

**OPTIMALISASI pH PRODUKSI SELULASE DARI BAKTERI
ENDOFITIK *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53, *Pseudomonas stutzeri*
LBKURCC54, dan *Actinobacter antratus* LBKURCC60**

Rizki Wulandari, Silvera devi, Andi Dahliaty

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

ABSTRACT

Cellulase is an enzyme that can hydrolyze the β -1,4 bonds on cellulose and production of glucose so that the enzyme is widely used in various industries. Cellulose enzymes can be produced by microorganism such as endophytic bacteria (LBKURCC53, LBKURCC54, and LBKURCC60). The activity of cellulase enzyme was determined by measuring the glucose produced using Nelson-Somogyi method. The optimum activity of cellulase enzyme from the isolates of LBKURCC53, LBKURCC54, and LBKURCC60 we measured at different pH. The enzyme of LBKURCC53 isolate was optimum at pH 7 with enzyme activity of $11,31 \pm 1,69 \times 10^{-3}$ U/mL. While the enzyme of LBKURCC54 and LBKURCC60 isolates were optimum at pH 6,5 with enzyme activity $14,44 \pm 2,94 \times 10^{-3}$ U/mL and $8,33 \pm 1,11 \times 10^{-3}$ U/mL respectively. These comparison of cellulase enzyme activity of isolates LBKURCC53, LBKURCC54, and LBKURCC60 were determined by using Duncan multiple range test at 5% level ($\alpha \geq 0,05$).

Keywords: Cellulolytic activity, endophytic bacteria, cellulosa, cellulase produktion.

ABSTRAK

Selulase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ikatan β -1,4 pada selulosa dan menghasilkan glukosa sehingga enzim ini banyak digunakan secara luas dalam berbagai industri. Enzim selulase dapat dihasilkan oleh banyak mikroorganisme antara lain adalah bakteri endofitik (LBKURCC53, LBKURCC54, dan LBKURCC60). Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan dapat ditentukan dengan mengukur glukosa yang dihasilkan menggunakan metode Nelson Somogyi. Aktivitas optimum enzim selulase dari isolat LBKURCC53, LBKURCC54, dan LBKURCC60 diperoleh pada pH yang berbeda. Isolat LBKURCC53 optimum pada pH 7 dengan aktivitas enzim sebesar $11,31 \pm 1,69 \times 10^{-3}$ U/mL. Isolat LBKURCC54 dan LBKURCC60 optimum pada pH 6,5 dengan aktivitas enzim berturut-turut sebesar $14,44 \pm 2,94 \times 10^{-3}$ U/mL dan $8,33 \pm 1,11 \times 10^{-3}$ U/mL. Perbandingan aktivitas enzim selulase dari isolat LBKURCC53, LBKURCC54, dan LBKURCC60 dengan menggunakan uji Duncan jarak berganda pada taraf 5% ($\alpha \geq 0,05$).

Kata kunci: Aktivitas selulase, bakteri endofitik, selulosa, produksi selulase.

PENDAHULUAN

Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan enzim selulase. Enzim selulase adalah enzim ekstraseluler yang dihasilkan di dalam sel kemudian dikeluarkan ke medium pertumbuhannya. Enzim selulase diproduksi untuk mengkatalisis pemecahan selulosa menjadi glukosa dengan pemutusan ikatan β -1,4 glikosidik. Enzim selulase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tanaman, insekta, dan mikroorganisme. Meskipun banyak mikroorganisme yang dapat mendegradasi selulosa, namun hanya beberapa mikroorganisme yang dapat memproduksi selulase yaitu *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Cellovibrio*, dan *Sporosphytophaga* (Ikram dkk., 2005).

Produksi enzim dari suatu mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh faktor internal, yaitu DNA dari masing-masing mikroorganisme dan faktor eksternal, yaitu komposisi media produksi, agitasi, suhu, pH media, dan sumber karbon. pH adalah faktor penting bagi pertumbuhan bakteri, karena setiap spesies bakteri memiliki pH optimum yang berbeda untuk pertumbuhannya (Waluyo, 2009). Robi'a (2012) dan Purba (2013) telah berhasil mengisolasi beberapa bakteri endofitik dari tanaman dahlia. Hasil isolasi diperoleh beberapa bakteri endofitik diantaranya *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53, *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC54, yang diisolasi dari tanaman dahlia berwarna ungu yang diperoleh dari daerah Padang luar, dan *Actinobacter antratus* LBKURCC60 yang diisolasi dari daerah Padang Panjang Sumatera Barat. Penelitian selanjutnya dilakukan oleh Marlinda (2013) untuk mengetahui isolat yang mampu menghasilkan enzim

selulase. Pada penelitian ini dilakukan optimalisasi pH produksi enzim selulase. Aktivitas enzim selulase ditentukan berdasarkan gula pereduksi yang dihasilkan dari reaksi enzimatis dengan menggunakan metoda Nelson-Somogyi.

BAHAN DAN METODE

a. Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan adalah Spektrofotometer UV-VIS (*Thermoscientific genesis* 10), Autoklaf (*All American Mode* 25X-2), Waterbath (*Grant Intrumen Type* SUB28), Vortex (H-VM-300), *Shaker incubator*, *Rotary shaker*, Sentrifuse scientific model 228; pH meter (*Hanna Instrument* H18014), dan Inkubator (*Heraeus Instrument* D6450).

Bahan-bahan yang digunakan adalah Isolat bakteri LBKURCC53, LBKURCC54, dan LBKURCC60 koleksi laboratorium biokimia FMIPA UR, yang di isolasi dari tanaman dahlia. *Nutrien Agar* (Merck, No.kat.1.05450), *Nutrien Broth* (Merck, No.kat.1.06649), larutan buffer posfat, reagen Nelson-Somogyi; $C_4H_4KNaO_6$ (Merck, No.kat.1.08087), Na_2HCO_3 (Merck, No.kat.1.06329), Na_2SO_4 (Merck, No.kat.1.05443), Na_2CO_3 (Merck, No.kat.1.06649), reagen Arsenomolibdat; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, H_2SO_{4p} , $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma, No.kat.A6156), NaN_3 (Kanto Chemical Tokyo), dan komposisi media K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $COCl_2 \cdot 6H_2O$, Urea, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, CMC.

b. Peremajaan isolat

Bakteri selulolitik penghasil selulase diinokulasikan pada permukaan *Nutrient Agar* (NA) steril, kemudian

diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri dari 1 tabung agar miring diambil dan dimasukkan ke dalam 50 ml media NB (*Nutrient Broth*), lalu diinkubasi di dalam shaker inkubator dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 37°C selama 12 jam untuk digunakan sebagai starter. Kemudian diukur OD nya pada panjang gelombang 660 nm.

c. Produksi enzim selulase

Sebanyak 100 mL media produksi yang mengandung CMC 1% dimasukkan dalam erlemeyer 250 mL ditambahkan 10% inokulum, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam pada pH media 6,0. Ekstrak kasar enzim selulase yang terdapat dalam media dipisahkan dari sel isolatnya dengan menggunakan sentrifuse dalam keadaan dingin dengan kecepatan 9500 rpm selama 10 menit. Sebelum sentrifugasi, media kultur berisi enzim tersebut didinginkan pada suhu 10°C selama kurang lebih 1 jam. Supernatan disaring dengan *filter glass fiber* (Whatman GF/C). Jika enzim tidak langsung digunakan untuk analisis aktivitas enzim, maka harus ditambahkan NaN_3 hingga konsentrasi larutannya 0,02 % (b/v) ke dalam setiap larutan supernatant. Aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dianalisis dengan menggunakan substrat CMC 2% suhu 40°C, pH 7.

d. Aktivitas enzim

Aktivitas ekstrak kasar enzim selulase ditentukan dengan metode Nelson-Somogyi. Aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah gula pereduksi yang dilepaskan oleh kerja enzim per satuan waktu. Tabung uji, kontrol, dan blanko dilakukan secara bersamaan. Tabung uji diisi dengan 1 mL substrat CMC 2 %, control dibiarkan

kosong dan tabung blanko diisi dengan larutan buffer fosfat 0,05 M pH 6 sebanyak 2 mL, kemudian ketiga tabung reaksi dimasukkan ke dalam *waterbath* dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 40°C. Tabung uji dan kontrol ditambahkan enzim 1 mL tanpa mengeluarkan tabung dari dalam *waterbath* kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 40°C. Setelah inkubasi 30 menit tabung uji, control dan blanko dikeluarkan dari *waterbath*. Tabung uji, kontrol dan blanko ditambahkan reagen Nelson-Somogyi. Kemudian, tabung kontrol ditambahkan 1 mL substrat CMC 2%, selanjutnya semua mulut tabung ditutup dengan kelereng, lalu panaskan dalam penangas air selama 20 menit. Setelah itu, tabung uji, kontrol dan blanko didiamkan hingga suhu kamar lalu ditambahkan reagen arsenomolibdat dan didiamkan selama 5 menit. Setelah 5 menit, setiap tabung ditambahkan 6 mL akuades dan didiamkan selama 30 menit. Larutan disentrifugasi pada 9500 rpm selama 10 menit jika terdapat endapan. Larutan glukosa standar dibuat pada berbagai konsentrasi dengan Nelson-Somogyi. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan masing-masing tiga kali pengulangan untuk setiap sampel. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis Genesis 10 S pada panjang gelombang 540 nm. Hal yang sama, juga dilakukan pada sampel dengan variasi pH media yang berbeda yaitu 6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimalisasi produksi enzim selulase dari isolat LBKURCC53, LBKURCC54, dan LBKURCC60 dengan beberapa variasi pH media (6; 6,5; 7; 7,5; dan 8) pada suhu 37°C

selama 24 jam dengan kecepatan agitasi 120 rpm.

Penentuan aktivitas enzim selulase. Setiap enzim memiliki pH media optimum yang berbeda-beda untuk dapat bekerja secara optimal, yaitu pH media yang dapat menghasilkan aktivitas tertinggi dalam mengkatalisis suatu reaksi. Apabila pH tidak sesuai dengan sifat suatu enzim maka enzim tersebut tidak dapat bekerja secara optimal dan tidak aktif karena mengalami kerusakan atau denaturasi, sehingga aktivitas enzim akan menurun. Kondisi pH media optimum dibutuhkan oleh enzim untuk mengaktifkan seluruh enzim yang mengikat substrat dan mengubahnya menjadi produk. Mikroorganisme dapat

dikelompokkan berdasarkan rentang pH media tempat hidupnya, yaitu asidofilik (pH media 1,0-5,5), neutrofilik (pH media 5,5-8,5), dan alkalifilik (pH media 8,5-11,5) (Benefield dan Randall, 1980).

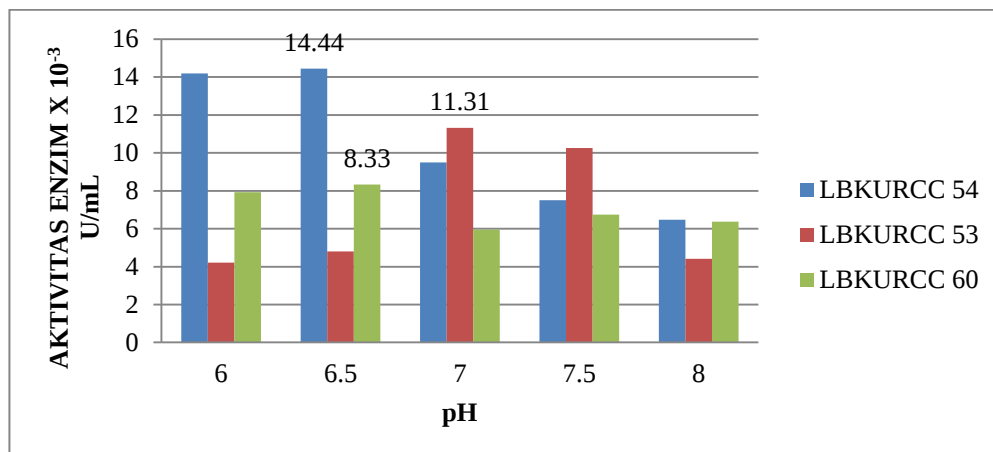
Pada Tabel 1 dan Gambar 1 menunjukkan bahwa ketiga isolat memiliki aktivitas enzim selulase pada pH optimum yang berbeda dari setiap isolat. Pada pH optimum, protein enzim mengambil struktur tiga dimensi sehingga enzim dapat mengikat substrat dengan sangat cepat. Sedangkan diluar pH optimum, struktur tiga dimensi enzim mulai berubah sehingga kecepatan enzim dalam mengikat substrat telah berkurang (Sadikin, 2002).

Tabel 1: Variasi pH media terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari isolate bakteri endofitik LBKURCC53, LBKURCC54 dan LBKURCC60

Variasi pH media	Aktivitas Enzim Selulase x 10 ⁻³ (U/mL) *		
	LBKURCC53	LBKURCC54	LBKURCC60
6,0	4,21 ± 2,97 ^b	14,19 ± 3,25 ^a	7,92 ± 3,77 ^a
6,5	4,80 ± 1,40 ^b	14,44 ± 2,94 ^a	8,33 ± 1,11 ^a
7,0	11,31 ± 1,69 ^a	9,50 ± 0,99 ^b	5,95 ± 0,47 ^a
7,5	10,25 ± 0,85 ^a	7,50 ± 2,37 ^b	6,74 ± 0,17 ^a
8,0	4,42 ± 1,55 ^b	6,48 ± 2,02 ^b	6,37 ± 0,44 ^a

Data aktivitas selulase diuji dengan metoda Duncan memberikan hasil sebagai berikut: aktivitas enzim selulase optimum dari isolat LBKURCC53 adalah pada pH media 7-7,5. Isolat LBKURCC54 adalah pada pH media 6-

6,5, sedangkan untuk isolat LBKURCC60 aktivitas enzim selulase pada semua variasi pH media tidak berbeda nyata, aktivitas tertinggi adalah pada pH media 6,5.



Gambar 1. Hubungan pH media dengan produksi enzim selulase dari isolate bakteri endofitik LBKURCC53, LBKURCC54, dan LBKURCC60

KESIMPULAN

Bakteri endofitik LBKURCC53, LBKURCC54, maupun LBKURCC60 menghasilkan aktivitas enzim pada pH yang berbeda. Isolat LBKURCC53 optimum pada pH 7 dengan aktivitas enzim sebesar $11,31 \pm 1,69 \times 10^{-3}$ U/mL. Isolat LBKURCC54 dan LBKURCC60 optimum pada pH 6,5 dengan aktivitas enzim berturut-turut sebesar $14,44 \pm 2,94 \times 10^{-3}$ U/mL dan $8,33 \pm 1,11 \times 10^{-3}$ U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Benefield, L.D dan Randall, C.W. 1980. Biological Process Design for Wastewater Treatment. *Prentice Hall Inc*, New York.
- Ikram-ul-haq., Javed, M., Khan, T. S dan Siddiq, Z. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Celulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Research*
- Waluyo, L. 2009. Mikrobiologi Lingkungan. Malang: UMM Press
- Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1 (3): 241-245.
- Marlinda, S. 2014. Uji Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Enzim Selulolitik dari Beberapa Bakteri Endofitik Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau, Pekanbaru.
- Purba, T.M. 2013. Isolasi dan karakterisasi bakteri endofitik dari umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*). *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau, Pekanbaru.
- Robi'a. 2013. Skrining Bakteri Endofitik dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau, Pekanbaru.