik stasiun sampling di muara DAS Siak wilayah Kabupaten Bengkalis dan di perairan Dumai yaitu titik 925 di DAS Siak Kab. Bengkalis, 929 di pelabuhan roro Pakning, 930 di Selat Bengkalis dan 931 di Dumai. Pengambilan sampel pada keempat titik ini berdasarkan pada perbedaan nilai salinitas air yang terjadi disepanjang aliran sungai.

METODE PENELITIAN

a. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis (*Thermoscientific genesys 10S*), Autoclave (*All American Model No.2X*), Waterbath (*Grant Instrument Type SUB 28*), Shaking Incubator (*Labtech Model LS1- 3016R Serial No. B110221102*), Microcentrifuge (*Hareous Instrument Biofuge Pico D-37520 Osterode*), Mikroskop (*Optic Ivymen System No. 05141*).

Bahan-bahan yang digunakan adalah sedimen hasil sampling di muara DAS Sungai Siak daerah Kab. Bengkalis

dan perairan Dumai, *Carboxymethyl cellulose* (CMC) (Brataco Chemika J1438/4), *Nutrient Agar* (Merck, No.Kat.1.05450.0500), *Nutrient Broth* (NB) (Merck, No.Kat.1.05443.0500), media isolasi bakteri (Agar 15 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, KNO_3 0,75 g/L, K_2HPO_4 0,02 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,04 g/L, ekstrak khamir 2 g/L dan CMC 10 g/L), media produksi enzim ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $\text{Co}(\text{NH}_2)_2$ 0,3 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0092 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,003 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0027 g/L, CMC 10 g/L), reagen Nelson-Somogyi, reagen arsenomolibdat, dan bahan-bahan lain.

b. Isolasi bakteri pada media padat CMC

Sebanyak 1 g sampel sedimen diinokulasikan ke dalam 9 mL media cair NB steril, diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 24 jam, kemudian suspensi isolat digoreskan (*streak plate method*) ke media padat 1% CMC dan diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh pada media tersebut kemudian diidentifikasi dengan pewarnaan Gram dan digunakan untuk memproduksi enzim selulolitik (selulase).

c. Produksi enzim selulase

Isolat bakteri yang tumbuh pada media padat yang mengandung 1% CMC diinokulasikan ke media NB, lalu diinkubasi selama ± 16 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan agitasi 120 rpm. Selanjutnya inokulum tersebut diukur kekeruhan sel bakterinya atau *optical density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm. Inokulum dengan OD senilai 0,5

dimasukkan masing-masing kedalam 100 mL media produksi enzim selulase, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm dalam *shaking incubator*.

Masing-masing media produksi enzim yang mengandung ekstrak kasar enzim, didinginkan dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit selanjutnya ekstrak kasar enzim ditentukan aktivitasnya berdasarkan gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat CMC dengan metode Nelson-Somogyi.

d. Penentuan kadar gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi

Gula pereduksi yang dihasilkan dari aktivitas enzim selulase dengan substrat CMC diukur dengan menggunakan metode Nelson Somogyi. Tabung uji diisi dengan 0,5 mL substrat CMC 2 % dan tabung kontrol dibiarkan kosong, dan tabung blanko diisi dengan 1 mL larutan bufer fosfat 0,05 M pH 7, kemudian ketiga tabung dimasukkan ke dalam *waterbath* dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 40°C , selanjutnya tabung uji dan kontrol ditambahkan 0,5 mL ekstrak kasar enzim tanpa mengeluarkan tabung dari dalam *waterbath* kemudian diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 40°C , semua mulut tabung reaksi ditutup dengan kelereng. Setelah inkubasi 30 menit tabung uji, kontrol dan blanko dikeluarkan dari *waterbath*.

Reagen Nelson-Somogyi ditambahkan masing-masing 0,5 mL kedalam tiga tabung reaksi dan untuk tabung kontrol ditambahkan 0,5 mL substrat CMC 2%. Semua tabung reaksi dipanaskan kembali dalam penangas air selama 20 menit, selanjutnya tabung uji, kontrol, dan blanko didiamkan hingga suhu kamar dan ditambahkan 0,5 mL

reagen arsenomolibdat, biarkan selama 5 menit. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan lagi 3 mL akuades dan didiamkan kembali selama 30 menit, jika terdapat endapan larutan disentrifugasi pada 9500 rpm selama 10 menit. Endapan dibuang kemudian absorbansi filtrat diukur. Standar glukosa dibuat dengan berbagai konsentrasi 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5 µg/mL. Absorbansi masing-masing larutan standar dan sampel diukur dengan spektrofotometer UV-Vis Genesis 10S pada λ 540 nm (Clark dan Switzer, 1997).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri selulolitik dari sampel sedimen Sungai Siak (925), Pelabuhan Roro Pakning (929), Selat Bengkalis (930), dan Dumai (931) yang dilakukan pada media padat yang mengandung CMC 1% menghasilkan 16 isolat.

Masing-masing inokulum dari 16 isolat dimasukkan ke dalam media produksi enzim dengan nilai OD yang sama. Asumsinya adalah jumlah sel inokulumnya sama. Ekstrak kasar enzim selulase yang dihasilkan diukur aktivitas enzim selulasenya menggunakan substrat CMC.

Aktivitas ekstrak kasar enzim selulase tertinggi diperoleh dari isolat 931-3S (Dumai) yaitu sebesar $(0,735 \pm 0,03) \times 10^{-3}$ U/mL dan tidak berbeda nyata ($P \leq 0,05$) dengan aktivitas enzim dari isolat 929-1S, 929-2S, 929-3S (Pelabuhan Roro Pakning), dan 930-4S (Selat Bengkalis) (Tabel 1).

Tabel 1. Rata-rata aktivitas enzim selulase dari setiap isolat bakteri selulolitik.

Kode isolat	Aktivitas Enzim Selulase ($\times 10^{-3}$ U/mL)
925-1S	$0,415 \pm 0,11^{cdef}$
925-2S	$0,499 \pm 0,10^{bcde}$
925-3S	$0,302 \pm 0,07^{ef}$
925-4S	$0,254 \pm 0,07^f$
929-1S	$0,716 \pm 0,07^a$
929-2S	$0,547 \pm 0,19^{abcd}$
929-3S	$0,650 \pm 0,12^{ab}$
929-4S	$0,490 \pm 0,23^{bcde}$
930-1S	$0,339 \pm 0,10^{def}$
930-2S	$0,311 \pm 0,03^{ef}$
930-3S	$0,320 \pm 0,06^{ef}$
930-4S	$0,575 \pm 0,09^{abc}$
931-1S	$0,481 \pm 0,07^{bcde}$
931-2S	$0,462 \pm 0,19^{bcdef}$
931-3S	$0,735 \pm 0,03^a$
931-4S	$0,311 \pm 0,05^{ef}$

Catatan: Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ($p \leq 0,05$) berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Perbedaan aktivitas enzim selulase dari masing-masing isolat dapat terjadi karena setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda tergantung dari gen yang dimiliki. Hal ini juga sesuai dengan penelitian Rathnan dkk. (2013) yaitu mendapatkan 3 isolat dari limbah selulosa, tanah dan limbah buah-buahan yang memiliki aktivitas enzim selulase berbeda-beda walaupun terdapat 2 isolat yang masih dalam satu genus yaitu isolat NASCB-5 (*Bacillus* sp), NASCB-8 (*Bacillus* sp), NASCB-14 (*Pseudomonas* sp) dengan aktivitas masing-masing secara beturut-turut yaitu 0,451 U/mL, 0,212 U/mL, dan 0,120 U/mL. Setiap bakteri selulolitik memiliki kemampuan yang berbeda dalam mendegradasi substrat karena dipengaruhi oleh gen penyusunnya. Gen merupakan fragmen

DNA yang memiliki urutan basa tertentu yang akan mempengaruhi sintesis protein, sehingga beberapa protein enzim selulase yang dihasilkan dari genus yang sama bisa memiliki aktivitas enzim selulase yang berbeda apalagi dengan bakteri yang berbeda genus.

KESIMPULAN

Hasil isolasi bakteri selulolitik dari Muara DAS Siak wilayah Kab. Bengkalis dan Perairan Dumai diperoleh 16 isolat bakteri. 1 isolat bakteri Gram positif dan 15 isolat bakteri Gram negatif. Isolat 931-3S memiliki aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu sebesar $(0,735 \pm 0,03) \times 10^{-3}$ U/mL dan tidak berbeda nyata ($P \leq 0,05$) dengan isolat 929-1S, 929-2S, dan 929-3S (Pelabuhan Roro Pakning) dan 930-4S (Selat Bengkalis).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Christine Jose dan ibu Ganis Fia Kartika, M.Si yang telah banyak meluangkan waktu memberikan bimbingan, dukungan, dan petunjuk selama penelitian dan penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

Alam, M.Z., Manchur, M.A., and Anwar, M.N. 2004. Isolation, purification, characterization of cellulolytic enzymes produced by the isolate *Streptomyces omiyaensis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7 (10): 1647-1653.

Amri, T.A., 2007. Pengendalian pencemaran dalam upaya konservasi Daerah Aliran Sungai

(DAS) Siak. *Jurnal Sains MIPA* 13(2): 153-162.

- Clark, J. M., and Switzer, R. L. 1997. *Experimental Biochemistry*. 2nd edition. W.H. Freeman & Co. San Francisco.
- Departemen Pekerjaan Umum. 2005. *Penataan Ruang Daerah Aliran Sungai (DAS) Siak Provinsi Riau*. Pekanbaru.
- Gupta, P., Samant, K., and Sahu, A. 2012. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology* 578925.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T. C., Rachmania, N., dan Satria, H. 2009. Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara Sains* 13: 33-38.
- Prasad, P., Singh, T., and Bedi, S. 2013. Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil. *Journal of King Saud University – Science* 25 : 245–250.
- Rathnan, R.K., and John, D., Balasaravanan, T. 2013. Isolation, screening, identification and optimized production of extracellular cellulase from *Bacillus subtilis* using cellulosic waste as carbon source. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2(6): 2383-2386.

Singh, S., Moholkar, V. S., and Goyal, A.
2013. Isolation, identification, and
characterization of a cellulolytic
Bacillus amyloliquefaciens Strain
SS35 from rhinoceros dung.
Hindawi Publishing Corporation
728134.