

ISOLASI BAKTERI SELULOLITIK DARI PERAIRAN DUMAI

Waidil Anuar, Andi Dahliaty, Christine Jose

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

ABSTRACT

Dumai water samples are estimated to contain cellulolytic microorganisms because of farm waste. Samples 930 from Sei Pakning and 931 from Rupert Strait were water samples containing cellulolytic bacteria taken from Dumai. In this study the production of cellulase enzymes from cellulolytic bacteria in samples of 930 and 931 used CMC as a substrate. Cellulase is an enzyme that catalyses the hidrolisis of β -1-4-glycosidic bond of cellulose. All of the isolates produced cellulase and were able to degrade cellulose. The results indicated that 1% substrate gave the highest activity of Cellulase in the 931-4A (Rupert strait) $(1.186 \pm 0.319) \times 10^{-3}$ U/mL, whereas the highest specific enzyme activity of the bacterial isolates was 930-1C $(8.438 \pm 0.109) \times 10^{-3}$ U/mg.

Keywords: Cellulolytic bacteria, cellulase, enzyme activity, CMC.

ABSTRAK

Sampel air Dumai diperkirakan mengandung mikroorganisme selulolitik karena adanya limbah perkebunan. Sampel 930 yang berasal dari muara sungai Pakning dan sampel 931 yang berasal dari selat Rupert merupakan sampel air yang mengandung bakteri selulolitik yang diambil dari Perairan Dumai. Pada penelitian ini produksi enzim selulase dari bakteri selulolitik pada sampel 930 dan 931 menggunakan CMC sebagai substrat. Selulase merupakan enzim yang dapat mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan β -1-4-glikosidik dalam selulosa. Semua isolat dapat menghasilkan enzim selulase dan mampu mendegradasi selulosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi substrat 1% memberikan aktivitas enzim selulase tertinggi pada isolat 931-4A (selat Rupert) sebesar $(1,186 \pm 0,319)^a \times 10^{-3}$ U/mL, sedangkan aktivitas enzim spesifik tertinggi pada isolat bakteri 930-1C sebesar $(8,438 \pm 0,109)^a \times 10^{-3}$ U/mg.

Kata Kunci : Bakteri selulolitik, Selulase, Aktivitas enzim, CMC

PENDAHULUAN

Kota Dumai termasuk daerah dekat pantai yang merupakan kota yang sangat cepat perkembangannya di bidang industri. Sepanjang pantai Dumai terdapat perusahaan industri pengolahan "*Crude Palm Oil*" (CPO) yang rentan pencemaran lingkungan karena limbah industri yang

langsung dibuang ke perairan. Limbah pabrik kelapa sawit tersebut sebagian besar mengandung selulosa (Irawan dkk., 2008). Kandungan selulosa dalam air merupakan sumber karbon yang dapat dimanfaatkan mikroorganisme selulolitik untuk pertumbuhannya dengan cara memproduksi enzim selulase. Enzim selulase dihasilkan oleh bakteri selulolitik

untuk mendegradasi selulosa yang terdapat di dalam media pertumbuhannya (Acharya dkk., 2008). Isolasi bakteri selulolitik dapat dilakukan dimana saja terutama dari sumber-sumber yang mengandung selulosa.

Isolasi bakteri selulolitik dari air laut dengan tingkat salinitas yang tinggi masih jarang dilakukan. Sampel air dari perairan Dumai diperkirakan mengandung bakteri selulolitik. Pada penelitian ini diharapkan akan ditemukan jenis-jenis bakteri selulolitik dalam air laut yang memiliki kemampuan degradasi selulosa yang tinggi.

Enzim selulase adalah enzim ekstraseluler yang dihasilkan di dalam sel kemudian dikeluarkan ke medium pertumbuhannya untuk mendegradasi nutrisi. Enzim selulase diproduksi untuk mengkatalisis pemecahan selulosa menjadi glukosa dengan pemutusan ikatan β -1,4-glukosidik. Enzim ini sangat penting dalam proses biokonversi atau perubahan secara biologi limbah-limbah organik mengandung selulosa menjadi glukosa. Glukosa yang dihasilkan dapat dijadikan sebagai bahan baku dalam pembuatan bioetanol (Acharya dkk., 2008).

Isolasi bakteri selulolitik telah berhasil dilakukan sebelumnya dari sungai Siak dalam media selektif yang mengandung 1% *carboxymethyl cellulose* (CMC) sebagai sumber karbon dengan waktu fermentasi 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas untuk S-16 sebesar $(4,40 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ U/mL dan untuk S-22 sebesar $(13,417 \pm 0,198) \times 10^{-3}$ U/mL (Siagian, 2012). Selain itu, isolat bakteri selulolitik dari sungai Siak juga telah diuji menggunakan media ampas tebu 1,0 % sebagai sumber karbon pada suhu 25°C selama 24 jam diperoleh aktivitas S-16 sebesar $(4,67 \pm 2,64) \times 10^{-3}$ U/mL dan S-22 sebesar $(10,23 \pm 262) \times 10^{-3}$ U/mL (Suri, 2013).

Keberadaan limbah industri pengolahan sawit menimbulkan masalah

bagi lingkungan dan industri sehingga perlu untuk ditanggulangi. Salah satu penanggulangannya adalah dengan mendegradasi limbah menggunakan mikroorganisme selulolitik. Manfaat dari pengolahan ini diharapkan memperoleh produk bernilai ekonomis tinggi melalui aktivitas selulase yang dimilikinya (Acharya dkk., 2008).

METODE PENELITIAN

a. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer Genesis 10 S (*Thermo Scientific*), *Waterbath* (GRAND SUB28), *Autoclaf All American Model 1925 X/KY-23D Winscosin Aliminium Foundry Co. Inc. Manitowoc*, *Vortex Mixer H-VH-300 (HEALTH)*, pH meter FI 83141 dan peralatan kimia standar lainnya sesuai prosedur.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel air dari perairan Dumai yang diambil pada dua titik yaitu 930 dan 931, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), *Carboxymethyl cellulose* (CMC) keluaran *BDH Chemical Ltd Poole England* (No. katalog 27929) dan bahan-bahan lain yang digunakan yaitu bahan dengan tingkat analisis yang sesuai dengan metode kerja.

b. Isolasi bakteri selulolitik

Sebanyak 1 mL masing-masing sampel air diinokulasikan ke dalam 4 mL media *nutrient broth* steril, diinkubasi pada suhu 37°C selama \pm 24 jam. Isolasi bakteri selulolitik dilakukan dengan metode cawan gores pada media padat selulase yang mengandung 1% CMC (1 g CMC; 0,02 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,075 g KNO_3 ; 0,002 g K_2HPO_4 ; 0,004 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,2 g ekstrak khamir; 1,5 g agar batang), diinkubasi pada suhu 37°C selama \pm 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh pada cawan petri tersebut

diidentifikasi dengan pewarnaan Gram dan digunakan untuk produksi enzim selulase.

c. Identifikasi isolat dengan pewarnaan Gram

Bakteri yang tumbuh pada media padat yang mengandung 1% CMC diinokulasi pada media agar miring sebagai stok bakteri selulolitik. Isolat bakteri diremajakan pada media *nutrient broth*, diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 24 jam, dan selanjutnya diidentifikasi melalui pewarnaan Gram (Pratiwi, 2008).

Preparat ulas dibuat dengan mengambil 1 ose biakan bakteri dari media *nutrient broth*, selanjutnya diratakan, dikeringanginkan, dan difiksasi dengan melewati di atas api bunsen. Ulasan diberi beberapa tetes kristal violet dan dibarkan sekitar 20 detik, lalu dicuci dengan akuades mengalir, selanjutnya ulasan ditetesi dengan larutan iodin dan dibiarkan sekitar 1 menit, lalu dicuci dengan akuades mengalir. Ulasan diberi larutan pemucat (etanol 96%), dicuci dengan akuades mengalir, ditetaskan safranin di atas ulasan, dibiarkan selama 20 detik, lalu dicuci dengan akuades mengalir. Preparat dikeringkan dengan menempelkan tisu disisi ulasan, lalu dikeringanginkan, kemudian preparat ditetesi minyak imersi untuk diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100× (Pratiwi, 2008).

d. Produksi enzim selulase

Isolat bakteri yang tumbuh pada media padat yang mengandung 1% CMC diinokulasikan ke media *nutrient broth*, diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 16 jam dengan kecepatan agitasi 120 rpm. Inokulum tersebut diukur kekeruhan sel bakterinya atau *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm. Inokulum dengan OD senilai 0,5 dimasukkan masing-masing ke dalam 100 mL media

produksi enzim selulase, diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 24 jam dalam *shaking incubator* dengan kecepatan agitasi 150 rpm.

Masing-masing media produksi enzim yang terdapat kultur isolat didinginkan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C selama 1 jam, dan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit untuk mengendapkan biomassa bakteri. Supernatan disaring dengan *filter glass fiber* Whatman GF/C, Ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditentukan volume dan aktivitas enzim selulasenya dengan metode Nelson-Somogyi.

e. Aktivitas enzim selulase

Penentuan aktivitas enzim selulase melalui pengukuran konsentrasi gula pereduksi dilakukan menggunakan metode Nelson-Somogyi. Tabung uji diisi dengan 0,5 mL larutan substrat CMC 2% yang dilarutkan dengan larutan bufer fosfat 0,05 M pH 7, kemudian diinkubasi selama 5 menit di dalam *waterbath* suhu 40°C. Tanpa mengeluarkan tabung dari *waterbath* dimasukkan larutan enzim 0,5 mL dan inkubasi dilanjutkan selama 30 menit. Kerja enzim dihentikan dengan penambahan reagen Nelson-Somogyi sebanyak 0,5 mL, dan selanjutnya dipanaskan selama 20 menit dalam air mendidih, kemudian didinginkan hingga suhu sama dengan suhu kamar. Setelah dingin, ditambahkan reagen arsenomolibdat sebanyak 0,5 mL dan dihomogenkan, selanjutnya didiamkan selama 5 menit. Sebanyak 3 mL akuades ditambahkan ke dalam larutan tersebut, dihomogenkan menggunakan *vortex* dan didiamkan selama 30 menit. Tabung selama 10 menit lalu disaring karena terdapat endapan pada permukaan atas larutan. Sebagai standar dibuat larutan standar glukosa pada berbagai konsentrasi. Absorbansi larutan diukur dengan

spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 540 nm (Clark dan Switzer, 1997). Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang melepaskan 1 μmol gula pereduksi permenit.

f. Aktivitas spesifik enzim selulolitik

Penentuan aktivitas spesifik enzim selulase melalui pengukuran kadar protein enzim selulase dilakukan menggunakan metoda Lowry (Folin-Ciocalteu). Larutan enzim sebanyak 0,5 mL masing-masing dimasukkan ke dalam 6 tabung *microtube*, ditambahkan 1 mL aseton dingin 80% (-20°C), dihomogenkan, dan disimpan dalam *freezer* pada temperatur -20°C selama 30 menit. Setelah itu, setiap *microtube* disentrifugasi dalam keadaan dingin dengan mikrosentrifugator dingin (-20°C) pada kecepatan 13000 rpm selama 10 menit. Supernatan dituang dari *microtube* dan endapan protein yang diperoleh dilarutkan dengan 20 μL bufer asetat 0,05 M pH 7. Campuran dihomogenkan hingga endapan protein larut. Larutan protein yang telah dipekatkan dari 6 tabung *microtube* dikumpulkan menjadi satu dalam tabung reaksi (Lowry, 1951).

Larutan sampel protein yang telah dipekatkan diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 9,8 mL Na_2CO_3 2% 0,1 mL Natrium Kalium Tartarat 2,7%, dan 0,1 mL CuSO_4 1%. Campuran dihomogenkan menggunakan *vortex* dan didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang. Campuran ditambahkan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu, dihomogenkan dengan *vortex*, kemudian didiamkan kembali selama 30 menit pada suhu ruang (Lowry, 1951). Absorbansi larutan berwarna yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm (Alexander dan Griffiths, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Isolasi dan pewarnaan Gram

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang mampu mendegradasi selulosa menjadi bentuk yang lebih sederhana yaitu glukosa (Winarno, 1995). Glukosa merupakan suatu karbohidrat sederhana yang dapat digunakan oleh bakteri sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya. Bakteri yang dapat hidup pada media yang mengandung sumber karbon seperti polisakarida CMC merupakan bakteri yang mampu menghasilkan enzim selulase, dan bakteri ini dapat disebut dengan bakteri selulolitik. Dari hasil penelitian diperoleh dua sampel air yang mengandung bakteri dapat hidup pada media padat 1% CMC dan setelah tiga kali pengulangan diperoleh sebanyak 14 isolat. Semua isolat yang telah diisolasi mampu menghasilkan enzim selulase.

Identifikasi pewarnaan Gram masih merupakan salah satu prosedur yang paling banyak digunakan untuk menggolongkan berbagai bakteri (Pelczar dan Chan, 1986). Pewarnaan Gram digunakan untuk menentukan bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif. Perbedaan struktur, komposisi dinding sel bakteri dan permeabilitas diantara kedua kelompok dinding sel bakteri menyebabkan perbedaan warna pada bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi seperti lemak dalam persentase lebih tinggi daripada yang dikandung bakteri Gram positif. Bakteri Gram negatif juga memiliki dinding sel yang lebih tipis dibanding bakteri gram positif.

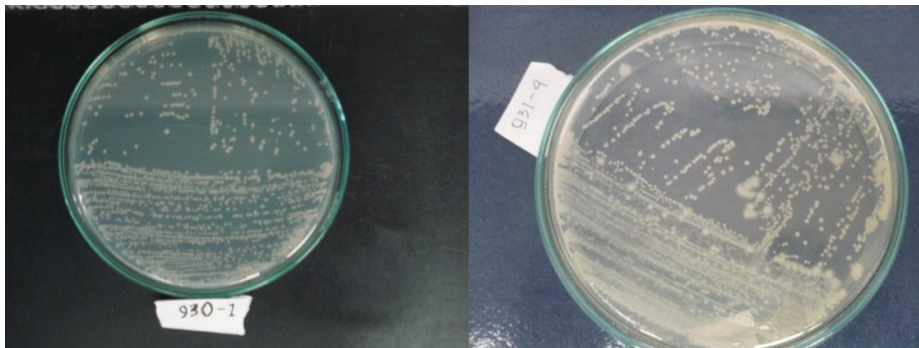
Pewarnaan Gram hanya dapat dilakukan untuk isolat bakteri 931 saja, karena semua isolat 930 pada stok mati termasuk pada stok agar miring dan gliserol. Ini menunjukkan bahwa bakteri selulolitik pada isolat 930 dan isolat 931 memiliki sifat ketahanan hidup yang

berbeda meskipun telah diberikan perlakuan yang sama. Dari hasil

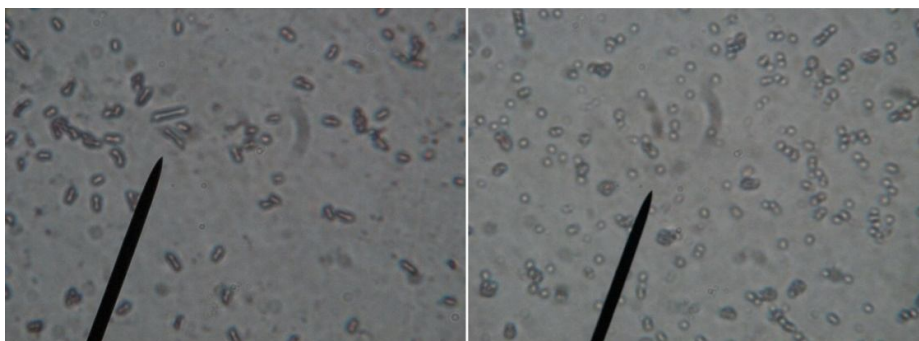
pewarnaan gram untuk isolat bakteri 931 diperoleh hasil gram negatif untuk semua

Tabel 1: Hasil pengamatan pada identifikasi Gram

Isolat	Gram Positif	Gram Negatif	Bentuk sel
931-1A	-	✓	<i>Coccus</i>
931-1B	-	✓	<i>Coccus</i>
931-1C	-	✓	<i>Coccus</i>
931-1D	-	✓	<i>Coccus</i>
931-3A	-	✓	<i>Coccus</i>
931-4A	-	✓	<i>Coccus</i>
931-2A	-	✓	<i>Bacillus</i>



Gambar 1. Isolat bakteri yang tumbuh pada media selektif untuk sampel 930 dan 931.



Gambar 2. Foto mikroskopi pewarnaan Gram pada bakteri (a) bakteri *bacillus* (b) bakteri *coccus*.

isolat. Bentuk bakteri yang diperoleh yaitu bakteri *coccus* untuk semua bakteri kecuali isolat 930-2A dengan bentuk bakteri *bacillus*.

Pewarnaan Gram berdasarkan kemampuan bakteri untuk menahan pewarna primer (kristal ungu) atau kehilangan warna primer dan menerima warna tandingan (safranin). Bakteri Gram positif akan menunjukkan warna biru atau ungu

sedangkan untuk bakteri gram negatif akan menunjukkan warna merah.

Penambahan alkohol pada bakteri gram positif menyebabkan pori-pori dalam peptidoglikan menjadi menyusut sehingga kristal violet melekat, terlarut atau luntur oleh alkohol yang mengakibatkan warna bakteri gram positif adalah violet. Sedangkan pada bakteri negatif, lipid pada outer membran larut dan lepas disertai kristal violet yang menyebabkan

permeabilitas membran sel, sehingga safranin atau zat warna pendamping diikat yang menyebabkan warna bakteri gram negatif menjadi merah.

Ketika pewarnaan, perlakuan etanol (alkohol) terhadap bakteri gram negatif menyebabkan tereksitasnya lipid sehingga memperbesar permeabilitas dinding sel Gram negatif. Sehingga kompleks ungu kristal-yodium (UK-Y), yang telah memasuki dinding sel selama langkah awal dalam proses pewarnaan, dapat tereksitasi. Hal tersebut menyebabkan Gram negatif kehilangan warna tersebut. Kandungan lipid yang rendah pada Gram positif menyebabkan kandungan lipid yang rendah terhidrasi selama perlakuan etanol. Ukuran pori-pori mengecil, permeabilitasnya berkurang, dan kompleks UK-Y tidak dapat terekstraksi.

Bakteri Gram negatif mengandung peptidoglikan yang jauh lebih sedikit pada dinding selnya dan peptidoglikan ini mempunyai ikatan silang yang kurang ekstensif dibandingkan dengan dengan bakteri Gram positif. Hal ini menyebabkan pori-pori peptidoglikan bakteri Gram negatif tetap cukup besar meskipun telah diberi etanol, kompleks UK-Y terperangkap di dalam dinding yang tampaknya mengurangi diameter pori-pori pada peptidoglikan dinding sel.

2. Produksi dan analisis aktivitas enzim selulase

Sebelum bakteri diinokulasikan ke dalam media cair produksi, setiap isolat dihitung kekeruhan atau OD (turbiditas) suspensi dalam media cair (NB). Kekeruhan ini agar jumlah bakteri setiap isolat yang diinokulasikan ke media produksi cair sama. Semakin keruh suatu suspensi, maka akan semakin banyak jumlah sel bakteri di dalamnya. Prinsip dasar dari metode ini yaitu jika cahaya mengenai sel atau spora dalam suspensi, maka cahaya akan dihamburkan. Semakin

banyak jumlah sel atau spora pada suspensi, maka akan semakin banyak cahaya yang dihamburkan. Semakin sedikit jumlah sel atau spora pada suspensi, maka akan semakin besar intensitas cahaya yang diteruskan sehingga semakin tinggi persen transmittan (Hadioetomo, 1985).

Perbedaan OD pada setiap media NB disebabkan perbedaan banyaknya jumlah sel bakteri yang terdapat di dalam media tersebut. Bakteri yang diinokulasikan pada setiap media produksi harus diusahakan sama agar jumlah sel awal sebelum produksi dianggap sama. Nutrien dalam media produksi enzim selulase dilarutkan dalam buffer fosfat dengan pH 7. Hal ini dilakukan karena aktivitas enzim dapat dipengaruhi pH. Perubahan pH pada nutrien yang telah dilarutkan dalam media produksi dapat dihindari dengan menggunakan buffer. Perubahan pH dapat mempengaruhi sifat ionik gugus hidroksil dan gugus amino pada enzim dan menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim berubah. Denaturasi enzim juga dapat disebabkan oleh perubahan pH dan mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim (Poedjadi, 1994).

Kemampuan bakteri dalam menggunakan dan menguraikan nutrien yang berupa molekul kompleks menjadi molekul sederhana untuk sumber karbonnya dapat diketahui dari produksi enzim. Enzim yang dihasilkan dalam produksi enzim tergantung pada lingkungan pertumbuhannya. Enzim selulase diperoleh apabila dalam media produksinya terdapat CMC karena bakteri harus menghidrolisis selulosa menjadi glukosa untuk mendapatkan sumber karbon yang lebih sederhana. CMC digunakan sebagai sumber karbon dan induser untuk produksi enzim selulase.

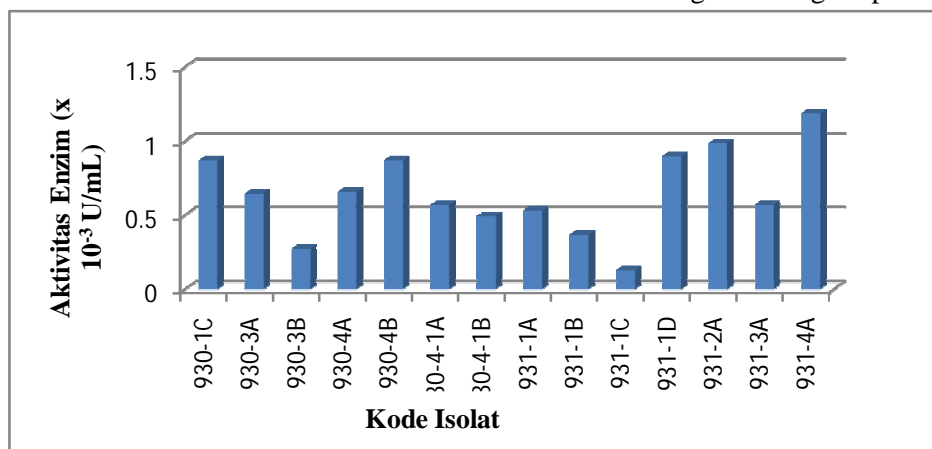
Induser merupakan substrat dari enzim yang diinduksi untuk medeaktifasi represor sehingga RNA polimerase dapat berikatan

dengan promotor dan proses transkripsi dapat berlangsung, sehingga menghasilkan enzim yang sesuai dengan substrat (Nelson dan Cox., 2001). Selulase merupakan enzim ekstraseluler dengan kompleks endo- β -1,4-glukonase karena aktif pada sisi amorf dari selulosa yang akan didegradasi secara acak untuk menghasilkan glukosa dan selobiosa.

Dari 14 isolat bakteri yang diisolasi, isolat yang memiliki aktivitas enzim selulase tertinggi adalah isolat 931-4A sebesar $(1,186 \pm 0,319) \times 10^{-3}$ U/mL walaupun tidak berbeda nyata ($p \geq 0,05$) dengan isolat 931-2A, 931-1D, 931-1C, dan 930-4B serta berbeda secara nyata ($P \leq 0,05$) dengan isolat lainnya. Aktivitas

menyebabkan beberapa selulase yang dihasilkan organisme dalam satu genus memiliki aktivitas enzim yang berbeda. Hal ini juga dapat dilihat pada data aktivitas enzim selulase dengan genus yang sama yaitu *Bacillus amyloliquefacien* dengan aktivitas 0.488 U/mL dan *Bacillus coagulans* dengan aktivitas 0.368 U/mL (Wizna dkk., 2007).

Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Siagian (2012) tentang Isolasi Bakteri Selulolitik dari Daerah Aliran Sungai (DAS) Siak di Tandun Kabupaten Rokan Hulu diperoleh aktivitas enzim pada isolat S22 sebesar $13,417 \times 10^{-3} \pm 0.0001$ U/mL. Jika dibandingkan dengan penelitian ini



Gambar 3. Grafik aktivitas rata-rata enzim selulolitik.

enzim selulase yang berbeda dari setiap isolat yang telah diisolasi dapat disebabkan oleh sifat spesifik bakteri dalam mendegradasi komponen-komponen substrat. Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda tergantung dari gen yang dimiliki karena setiap isolat memiliki gen yang berbeda (Meryandini dkk., 2009). Gen memiliki urutan basa nukleotida untuk mengkode sintesis protein. Urutan basa nukleotida yang berbeda dari setiap isolat bakteri

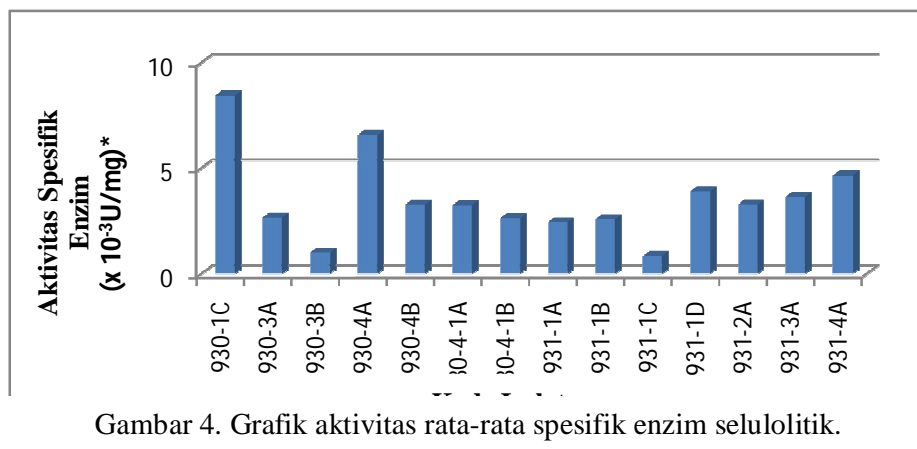
dengan menggunakan media dan metode yang sama diperoleh aktivitas enzim yang lebih rendah yaitu $(1,186 \pm 0,319)^a \times 10^{-3}$ U/mL. Hal ini mungkin disebabkan oleh lokasi tempat pengambilan sampel yang berbeda yaitu sampel 930 diambil di daerah muara Sungai Pakning dan sampel 931 diambil di daerah Selat Rupat. Kondisi air laut yang memiliki tingkat salinitas yang tinggi kemungkinan akan mempengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan jika dibandingkan bakteri yang berasal dari air tawar.

3. Penentuan aktivitas spesifik selulase

Aktivitas spesifik enzim tertinggi dimiliki oleh isolat bakteri 930-1C sebesar $(8,438 \pm 0,109)^a \times 10^{-3} \text{U/mg}$ berbeda secara nyata ($P \leq 0,05$) dengan isolat lainnya, dengan aktivitas selulase sebesar $(0,868 \pm 0,050)^{ab} \times 10^{-3} \text{U/mL}$. Berbeda dengan aktivitas selulase tertinggi yaitu pada isolat bakteri 931-4A sebesar $(1,186 \pm 0,319)^a \times 10^{-3} \text{U/mL}$ memiliki aktivitas spesifik yang lebih rendah dari isolat

konsentrasi inhibitor dalam media rendah. Bila aktivitas dan aktivitas spesifik rendah, maka kemungkinan aktivitas rendah disebabkan oleh adanya konsentrasi yang tinggi dari inhibitor di dalam media produksi enzim. Aktivitas spesifik tinggi juga menunjukkan bahwa protein utama yang dikeluarkan ke media tumbuh mikroba tersebut adalah enzim target.

Kemurnian dari suatu enzim didasarkan pada aktivitas spesifik enzim,



Gambar 4. Grafik aktivitas rata-rata spesifik enzim selulolitik.

930-1C yaitu sebesar $(4,651 \pm 0,287)^c \times 10^{-3} \text{U/mg}$. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas yang tinggi belum tentu menghasilkan aktivitas spesifik yang tinggi tergantung pada kadar protein yang dihasilkan karena aktivitas spesifik diperoleh dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein yang dihasilkan. Semakin besar kadar protein maka aktivitas spesifik suatu enzim akan semakin kecil.

Aktivitas spesifik enzim ditentukan untuk menunjukkan suatu ukuran kemurnian enzim atau dapat digunakan sebagai indikasi ada tidaknya inhibitor enzim atau repressor sintesis enzim di dalam media produksi enzim. Apabila aktivitas tinggi, tetapi aktivitas spesifik rendah, maka ini menunjukkan selain adanya protein lain dalam ekstrak,

karena semakin murni suatu enzim maka semakin besar nilai aktivitas spesifiknya. Nilai aktivitas spesifik didapat dari besarnya kadar protein yang ditentukan dengan metode Lowry (Boyer, 1993) yaitu dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein yang diperoleh. Dalam menentukan kadar protein dilakukan pemekatan enzim dengan mengendapkan larutan ekstrak kasar enzim menggunakan aseton dingin (0°C). Pemekatan dilakukan untuk memisahkan protein dari senyawa pengganggu yang terlarut, seperti karbohidrat, asam nukleat, gliserol, fenolat, EDTA dan detergen. Larutan diendapkan semalam di dalam *freezer* agar enzim tidak terdenaturasi. Endapan protein dipisahkan dari filtrat menggunakan sentrifugasi dingin pada kecepatan 13000 rpm sehingga protein tidak tercampur lagi

dengan gula pereduksi terlarut yang dapat mengganggu penentuan kadar protein.

Gula pereduksi pada enzim dapat mereduksi Cu^{+2} yang ada pada reagen Lowry. Penentuan kadar protein secara Lowry berdasarkan atas pengukuran serapan cahaya oleh ikatan kompleks protein dengan Cu^{+2} yang berwarna biru. Aseton dingin digunakan agar struktur enzim tidak rusak saat sentrifugasi dengan kecepatan tinggi. Selain itu kerja aseton sebagai pelarut organik yang digunakan untuk mengendapkan protein disini akan mengurangi tetapan dielektrik air, dengan demikian dapat mengurangi kelarutan protein karena interaksi antar molekul protein lebih disukai dibandingkan antara molekul protein dengan air.

KESIMPULAN

Bakteri selulolitik dari 2 sampel air yaitu titik 930 dan titik 931 yang telah diisolasi menggunakan media padat 1% CMC diperoleh sebanyak 14 isolat. Hasil pewarnaan gram dari 7 isolat yang diwarnai diperoleh hasil gram negatif untuk semua bakteri. Dari 14 isolat yang diisolasi, semua isolat mampu menghasilkan enzim selulase. Aktivitas enzim dari 14 isolat bakteri yang telah diisolasi diperoleh aktivitas tertinggi pada isolat 931-4A sebesar $(1,186 \pm 0,319) \times 10^{-3}$ U/mL yang berbeda secara nyata ($P \leq 0,05$) dengan aktivitas isolat lainnya. Dari hasil penelitian diperoleh aktivitas enzim spesifik tertinggi pada isolat bakteri 930-1C sebesar $(8,438 \pm 0,109) \times 10^{-3}$ U/mg yang berbeda secara nyata ($P \leq 0,05$) dengan aktivitas isolat lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dra. Andi Dahliaty, M.Si dan Ibu Dr. Christine Jose, M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah banyak

meluangkan waktu memberikan bimbingan, dukungan, dan petunjuk selama penelitian dan penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, P. B., Acharya, dan Modi, H. A. 2008. Optimization for Cellulase Production by *Aspergillus niger* Using Saw Dust as Substrate. *African Journal of Biotechnology*. 22: 4147-4152.
- Alexander, R. R., Griffiths, J. M. 1993. Basic Biochemical Methods. Willey-Liss, New York.
- Boyer, R. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. 3rded. Benjamin Cummings, San Francisco.
- Clark, J. M., Switzer, R. L. 1977. *Experimental Biochemistry*. 2nded. WH. Freeman & Co. San Fransisco
- Hadiotomo, R. S. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. Penerbit : PT Gramedia, Jakarta.
- Irawan, B., Sutihat., Sumardi. 2008. *Uji Aktivitas Enzim Selulase dan Lipase pada Mikrofungsi Selama Proses Dekomposisi Limbah Cair Kelapa Sawit dengan Pengujian Kultur Murni*. Prosiding Seminar Hasil Penelitian & Pengabdian kepada Masyarakat, Unila.
- Lowry, O.H. Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T. C., Rachmania, N., Satria, H. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Sains*. Vol. 13(1): 33-38

- Nelson, D., L and Cox, M. M. 2001
Lehninger Principles of
Biochemistry, 4ed. Worth Publisher,
Inggris
- Pelczar, M. J., dan Chan, E. C. S., 2006,
Dasar-Dasar Mikrobiologi, UI
Press, Jakarta.
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*.
Erlangga, Jakarta.
- Poedjadi, A. 1994. *Dasar-Dasar
Biokimia*. UI Press, Jakarta
- Siagian, E. 2012. Isolasi Bakteri
Selulolitik dari Daerah Aliran Sungai
Siak di Tandun Kabupaten Rakan
Hulu. *Skripsi*. FMIPA.UR.
Pekanbaru.
- Suri, H. 2013. Optimalisasi Produksi
Enzim Selulase Bakteri Selulolitik
dengan Memanfaatkan Limbah
Ampas Tebu sebagai Substrat.
Skripsi. FMIPA. UR. Pekanbaru
- Winarno, F. G. 1995. *Kimia Pangan dan
Gizi*. Penerbit PT. Gramedia, Jakarta.
- Wizna., Hahilabbas., Rizal, Y., Dharma,
A., Komiang. 2007. Selection and
identification of cellulase, producing
bacteria isolated from the litter of
mountain and swamp forest.
Mikrobiologi Indonesia 135-139.

