

KARAKTERISASI SELULASE TERMOSTABIL ASAL ISOLAT BAKTERI TANAH PERTANIAN PASANG SURUT

Rini Sahrida Lestari¹, Hasrul Satria Nur^{1,2*}, Witiyasti Imaningsih^{1,2}

¹ Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lambung Mangkurat, Jalan A. Yani Km. 36 Banjarbaru, Kalimantan Selatan, 70714

² Divisi Mikrobiologi & Bioteknologi, PS Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lambung Mangkurat, Jalan A. Yani Km. 35,6 Banjarbaru, Kalimantan Selatan 70713

*Corresponding author: hasrulsatria@ulm.ac.id

ABSTRACT

Cellulase is an enzyme that can break up β - (1→4) glycosidic bonds of cellulose. Generally, cellulases are classified into three major groups, i.e., endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91), and β glucosidase (EC 3.2.1.21). Meanwhile, five isolates of tidal swamp soil have been isolated; thus, in this research step, we are acquainted with cellulase activity and the characterization of cellulase enzymes on various temperatures, pH, and specific substrates. The activity of an enzyme was measured using the modified Miller and Bradford methods to detect the specific characteristics of the isolate. The results showed that five isolates namely ATP-1 BKP-5, HAMML-2, PKL-2, and SPBKK-3 have activities 0.025 nKat.ml⁻¹, 0.032 nKat.ml⁻¹, 0.296 nKat.ml⁻¹, 0.114 nKat.ml⁻¹, and 0.087 nKat.ml⁻¹, respectively. Furthermore, cellulase from isolates ATP 1, BKP-5, and PKL 2 have an optimum activity at pH 7,0; 50 °C. The isolate HAMML-2 has an optimum activity at pH 5,0; 60 °C. SPBK 3 has an optimum activity at pH 5,0; 50 °C. All of those isolates can degrade CMC, Avicell, and Whatman paper No.1 and retain the activity relative to the temperatures 50 and 60 °C as the characteristics of the thermostable enzyme.

Keywords: cellulase bacteria, thermostable enzyme, swamps tidal soil

PENDAHULUAN

Enzim selulase merupakan kelompok enzim yang memutus ikatan β -(1→4) glikosidik dalam molekul selulosa, selodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa. Secara umum, enzim selulase

diklasifikasikan menjadi tiga kelompok berdasarkan aktivitas utamanya dan spesifisitasnya dalam menghidrolisis substrat selulosa, yaitu endoglukanase (EC 3.2.1.4), eksoglukanase (EC 3.2.1.91), dan β -glukosidase (EC

3.2.1.21) (Nishida *et al.*, 2007; Shanmugapriya *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2014; Santana Costa *et al.*, 2020).

Hidrolisis selulosa pada skala industri menggunakan enzim selulase termostabil, dikarenakan enzim tersebut mampu bekerja secara optimal pada suhu tinggi (Zhang & Kim, 2010; Trincone, 2011; Nikolaivits *et al.*, 2017). Keuntungan yang diperoleh dari industri yang memanfaatkan selulase termostabil yaitu dapat menurunkan resiko terjadinya kontaminasi bakteri mesofilik selama proses. Selain itu juga enzim ini mampu meningkatkan kecepatan reaksi sehingga dapat menghemat waktu, tenaga, dan biaya produksi (Ginting, 2009).

Beberapa hasil penelitian karakterisasi selulase termostabil memperlihatkan karakter yang berbeda. Huang *et al.* (2005) telah mendapatkan enzim ekstremofilik yang mampu bekerja pada suhu optimum 80°C dengan pH optimum 1,8 serta dapat mendegradasi substrat *carboxymethyl cellulose* (CMC) dan selo-oligosakarida. Enzim tersebut dihasilkan oleh bakteri termofilik *Sulfolabus solfataricus* SSO1949. Sementara itu, beberapa

strains bakteri termofilik dari *Bacillus*, *Geobacillus*, *Caldibacillus*, *Acidothermus*, *Caldocellum* dan *Clostridium* diketahui memiliki kemampuan dalam memproduksi selulase termostabil (Rastogi *et al.*, 2010, Zambare *et al.*, 2011).

Nur & Krisdianto (2009) juga telah mengisolasi bakteri selulolitik dari tanah pertanian pasang surut Kalimantan Selatan dan mendapatkan 40 isolat bakteri selulolitik dengan Indeks selulolitik $\geq 1,0$. Dari ke empat puluh isolat ini diperoleh 10 bakteri selulolitik yang mampu tumbuh pada media selektif agar-agar CMC dengan Indeks selulolitik $\geq 2,0$. Namun, isolat bakteri dengan Indeks $\leq 2,0$ tersebut masih belum diketahui aktivitas dan karakteristik enzimnya.

Aktivitas dan karakteristik enzim dimungkinkan berbeda antar isolat, karenanya pada penelitian ini dilakukan pengukuran aktivitas enzim terhadap kelima isolat bakteri dengan Indeks selulolitik $\leq 2,0$ tersebut dan dilakukan karakterisasi terhadap lima isolat yang memiliki aktivitas terbaik.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang dipergunakan meliputi 5 isolat murni bakteri selulolitik asal tanah pertanian pasang surut (koleksi Hasrul Satria, PS Biologi FMIPA ULM Banjarbaru) dengan kode isolat ATP-1, BKP-5, HAMML-2, PKL-2, dan SPBKK-3. Medium agar-agar CMC dan medium cair CMC. Ketiga jenis substrat selulosa yang meliputi *Carboxymethyl cellulase* (CMC), *Avicell* dan *Whatman filter paper No.1*. Bufer yang digunakan meliputi fosfat, sitrat fosfat, *glycine-NaOH*, serta larutan NaOH 0,2 M. Sedangkan reagen yang digunakan dalam pengukuran gula pereaksi yaitu asam dinitro salisilat (DNS) dan reagen yang digunakan dalam pengukuran kadar protein yaitu reagen *Bradford*.

Peremajaan isolat dan penentuan kurva tumbuh

Lima isolat murni bakteri selulolitik diambil masing-masing sebanyak 2 lup penuh dan diinokulasikan kedalam medium *carboxymethyl cellulose* (CMC) cair. Kemudian dilakukan inkubasi menggunakan *orbital shaker* selama 48 jam dengan kondisi suhu ruang. Setelah

ditumbuhkan pada media CMC cair, isolat tersebut diinokulasikan pada media agar-agar CMC dengan metode cawan gores dan diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 30°C selama 48 jam.

Berikutnya sebanyak dua lup penuh bakteri hasil peremajaan diinokulasikan ke dalam 100 ml media cair CMC 1,0% (b/v) dan diinkubasi dalam *shaker* inkubator dengan kecepatan 150 rpm. Setiap 24 jam dilakukan pengukuran kekeruhan sel pada $\lambda = 625$ nm. Nilai absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer dikorelasikan dengan kurva standar sel. Penetapan kurva standar sel dilakukan pada jam ke-11 atau ke-12 yaitu pada saat sel mencapai fase eksponensial.

Pengukuran aktivitas selulolitik

Sebagai data pendukung juga dilakukan pengukuran aktivitas selulolitik oleh isolat bakteri tanah pertanian pasang surut. Isolat bakteri tanah pertanian pasang surut yang tumbuh pada media agar-agar CMC direndam dengan larutan merah kongo 0,1% selama 15 menit. Larutan merah kongo pada media agar kemudian dibilas

dengan NaCl 1,0 M. Aktivitas selulolitik diukur dengan melihat kemampuan pembentukan zona jernih (*clear zone*).

Pengukuran aktivitas enzim selulase harian

Sebanyak dua lup penuh isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium cair CMC 1,0% (b/v) dalam labu Erlenmeyer 500 ml. Enzim ekstrak kasar didapatkan dengan mensentrifugasi kultur sel pada kecepatan 10.000 x g dengan kondisi suhu 5 °C selama 10 menit. Pengukuran aktivitas enzim selulase dilakukan dengan modifikasi metode *Miller* (1959) dengan menggunakan enzim ekstrak kasar dan glukosa sebagai standar pada konsentrasi 0,1 mg ml⁻¹ - 0,3 mg ml⁻¹. Aktivitas enzim selulase diuji terhadap substrat CMC 1,0 % (b/v) yang dilarutkan pada bufer fosfat 0,2 M pH 7,0 kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan 2 ml DNS dan diinkubasi pada suhu 100°C selama 15 menit.

Perhitungan aktivitas enzim selulase dinyatakan dengan nKat.ml⁻¹, yang diacu berdasarkan Dybaker (2001). Satu unit aktivitas enzim selulase adalah

jumlah enzim yang dibutuhkan untuk melepas 1 µmol gula pereduksi per menit dan satu unit aktivitas enzim setara dengan 16,67 nKat.ml⁻¹. Pengukuran aktivitas masing-masing larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 540$ nm.

Pengukuran kadar protein

Aktivitas spesifik selulase ditentukan terhadap kadar protein. Kadar protein diukur dengan metode *Bradford* (1976). Sebanyak 100 µl larutan enzim direaksikan dengan 5 ml pereaksi *coomassie brilliant blue* (CBB) G-250, dikocok kuat dan biarkan selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada λ 595 nm. Blanko menggunakan 100 µl aquades yang direaksikan dengan 1,0 ml pereaksi CBB G-250. Standar protein menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) pada kisaran 0,1 - 0,3 mg prot.ml⁻¹ dari stok BSA 2 mg.ml⁻¹.

Karakterisasi enzim (pH, suhu, dan substrat spesifik)

Pengujian pada berbagai pH dilakukan pada pH 3,0 sampai dengan pH 11,0 dengan selang 1,0 unit dengan cara mereaksikan enzim ekstrak kasar

dengan bufer sitrat fosfat 0,2 M untuk pH 3,0; 4,0; 5,0; bufer fosfat 0,2 M untuk pH 6,0; 7,0; 8,0; dan *glycine*-NaOH 0,2 M untuk pH 9,0 dan 11,0 (Ibrahim *et al.*, 2007).

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim diuji dengan cara mereaksikan enzim ekstrak kasar dengan substrat dan bufer pH optimum selama 30 menit pada suhu yang berbeda, yaitu 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, dan 90°C dalam substrat CMC 1% pada bufer pH optimum.

Hidrolisis substrat spesifik dilakukan dengan cara mereaksikan enzim ekstrak kasar dengan berbagai substrat spesifik, yaitu *CMC*, *avicell*, dan *Whatman filter paper No.1* pada hari, pH dan suhu optimum produksinya. Untuk menguji aktivitas enzim pada berbagai substrat dilakukan dengan menambahkan 1,0 ml enzim ekstrak kasar ke dalam 1 ml substrat *CMC* dan *Avicell*. Untuk substrat *Avicell*, reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 µl NaOH 0,2 M dan diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Untuk substrat *CMC* dan *Avicell*, campuran substrat-enzim kemudian ditambahkan 2,0 ml DNS dan segera diinkubasi pada suhu 100 °C selama 15 menit.

Untuk substrat *Whatman filter paper No.1*, sebanyak 1 lembar kertas saring (1 x 6 cm²) dan 1 ml bufer serta 1 ml enzim ekstrak kasar di masukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml DNS kemudian segera diinkubasi pada suhu 100°C selama 15 menit.

Uji stabilitas enzim terhadap panas (termostabil suhu)

Uji stabilitas enzim terhadap panas dilakukan dengan menginkubasi enzim ekstrak kasar pada suhu dan pH optimumnya selama 180 menit. Pengambilan contoh uji stabilitas enzim dilakukan pada selang waktu 30 menit. Aktivitas enzim tersisa diuji dengan modifikasi metode *Miller* (1959).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas selulase dan kurva pertumbuhan isolat bakteri selulolitik

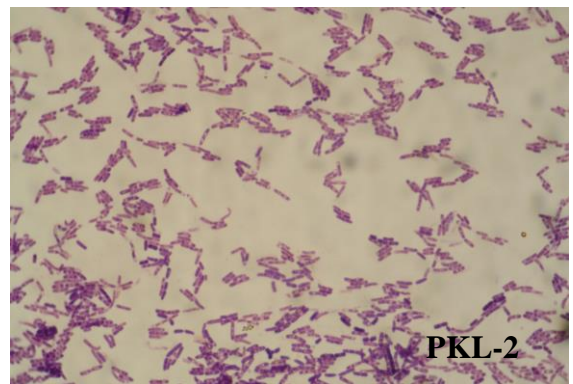
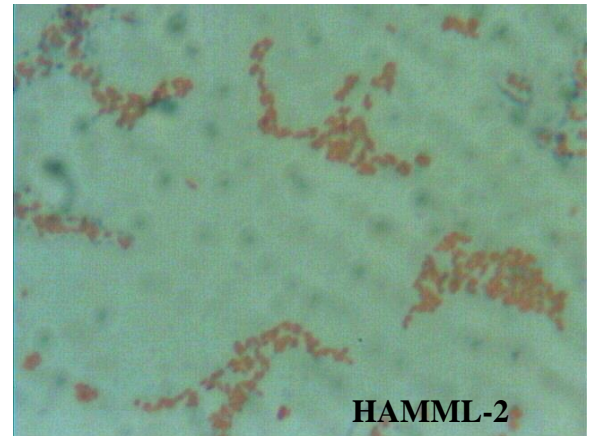
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat bakteri asal tanah pertanian pasang surut memiliki aktivitas selulolitik dan aktivitas selulase harian.

Isolat yang telah ditumbuhkan di media agar-agar *CMC* memperlihatkan kemampuan aktivitas selulolitiknya dengan menghidrolisis selulosa pada

ikatan endo- β -1,4-glukanase berupa zona bening (*clear zone*) yang terlihat ditengah media yang diwarnai dengan merah kongo (**Gambar 1**). Berikutnya, hasil uji aktivitas selulolitik dan pewarnaan Gram memperlihatkan bahwa kelima isolat bakteri tersebut memiliki Indeks selulolitik $\geq 1,0$ (**Gambar 2** dan **Tabel 1**).



Gambar 1. Hidrolisis substrat oleh isolat bakteri selulolitik (PKL-2) yang ditandai dengan adanya zona bening pada media agar-agar CMC selama 48 jam kondisi suhu ruang.



Gambar 2. Representasi morfologi sel isolat bakteri selulolitik dengan metode pewarnaan Gram menggunakan mikroskop multimedia *micros* Austria (perbesaran 100 x).

Adanya aktivitas selulolitik pada media agar-agar CMC yang ditandai dengan terbentuknya zona jernih (clear zone) mengindikasikan bahwa isolat tersebut memiliki aktivitas endo- β -(1 \rightarrow 4) glukonase yang dapat mengubah selulosa menjadi glukosa (Abdelnasser & Ahmed, 2007).

Tabel 1. Aktivitas isolat bakteri selulolitik asal tanah pertanian pasang surut pada media agar-agar CMC dengan kondisi suhu 37 °C

No	Kode Isolat	Indekss selulolitik
1.	ATP-1	1,12
2.	BKP-5	1,50
3.	HAMML-2	1,16
4.	PKL-2	1,33
5.	SPBKK-3	1,32

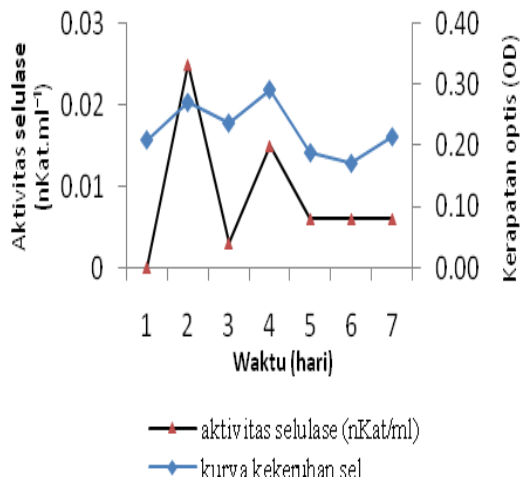
Hasil penelitian Arifin *et al.*, (2008) juga melaporkan bahwa *Bacillus pumilus* EB3 dapat membentuk zona bening disekitar koloni yang diwarnai dengan merah kongo. Pewarna tersebut memiliki spesifikasi interaksi terhadap polisakarida yang mengandung uni-unit β -(1 \rightarrow 4) D glukopiranosil dan β -(1 \rightarrow 3) D glukon yang menghasilkan warna merah.

Aktivitas selulase harian menunjukkan 5 isolat dengan

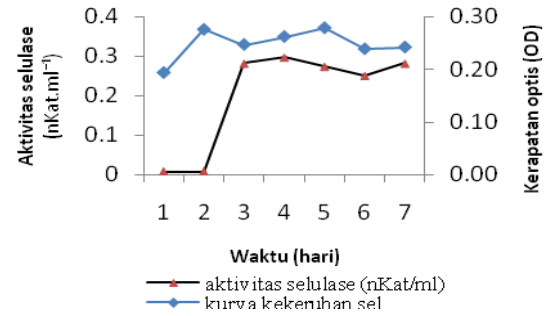
kemampuan produksi enzim terbaik. Kelima isolat tersebut (ATP-1, BKP-5, HAMML-2, PKL-2, dan SPBKK-3) memiliki aktivitas dan waktu optimum produksi berbeda. Puncak aktivitas dan waktu optimum untuk enzim selulase isolat ATP-1 adalah hari kedua dengan aktivitas selulase 0,025 nKat.ml⁻¹. Hari pertama untuk isolat BKP-5 dengan aktivitas selulase sebesar 0,032 nKat.ml⁻¹. Isolat HAMML-2 mempunyai waktu optimum dan puncak aktivitas selulase pada hari keempat sebesar 0,296 nKat.ml⁻¹, dan hari keenam untuk isolat PKL-2 (0,114 nKat.ml⁻¹) dan SPBKK-3 (0,087 nKat.ml⁻¹). Aktivitas selulase yang dihasilkan diikuti dengan pertumbuhan selnya, tersaji pada (**Gambar 3**).

Berdasarkan hasil pada Gambar 3 ini terlihat adanya peningkatan aktivitas enzim selulase yang diiringi pertumbuhan selnya. Aktivitas CMC-ase dari isolat dipengaruhi oleh kadar glukosa di dalam kultur. Ketika glukosa terbatas jumlahnya pada media awal kultivasi, sel terpacu memproduksi enzim yang diperlukan untuk menghidrolisis CMC. Pada saat puncak aktivitas enzim selulase, bakteri

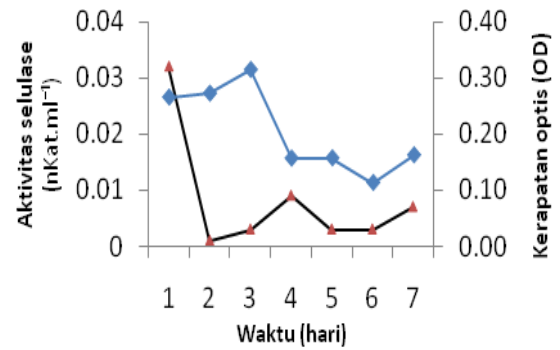
mengeluarkan enzim selulasenya secara maksimal ke lingkungan luarnya. Molekul glukosa sebagai produk akhir dari enzim selulase menempel pada sisi alosterik enzim sehingga sisi aktif enzim selulase tidak dapat lagi ditempati oleh substrat selulosa (Maranatha, 2008). Aktivitas selulase mencapai waktu optimum pada saat sel mengalami fase stasioner. Pada fase stasioner kecepatan pembelahan sel sama dengan kecepatan kematian sel dan lisis sel, sehingga pada fase ini aktivitas enzim selulase dihasilkan secara optimum.



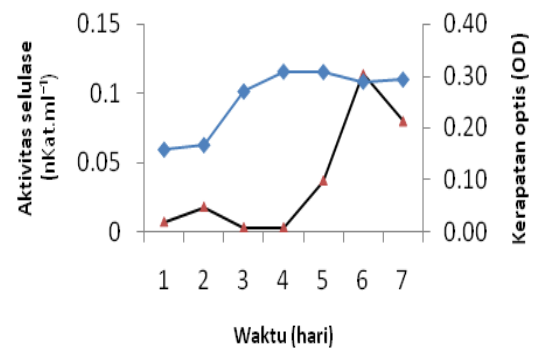
(a)



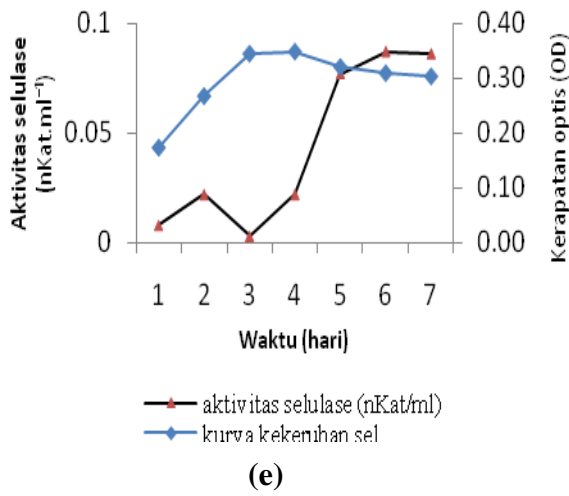
(b)



(c)



(d)



(e)
Gambar 3. Kurva pertumbuhan dan aktivitas selulase harian isolat ATP-1 (a), HAMML-2 (b), BKP-5 (c), PKL-2 (d) dan SPBKK-3 (e). Aktivitas enzim selulase harian diuji pada substrat CMC pada suhu 37 °C, pH 7,0 selama 7 hari.

Karakterisasi Selulase

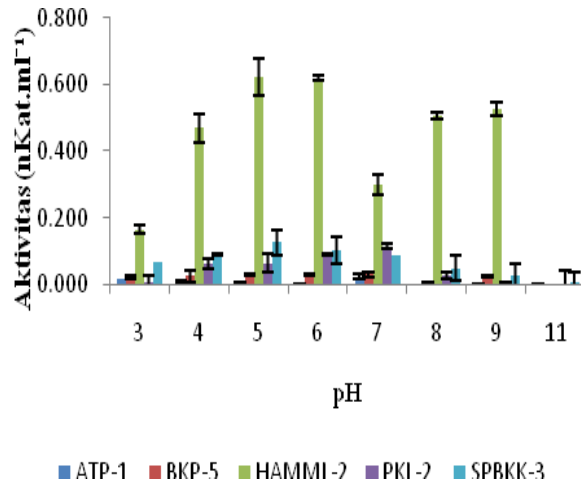
Pengaruh pH optimum pada peningkatan aktivitas enzim berhubungan dengan suatu perubahan berhubungan dengan suatu perubahan ionisasi dalam gugus ionik enzim. Enzim menyediakan banyak tempat pengikatan proton, karena enzim adalah protein yang tersusun atas asam amino yang dapat mengadakan ionisasi (mengikat dan melepaskan proton atau ion hidrogen) pada gugus amino, karboksil, atau beberapa gugus fungsional lainnya (Hendarsyah, 2006).

Hasil karakterisasi enzim terhadap pH optimum dari masing-masing isolat menunjukkan aktivitas beragam. Isolat ATP-1 (0,025 nKat.ml⁻¹), BKP-5 (0,032 nKat.ml⁻¹) dan PKL-2 (0,114 nKat.ml⁻¹) mempunyai aktivitas optimum selulase pada pH 7,0, dan pH optimum produksi isolat HAMML-2 (0,625 nKat.ml⁻¹) dan SPBKK-3 (0,127 nKat.ml⁻¹) berada pada pH 5,0 (**Gambar 4**).

Selain pH, suhu juga memainkan peranan yang penting dalam aktivitas enzim. Pengaruh suhu pada reaksi enzimatik merupakan suatu fenomena yang kompleks, ditambah lagi dengan kenyataan bahwa reaksi enzim umumnya terdiri atas beberapa tahapan reaksi, dan respon terhadap suhu dari tiap tahap ini berbeda pula.

Kecepatan reaksi akan meningkat setara dengan meningkatnya suhu karena akan mempercepat gerak termal molekul. Pada suhu yang lebih tinggi dari suhu optimumnya, protein enzim akan mengalami perubahan konformasi yang bersifat detrimental. Pada suhu yang melebihi suhu optimal enzim, substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga sisi reaktifnya tidak dapat lagi bekerja, atau

mengalami hambatan dalam memasuki lokasi pada sisi aktif enzim tersebut (Suhartono, 1989).



Gambar 4. Aktivitas selulase isolat ATP-1, BKP-5, HAMML-2, PKL-2 dan SPBKK-3 pada berbagai pH yang diukur pada suhu 37 °C dan waktu optimumnya
Keterangan : Bar pada batang menunjukkan simpangan baku.

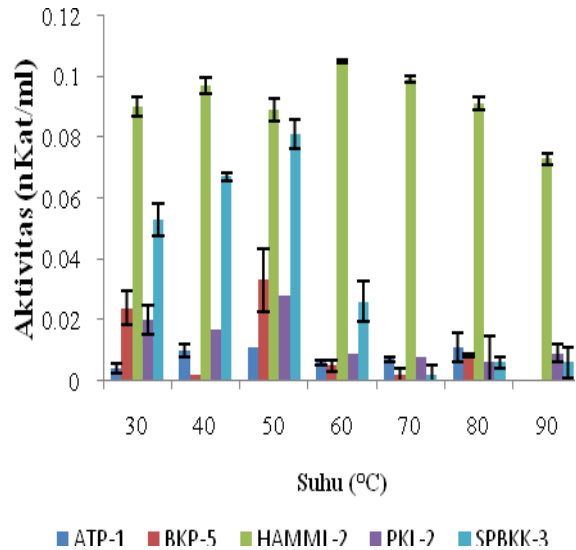
Empat isolat yaitu ATP-1 (0,011 nKat.ml⁻¹), BKP-5 (0,032 nKat.ml⁻¹), PKL-2 (0,028 nKat.ml⁻¹) dan SPBKK-3 (0,081 nKat.ml⁻¹) memiliki suhu optimum pada suhu 50 °C. Hanya satu isolat yaitu HAMML-2 yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 60 °C dengan aktivitas 0,105 nKat.ml⁻¹ (**Gambar 5**).

Mawadza *et al.*, (2000) melaporkan aktivitas selulase pada suhu optimum diproduksi oleh bakteri termofilik *Bacillus* sp CH43 dan *Bacillus* sp HR68 yang diisolasi dari sumber air panas masing-masing sebesar 70°C dan 65°C. Sama halnya dengan Abdelnasser & Ahmed (2007) yang melaporkan aktivitas selulase isolat *Bacillus anoxybacillus flavithermus* EHP1 yang diisolasi dari sumber air panas memiliki kisaran suhu 30-85°C dengan suhu optimum 75°C. Huang *et al.*, (2005) melaporkan bahwa aktivitas selulase yang diproduksi oleh Archea *Sulfolobus solfataricus* memiliki kisaran suhu 80-100°C dengan suhu optimum sebesar 80°C yang stabil selama 120 menit.

Enzim selulase yang dihasilkan oleh isolat HAMML-2, PKL-2, dan SPBKK-3 bersifat termostabil karena menunjukkan stabilitas pada suhu tinggi (**Gambar 6**).

Aktivitas selulase isolat HAMML-2 (60 °C, pH 5,0) dan SPBKK-3 (50°C, pH 5,0) stabil hingga 90 menit, sedangkan aktivitas selulase isolat PKL-2 (50°C, pH 7,0) mampu stabil hingga 120 menit. Isolat HAMML-2 memiliki aktivitas enzim yang lebih stabil pada suhu 60°C

dibandingkan dengan dua isolat lain (PKL-2 dan SPBKK-3).



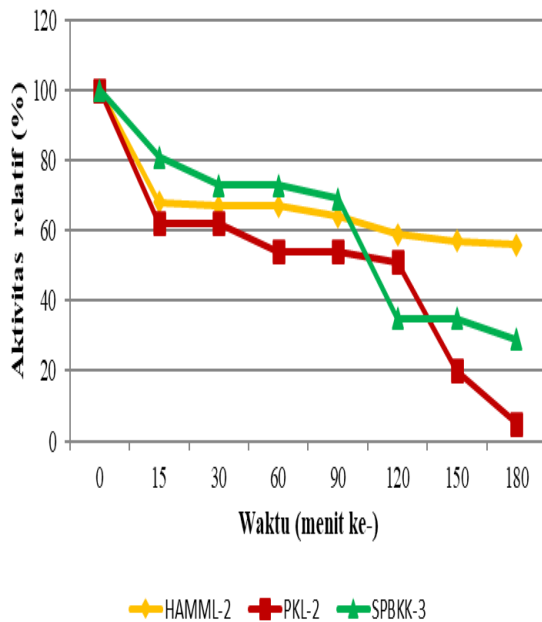
Gambar 5. Aktivitas selulase isolat ATP-1, BKP-5, HAMML-2, PKL-2 dan SPBKK-3 pada berbagai suhu yang diukur pada pH dan waktu optimum produksi.

Keterangan : Bar pada batang menunjukkan simpangan baku.

Salah satu penyebab adanya sifat termostabilitas enzim adalah kemampuan mempertahankan aktivitas dan struktur protein dari denaturasi oleh pengaruh panas. Kestabilan enzim terhadap suhu juga dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti struktur tiga dimensi, komposisi asam amino, jembatan disulfida dan senyawa

penstabil lain seperti ion logam (Haki & Rakshit, 2003).

Nur & Krisidanto (2009) yang melaporkan isolat BRT-1 dan BTB-1 yang juga diisolasi dari tanah pertanian pasang surut memiliki kisaran suhu 30-90°C dengan suhu optimum 80°C, aktivitas selulase pada suhu optimum tersebut lebih tinggi dari aktivitas selulase hasil penelitian ini oleh isolat HAMML-2 yang memiliki suhu optimum 60°C. Mawadza *et al.*, (2000) melaporkan aktivitas selulase pada suhu optimum diproduksi oleh bakteri temofilik *Bacillus* sp CH43 dan *Bacillus* sp HR68 yang diisolasi dari sumber air panas masing-masing sebesar 70°C dan 65°C. Sama halnya dengan Abdelnasser & Ahmed (2007) yang melaporkan aktivitas selulase isolat *Bacillus anoxybacillus flavithermus* EHP1 yang diisolasi dari sumber air panas memiliki kisaran suhu 30-85°C dengan suhu optimum 75°C. Huang *et al.*, (2005) melaporkan bahwa aktivitas selulase yang diproduksi oleh *Archea Sulfolobus solfataricus* memiliki kisaran suhu 80-100°C dengan suhu optimum sebesar 80°C yang stabil selama 120 menit.



Gambar 6. Aktivitas relatif selulase dengan jangka waktu inkubasi selama 180 menit pada kondisi optimum HAMML-2 (60 °C, pH 5,0), PKL-2 (50 °C, pH 7,0), SPBKK-3 (50 °C, pH 5,0)

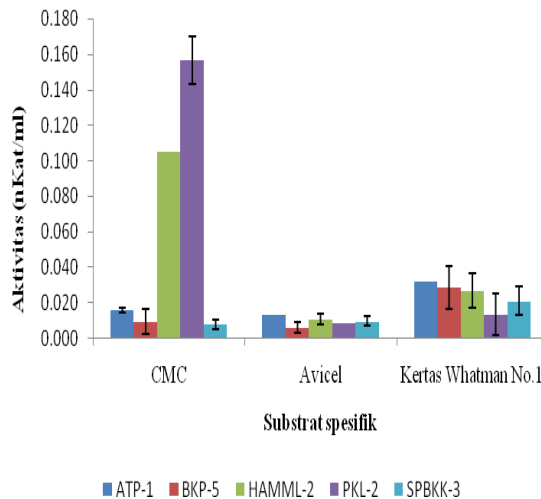
Aktivitas optimum pada substrat spesifik masing-masing isolat pada suhu dan pH optimumnya bervariasi (**Gambar 7**). Substrat yang digunakan adalah CMC, Avicell, dan Whatman *filter paper* No.1. Substrat CMC merupakan substrat selulosa murni yang berbentuk amorf sehingga aktivitas enzim selulase pada substrat CMC merupakan aktivitas enzim endo-1,4- β -glukanase (Lynd *et al.*, 2002). Isolat

HAMML-2 dan PKL-2 memiliki aktivitas enzim selulase yang paling tinggi terhadap substrat CMC yaitu sebesar 0.105 nKat.ml⁻¹ dan 0.157 nKat.ml⁻¹

Aktivitas enzim selulase pada Avicell yaitu substrat selulosa yang berbentuk kristalin, menunjukkan adanya aktivitas enzim ekso-1,4- β -glukanase, yang memotong rantai oligosakarida menjadi selobiosa, yaitu dua molekul glukosa yang berikatan secara β -1,4-glikosidik (Lynd *et al.*, 2002). Semua isolat yang dikarakterisasi dalam penelitian ini memiliki aktivitas enzim selulase pada substrat Avicell yang relatif rendah.

Substrat Whatman *filter paper* No.1 merupakan campuran antara selulosa amorf dan kristalin. Hal ini menunjukkan sinergisme antara enzim endo-1,4- β -glukanase dan ekso-1,4- β -glukanase. Aktivitas selulase tertinggi pada substrat Whatman *filter paper* No.1 ditemukan pada isolat ATP-1 (0.032 nKat.ml⁻¹), BKP-5 (0.029 nKat.ml⁻¹) dan SPBKK-3 (0.021 nKat.ml⁻¹). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim yang dihasilkan mikroba dapat memiliki aktivitas CMC-ase yang tinggi dibandingkan aviselase. Nur &

Krisdianto (2009) melaporkan bahwa isolat SP-2 dan SPS-2 memiliki aktivitas selulase yang tinggi pada substrat CMC, namun tidak memiliki aktivitas pada substrat Avicell dan kertas *Whatman No.1*. Yin *et al.*, (2010) juga melaporkan *Bacillus subtilis* YJ1 memperlihatkan aktivitas yang tinggi pada substrat CMC dan tidak memiliki aktivitas pada substrat Avicell dan kertas *Whatman No.1*.



Gambar 7. Aktivitas selulase isolat ATP-1, BKP-5, HAMML-2, PKL-2 dan SPBKK-3 pada berbagai substrat yang diukur pada pH, suhu dan waktu optimum masing-masing isolat
Keterangan : Bar pada batang menunjukkan simpangan baku.

KESIMPULAN

1. Aktivitas selulase terbaik dihasilkan oleh lima isolat, yaitu ATP-1 (0,025 nKat.ml⁻¹); BKP-5 (0,032 nKat.ml⁻¹) HAMML-2 (0,296 nKat.ml⁻¹); PKL-2 (0,114 nKat.ml⁻¹) dan SPBKK-3 (0,087 nKat.ml⁻¹)
2. Enzim selulase dari isolat ATP-1, BKP-5 dan PKL-2 memiliki aktivitas optimum pada suhu 50 °C pada pH 7,0. Isolat HAMML-2 dan SPBKK-3 masing-masing memiliki aktivitas optimum 60 °C pada pH 5,0 dan 50 °C pada pH 5,0.
3. Isolat HAMML-2 dan PKL-2 memiliki aktivitas enzim selulase yang paling tinggi terhadap substrat CMC sedangkan untuk aktivitas pada substrat *Whatman filter paper No.1* dimiliki oleh isolat ATP-1, BKP-5 dan SPBKK-3.
4. Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh isolat HAMML-2 dan SPBKK-3 pada uji stabilitas terhadap panas mampu mempertahankan kestabilannya pada kondisi optimumnya selama 90 menit, sedangkan aktivitas enzim selulase dari isolat PKL-2 stabil pada kondisi optimumnya selama

120 menit. Selulase yang dihasilkan oleh ketiga isolat ini bersifat termostabil.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelnasser, S.S.I., and I.E. Ahmed. 2007. Isolation and Identification of New Cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Aust. J. Basic Applied Sci.* 1:473-478
- Ariffin, H., N. Abdullah, M.S. Umikalsom, Y. Shirai and M.A. Hasan. 2008. Production of Bacterial Endoglucanase from Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch by *Bacillus pumilus* EB3. *J. Biosci. Bioeng.* 106: 231-236
- Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein Dye Binding. *Anal Biochem* 72 : 248 – 254.
- Dybaker, R. 2001. Unit Katal For Catalytic Activity. *Pure Appl Chem* 73(6) : 927-931.
- Ginting, J. 2009. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Enzim Amilase Kasar Termofilik dari Sumber Air Panas Semangat Gunung Kabupaten Karo Sumatra Utara. Tesis.* Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Sumatra Utara, Medan.
- Haki, G.D., & S.K. Rakshit. 2003. Development In Industrially Important Thermostable Enzymes : A Review. *Bioresource Technology* 89 :17 - 34.
- Hendarsyah, D. 2006. *Karakterisasi Kitin Deasitilase Termostabil Isolat Bakteri asal Pancuran Tujuh Batu Raden Jawa Tengah. Skripsi.* Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Huang, Y., G. Krauss, S. Cottaz, H. Driguez, and G. Lipps. 2005. A Highly Acid-Stable and Thermostable Endo- β -Glukanase from Thermoacidophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem J.* 385: 581-588.
- Ibrahim, A.S.S., & A.I. El-dewany. 2007. Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* I(4): 473-478.
- Lynd, LR, Paul JW, Willem H van Z dan SP. Isak. 2002. Microbial Cellulose: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol and Molecul Biol Reviews* 66(3): 506-577.
- Liang YL, Zhang Z, Wu M, Wu Y, Feng JX. 2014. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and

- optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *BioMed Res Int*;2014:1–13; doi:10.1155/2014/512497.
- Lynd, LR, Paul JW, Willem H van Z dan SP. Isak. 2002. Microbial Cellulose: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol and Molecul Biol Reviews* 66(3): 506-577.
- Maranatha B. 2008. *Aktivitas Enzim Selulase Isolat asal Indonesia pada Berbagai Substrat Limbah Pertanian. Skripsi.* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Mawadza C., H. Rahni, R. Zvauya, and M. Bo. 2000. Purification and Characterization of Cellulases Produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*, 83: 177-187.
- Miller GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Nikolaivits, E., Dimarogona, M., Fokialakis, N., and Topakas, E. 2017. Marinederived biocatalysts: importance, accessing, and application in aromatic pollutant bioremediation. *Front. Microbiol.* 8:265. doi: 10.3389/fmicb.2017.00265
- Nishida Y, Suzuki KI, Kumagai Y, Tanaka H, Inoue A, Ojima T. 2007. Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Biochimie.*, 1-10.
- Nur, HS dan Krisdianto. 2009. *Isolasi dan Seleksi Selulase Bakteri Asal Tanah Pertanian Pasang Surut dalam Upaya menggali Bioaktivator untuk Dekomposisi Limbah Pertanian. Laporan Penelitian Hibah Bersaing, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru.*
- Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K.M., Hughes, S.R., Christopher, L.P., Sani, R.K. 2010. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresour. Technol.* 101 (22), 8798–8806.
- Santana Costa A.F., Galdino Junior C.J., Morais Meira H., Didier Pedrosa De Amorim J., Siva I., Santana Gomes E., Asfora Sarubbo L. 2020, Production of Paper Using Bacterial Cellulose and Residue from the Sugar and Alcohol Industry, *Chemical Engineering Transactions*, 79, 85 - 90).
- Shanmugapriya K, Saravana PS, Krishnapriya MM, Mythili A, Joseph S. 2012. Isolation, screening and partial purification of cellulase from cellulase producing bacteria. *Int J Adv Biotechnol Res* 3:509– 14.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim Dan Bioteknologi.* Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Trincone, A. 2011. Marine biocatalysts: enzymatic features and applications. *Mar. Drugs* 9, 478–499. doi: 10.3390/md9040478

- Turner, P., M. Gashaw, and K.E. Nordberg. 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable. *Microbial cell factories*. 6:9.
- Yin, L.J., H.H. Lin, and Z.R. Xiao. 2010. Purification and Characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *Journal of Marine Science and Technology*. 18 : 466-471
- Zambare V.P., Bhalla A, Muthukumarappan K, Sani RK., Christopher LP. 2011. Bioprocessing of agricultural residues to ethanol utilizing a cellulolytic extremophile. *Extremophiles* 15 (5), 611–618.
- Zhang, C., and Kim, S.-K. 2010. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Mar. Drugs* 8, 1920–1934. doi: 10.3390/md8061920