

KARAKTERISASI ENZIM SELULASE DARI BAKTERI SELULOLITIK *Bacillus* sp.

Widamay Fresha Tarigan¹⁾, Sumardi²⁾ dan Wawan Abdullah Setiawan²⁾

¹⁾ Mahasiswa Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung

²⁾ Dosen Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung

Jl. Prof. Dr. Soemantri Brodjonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145

Surel: Sumardi_bio@yahoo.co.id

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the characteristics of cellulose enzyme produced by isolate bacteria of *Bacillus* sp. isolated from chicken intestine. The experiment was conducted descriptively, by observing the reduced sugar amount produced by the cellulose enzyme activity. The enzyme activity was examined using DNS method. The characteristics of enzyme observed were the period of the optimum production, the optimum temperature, the optimum pH of buffer, and its stability according to the period of the enzyme storage. The results of this experiment showed that the cellulose enzyme produced by *Bacillus* sp. was optimally manufactured within 12 hours of incubation. The cellulose enzyme could optimally function in the temperatures of 40⁰C and 50⁰C, and performed the highest activity in the temperature of 50⁰C. In its optimum temperature 50⁰C, the enzyme performed the highest activity on pH 4 buffer, and on pH 9 in the temperature of 40⁰C. Cellulose enzyme was found to have a very low level of stability, while being stored in the temperature of 40⁰C.

Keywords: *Bacillus* sp., cellulose enzyme, enzyme stabilization, optimum pH, optimum temperatures.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik dari enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri isolat *Bacillus* sp. yang di isolasi dari usus ayam. Penelitian ini dilakukan secara deskriptif, yaitu dengan melihat jumlah gula reduksi yang dihasilkan dari aktivitas enzim selulase. Aktivitas enzim diuji dengan metode uji DNS. Karakteristik enzim yang diamati yaitu lama produksi optimum, suhu optimum, pH optimum buffer, dan kestabilan enzim berdasarkan lama waktu penyimpanan enzim. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim selulase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. ini diproduksi secara optimal selama 12 jam inkubasi. Enzim selulase ini dapat bekerja pada suhu 40⁰C, 50⁰C, dan menghasilkan aktivitas tertinggi pada suhu 50⁰C. Pada suhu optimumnya yaitu 50⁰C, enzim ini menghasilkan aktivitas tertinggi pada buffer pH 4, sedangkan pada suhu 40⁰C enzim ini akan menghasilkan aktivitas tertinggi pada pH 9. Enzim selulase ini memiliki tingkat kestabilan yang sangat rendah, jika di simpan pada suhu 40⁰C.

Kata kunci: *Bacillus* sp., enzim selulase, kestabilan enzim, pH Optimum, suhu optimum.



PENDAHULUAN

Enzim pada umumnya dihasilkan oleh organisme hidup termasuk mikroorganisme, seperti jamur dan bakteri. Bakteri yang dapat menghasilkan enzim, salah satunya adalah bakteri dari genus *Bacillus*. Isolat B1 merupakan salah satu koleksi bakteri *Bacillus* sp. di laboratorium mikrobiologi, Biologi, MIPA Unila. Bakteri ini di isolasi dari probiotik yang digunakan untuk pakan ternak. Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Rodiah (2014), menunjukkan bahwa bakteri ini mampu menghasilkan enzim amilase. Dalam kenyataannya proses pencernaan hewan ternak membutuhkan beberapa jenis enzim lain, salah satunya adalah enzim selulase. Untuk itu perlu dipelajari apakah bakteri ini juga memproduksi enzim lain seperti selulase.

Enzim memiliki aktivitas enzim yang berbeda sesuai dengan karakteristik masing-masing. Hal ini dikarenakan enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor internal dan eksternal seperti pengaruh lingkungan. Dalam produksinya bakteri harus ditumbuhkan dalam kondisi yang optimal. Enzim yang diperlukan kemudian perlu dipelajari sifatnya. Oleh karena itu karakterisasi enzim selulase yang diproduksi oleh bakteri *Bacillus* sp. ini perlu dilakukan. Karakterisasi yang dilakukan berdasarkan lama produksi enzim, suhu optimum enzim, pH optimum buffer, dan kestabilan enzim terhadap penyimpanan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada Januari-Mei 2015 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung

Asal Isolat. Isolat bakteri *Bacillus* sp. yang digunakan merupakan bakteri yang diisolasi dari usus ayam.

Uji Kualitatif Enzim Selulase. Uji kualitatif ini bertujuan untuk meyakinkan bahwa isolat bakteri *Bacillus* ini menghasilkan enzim selulase. Uji ini dilakukan dengan metode *congo red*. Isolat *Bacillus* diinokulasikan pada media padat modifikasi mandels (Mandels *et al.*, 1976) dengan komposisi CMC 0,5 g; Yeast Extract 0,35 g; Triptone Water 0,35 g; NaCl 0,2 g; KH_2PO_4 0,245 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,035 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,175 g dalam 100 mL aquades, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 40°C . Setelah 24 jam, koloni yang tumbuh disiram menggunakan *congo red* 1% kemudian dicuci dengan larutan NaCl 0,1%. Pada koloni bakteri diamati ada atau tidaknya zona bening atau zona jernih disekitar koloni.

Persiapan Inokulum. Persiapan inokulum *Bacillus* dilakukan dengan menambahkan 1 ose isolat bakteri umur 24 jam ke dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 20 mL media mendels cair. Diinkubasi pada *waterbath shaker* selama satu malam dengan kecepatan 120 rpm.

Penentuan Lama Produksi Enzim. Penentuan lama produksi optimum enzim dilakukan dengan menggunakan inokulum yang sudah di inkubasi selama satu malam. Inokulum tersebut dimasukkan ke dalam media mendels sebanyak 10% dari volume media yang digunakan, kemudian larutan diinkubasi menggunakan *waterbath shaker* dengan suhu 40°C dan dengan waktu inkubasi yang berbeda, yaitu 6 jam, 12 jam, 18 jam, 24 jam, dan 30 jam. Setelah diinkubasi, dilakukan sentrifuge untuk mengambil supernatan yang merupakan ekstrak kasar enzim selulase dari *Bacillus* sp.

Produksi Ekstrak Kasar Enzim. Setelah mengetahui lama produksi optimum enzim maka selanjutnya dilakukan proses produksi ekstrak kasar enzim yang digunakan untuk proses karakterisasi enzim selulase ini. Ekstra kasar enzim diproduksi dengan

menginokulasikan inokulum sebanyak 10 % dari volume media mendels yang digunakan, lalu diinkubasi di dalam *waterbath shaker* dengan suhu 40⁰C selama 12 jam dengan kecepatan 120 rpm. Ekstrak kasar enzim selulase yang terdapat dalam media dipisahkan dari sel isolatnya dengan menggunakan sentrifuge selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstra kasar enzim yang diuji aktivitasnya dengan prosedur uji aktivitas enzim (tabel 1).

Karakterisasi Enzim

Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Selulase. Untuk menentukan suhu optimum enzim maka pada proses uji aktivitas enzim (tabel 1), tahap inkubasi enzim dilakukan pada berbagai suhu yang berbeda yaitu suhu 30⁰C, 40⁰C, 50⁰C, 60⁰C, dan 70⁰C dalam *waterbath shaker* selama 30 menit. Setelah tahap pada proses uji aktivitas enzim selesai, maka dilakukan pengukuran gula pereduksi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 575 nm.

Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Selulase. Pada uji ini digunakan beberapa jenis *buffer* dengan pH tertentu. *Buffer* yang digunakan pada uji ini antara lain *buffer* sitrat pH 4, pH 5, pH 6, *buffer* posfat pH 7, *Buffer* tris pH 8 dan pH 9. Untuk menentukan pH optimum maka dilakukan uji aktivitas enzim (Tabel 1), dengan menggunakan jenis *buffer* dan pH yang sudah ditentukan kemudian di inkubasi pada suhu optimum. Setelah uji aktivitas selesai maka dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 575 nm.

Penentuan Kestabilan Enzim Terhadap Waktu Penyimpanan. Untuk mengetahui kestabilan enzim terhadap waktu penyimpanan, maka dilakukan proses penyimpanan ekstrak kasar enzim terlebih dahulu sebelum di uji aktivitasnya. Enzim di simpan pada

suhu 40°C dengan variasi lama penyimpanan yaitu 0 jam, 1 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam, dan 5 jam. Setelah disimpan dengan waktu yang telah ditentukan, kemudian dilakukan uji aktivitas enzim (Tabel 1) dengan menggunakan *buffer* sesuai pH optimum dan di inkubasi pada suhu optimum. Kemudian mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 575 nm.

Prosedur Uji Aktivitas Enzim Selulase. Aktivitas enzim selulase ini ditentukan dengan metode Mandels (1976), yaitu berdasarkan pembentukan produk glukosa. Uji aktivitas enzim dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

Tabel 1. Pengujian aktivitas enzim selulase

Bahan	Kontrol	Uji
Enzim	-	0,5 mL
0,5% CMC dalam buffer 0,05 M	0,5 mL	0,5 mL
.....		
Larutan tersebut dinkubasi pada suhu tertentu selama 30 menit dalam <i>waterbath shaker</i>		
Tabung yang berisi larutan dimasukkan ke dalam air es (untuk menghentikan aktivitas enzim)		
.....		
Larutan DNS	1 mL	1 mL
Enzim	0,5 mL	-
.....		
Larutan tersebut dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit		
Kemudian larutan didinginkan di air dingin selama 20 menit, masing-masing larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 575 nm		

Nilai absorbansi yang telah diperoleh dari pengukuran tersebut, digunakan untuk menentukan kadar glukosa. Penentuan aktivitas enzim selulase per unit dapat ditentukan dengan rumus, sebagai berikut :

$$Aktivitas\ enzim\ (U/mL) = \frac{\text{kadar glukosa}(\mu\text{g}) \times \text{faktor pengenceran}}{\text{BM Glukosa} \times \text{waktu inkubasi}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Kualitatif Enzim Selulase. Dari uji ini diketahui bahwa isolat *Bacillus* sp. ini tidak hanya mampu memproduksi amilase tetapi juga mampu memproduksi enzim selulase, ditunjukkan dengan adanya zona jernih disekitar koloni bakteri yang dipertegas dengan menggunakan pewarna Congo red (Gambar 1).

Adanya zona jernih ini diakibatkan oleh proses degradasi selulosa oleh bakteri selulolitik. Selulosa yang terhidrolisis pada medium agar jika digenangi oleh *Congo red* akan menghasilkan zona jernih karena *Congo red* tidak dapat berikatan dengan medium tanpa adanya ikatan β -1,4-glikosidik yang terkandung dalam polimer selulosa, hal ini disebabkan karena adanya enzim selulase sehingga ikatan polimer selulosa ini terhidrolisis (Jo *et al.*, 2011).

Karakterisasi dan Uji Aktivitas Enzim

Lama Produksi Optimum Enzim Selulase. Hasil dari uji lama produksi enzim ini menunjukkan aktivitas selulase yang tertinggi terjadi pada jam ke-12 masa inkubasi dengan menghasilkan aktivitas selulase 0,03 U/mL (Gambar 2) hal ini membuktikan bahwa enzim selulase di produksi secara optimal selama 12 jam masa inkubasi produksi.

Gambar 2.

Bacillus sp. memiliki waktu generasi 69,58 menit/generasi dari waktu generasi ini diduga bakteri tersebut sudah memasuki akhir fase stasioner pada jam ke-12, sehingga aktivitas enzim bakteri tersebut mulai menurun. Menurut Murni *et al.* (2011) menyatakan bahwa penurunan pertumbuhan *Aspergillus niger* ditandai dengan turunnya berat kering sel yang diikuti dengan penurunan aktivitas enzim. Sehingga dapat diduga

penurunan jumlah sel *Bacillus* sp. mengakibatkan penurunan aktivitas enzim selulase yang di produksinya.

Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Selulase. Menurut Baehaki (2011), pada umumnya setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat sejalan dengan bertambahnya suhu sampai suhu optimum tercapai. Pada penelitian ini, isolat bakteri *Bacillus* sp. diketahui memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 50⁰C dengan aktivitas enzim 0,036 U/ml (Gambar 3).

Gambar 3.

Akhtar (1998) menyatakan suhu optimum bagi kerja enzim selulase umumnya berkisar antara 40-60⁰C. Peningkatan suhu menyebabkan aktivitas ekstrak kasar enzim meningkat karena suhu yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dengan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk makin banyak. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat. Peningkatan temperatur lebih lanjut akan menurunkan aktivitas ekstrak kasar enzim. Hal ini disebabkan karena enzim mengalami denaturasi.

Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Selulase. Pada penelitian ini dilakukan uji pH buffer optimum dengan menginkubasi enzim dengan suhu 40⁰C dan 50⁰C sesuai hasil suhu optimum sebelumnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada dua puncak yang menunjukkan aktivitas optimum selulase berdasarkan pH *buffer* yaitu optimum

dengan buffer pH 9 pada suhu 40⁰C dan pH 4 pada suhu optimumnya yaitu 50⁰C (Gambar 4).

Gambar 4.

Menurut Akhdiya (2003), isolat yang menghasilkan enzim dengan dua puncak aktivitas optimum ini dikarenakan isolat tersebut menghasilkan lebih dari satu jenis enzim, contohnya pada protease alkalin termostabil dari isolat *Actinomyces*. Selain itu, Wijayanti *et al.* (2006) dalam penelitiannya mengatakan bahwa adanya dua titik puncak optimum dapat terjadi karena pada enzim protease yang digunakan pada penelitiannya adalah ekstrak enzim kasar yang belum mengalami tahap pemurnian. Begitu juga dengan penelitian ini, adanya dua titik puncak optimum diduga karena enzim ini menghasilkan dua jenis enzim selulase yang berbeda, dikarenakan enzim yang digunakan belum dimurnikan.

Kestabilan Enzim. Enzim memiliki tingkat kestabilan yang berbeda pada setiap jenisnya. Kestabilan enzim dapat dipengaruhi oleh berbagai kondisi lingkungan dan berbagai perlakuan yang diberikan terhadap enzim tersebut. Salah satu perlakuan yang sering dilakukan adalah menyimpan enzim dengan waktu tertentu. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa enzim selulase yang dihasilkan isolat *Bacillus* sp. ini tidak stabil jika disimpan. Terbukti karena dari 0 jam penyimpanan sampai 1 jam penyimpanan terjadi penurunan aktivitas enzim yang drastis hingga melebihi 50% (Gambar 5).

Gambar 5.

Hasil ini berbeda dengan hasil dari penelitian yang dilakukan oleh Chasanah *et al.* (2013) mengenai stabilitas enzim selulase isolat PMP 0126Y yang diisolasi dari limbah pengolahan rumput laut. Enzim selulase tersebut relatif stabil hingga 4 jam



penyimpanan pada suhu 40⁰C, yang ditunjukkan dengan penurunan aktivitas enzim yang tidak melebihi 50% dari aktivitas awal.

KESIMPULAN

Isolat *Bacillus* sp. koleksi laboratorium mikrobiologi FMIPA Unila mampu menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase yang dihasilkan oleh isolat *Bacillus* sp. ini mampu menghasilkan aktivitas optimum pada suhu lingkungan 50⁰C dengan buffer pH 4. Enzim selulase ini relatif tidak stabil jika disimpan pada suhu 40⁰C.

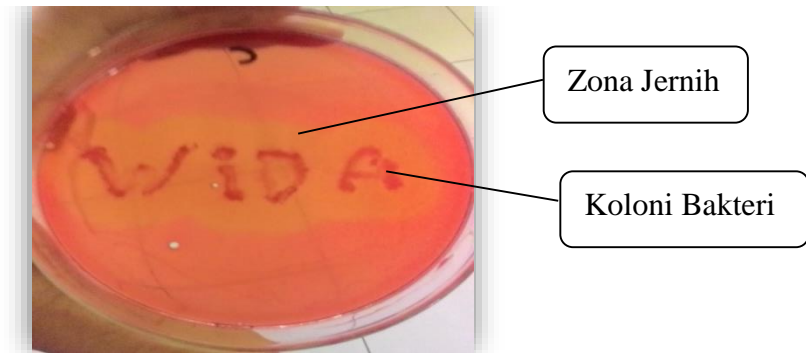
DAFTAR PUSTAKA

- Akhdiya A. 2003. *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termostabil*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.
- Akhtar MS. 1998. Bioconversion of Cellulosic Materials by the Action of Microbial Cellulases. *Thesis*. Institute of Chemistry University of the Punjab.
- Baehaki A, Rinto,& Arif B. 2011. Isolasi dan karekterisasi protease dari bakteri tanah rawa Indralaya, Sumatera Selatan. *J. Teknologi dan Industri Pangan* 22(1) : 10-16.
- Chasanah, Ekowati, Dini IR,& Mubarik NR. 2013. *Karakterisasi Enzim Selulase Pmp 0126y Dari Limbah Pengolahan Agar*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, KKP. Jakarta.
- Jo WS, Park HN, Cho DH, Yoo YB & Park SC. 2011. Optimal media conditions for the detection of extracellular cellulase activity in *Ganoderma neo-japonicum*. *Journal of Mycobiologi* 39(2): 129-132.
- Mandels M, Andreotti R,& Roche C. 1976. Measurment of sacchari-fying cellulase. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* 6:21-33.
- Murni SW, Kholisoh SD, & Tanti DL,& Petrissia EM. 2011. Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari *Aspergillus niger*. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia*. Fakultas Teknologi Industri, UPN, “Veteran” Yogyakarta.

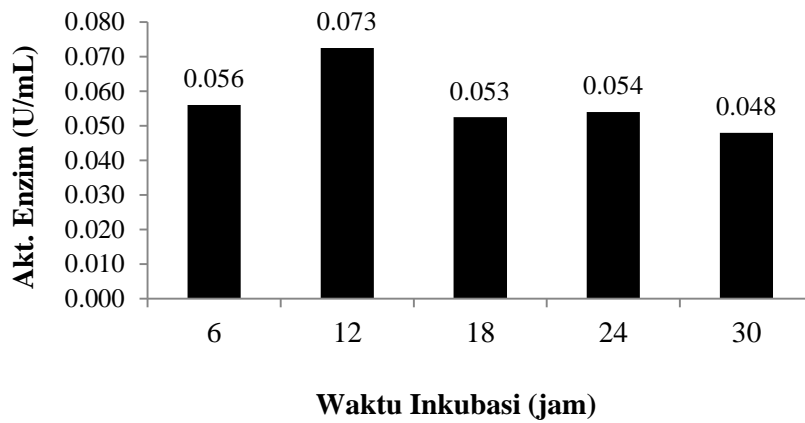


Rodiah S. 2014. Uji Viabilitas Bakteri Amilolitik Dari Inokulum Probiotik Untuk Pakan Ternak Pada Berbagai Jenis Kemasan. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung.

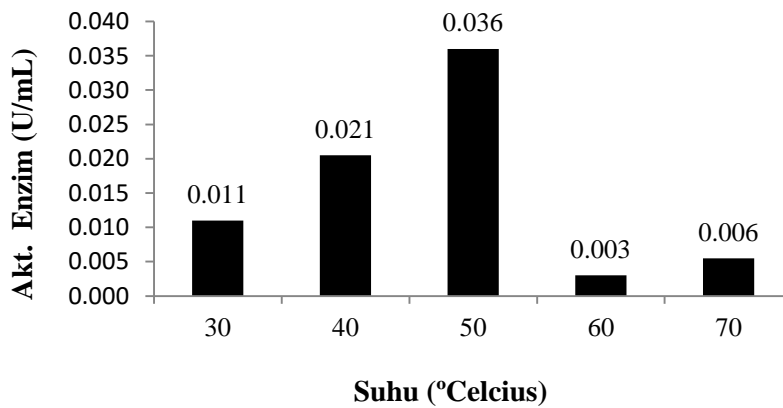
Wijayanti N, Arief K, Nisa FC, & Murdiyatmo U. 2006. Karakterisasi parsial ekstrak kasar enzim protease dari *Bacillus amyloliquefaciens* Nrrl B-14396. *Jurnal Teknologi Pertanian* 7(2): 96-105.



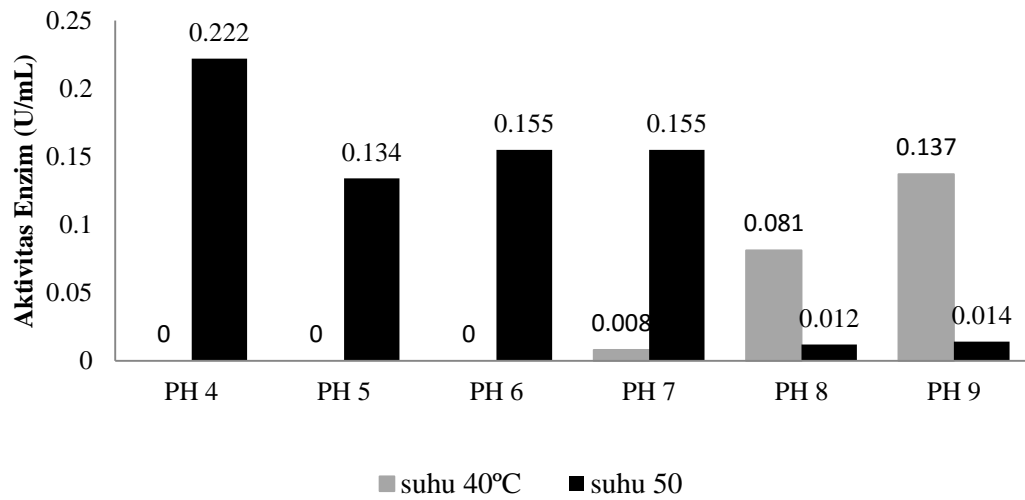
Gambar 1. Zona jernih di sekitar koloni bakteri.



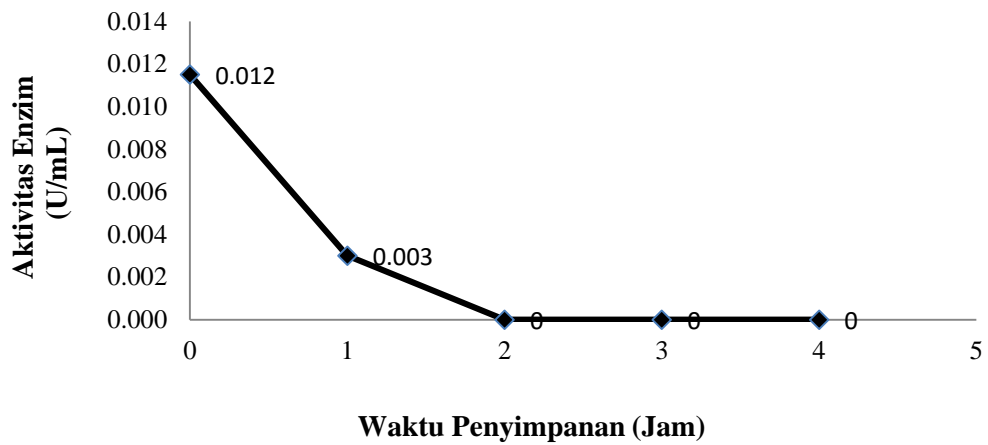
Gambar 2. Aktivitas enzim selulase terhadap lama produksi



Gambar 3. Aktivitas enzim selulase berdasarkan suhu



Gambar 4. Aktivitas enzim selulase berdasarkan pH buffer



Gambar 5. Aktivitas enzim selulase berdasarkan lama penyimpanan