

Produksi Enzim Selulase Kasar dari Isolat Bakteri B2S8 menggunakan Substrat Brangkas Jagung dengan Perlakuan Konsentrasi Inokulum dan Komposisi Media yang berbeda

Production of Crude Cellulase Enzyme from B2S8 Bacteria Isolate Using Corn Stover Substrate with Inoculum Concentration and Different Media Composition Treatment

Nursatria Purba, Ida Bagus Wayan Gunam*, I Made Mahaputra Wijaya

PS Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Badung, Kode pos : 80361; Telp/Fax : (0361) 701801.

Diterima 09 Desember 2019 / Disetujui 20 Januari 2020

ABSTRACT

The purpose of this study was determined the media and concentration of cellulolytic bacterial isolates to produce high cellulase enzyme activity. Production of crude cellulase enzyme in media and concentration of different bacterial isolate used a factorial Randomized Block Design (RBD) which consist of two factors. The first factor was the media production of different cellulase enzyme consisting of 3 levels, namely media 1, 2 and 3. The second factor was the concentration of bacterial isolate consisting of 5 levels namely 1, 2, 3, 4 and 5%. This study used a B2S8 cellulolytic bacterial isolate that has the highest value of cellulase enzyme activity and the highest degradation rate of cellulose in previous studied and determined the ability of exoglucanase enzyme activity, endoglucanase enzyme and dissolved protein content produced from cellulolytic bacterial isolate. This study used Carboxymethyl Cellulose (CMC) for enzyme activity test and 1% corn stover as a substrate on the media to produce crude cellulase enzyme. The result showed that the highest cellulase enzyme activity in the third media and 5% cellulolytic bacterial inoculum concentration resulted in endoglucanase activity of 0.0332 IU/mL, exoglucanases enzyme activity of 0.0060 IU/mL, dissolved protein content in the amount of 0.5670 mg/mL, the specific endoglucanase activity of 0.0807 IU/mg and the specific activity of exoglucanase of 0.0123 IU/mg.

Keywords: Cellulolytic bacteria, Cellulase enzymes, Enzyme activity, Corn stover.

*Korespondensi Penulis:
Email : ibwgunam@unud.ac.id

PENDAHULUAN

Selulosa tanaman, komponen utama dinding sel tanaman adalah sumber energi terbarukan yang paling melimpah dan murah. Berat kering tanaman mengandung 35–50% selulosa, 20–35% hemiselulosa dan 5–30% lignin. Selulosa tanaman memiliki struktur sangat kristalin yang tidak larut dalam air dan dikelilingi oleh lapisan lignin yang keras. Karena itu, hidrolisis enzimatik selulosa menjadi glukosa sangat sulit dilakukan. Selulase termasuk dalam keluarga besar enzim glikosil hidrolase, termasuk endoglukanase, ekoglukanase dan β -glukosidase. Mikroorganisme yang diidentifikasi sejauh ini terlibat dalam produksi selulase dan enzim terkait adalah bakteri, beberapa jamur, dan actinomycetes. Organisme selulolitik yang berasal dari jamur menghasilkan selulase dapat digunakan dalam proses produksi, pakan ternak, tekstil, bahan bakar dan industri kimia. Namun, karena pertumbuhan jamur yang lambat, biaya produksi selulase tinggi untuk proses ini. Sebaliknya, kultur bakteri, tumbuh dengan cepat dan memiliki waktu generasi yang pendek dan karakteristik menguntungkan lainnya. Dengan demikian bakteri memiliki potensi penerapan yang baik (Yang *et al.*, 2014).

Salah satu sumber lignoselulosa yang melimpah di alam adalah tanaman jagung (Anindyawati, 2010). Di daerah Indonesia bagian Timur, tanaman jagung selain digunakan sebagai pakan segar, dapat juga dikeringkan atau diolah menjadi pakan awet seperti pelet dan disimpan untuk cadangan pakan ternak (Umiyasih, 2008). Di Bali, jagung merupakan bahan pangan, sedangkan brangkasan jagung dan tongkolnya biasanya digunakan untuk pakan ternak dan bahkan dibiarkan begitu saja. Hal ini menyebabkan brangkasan jagung tersebut menjadi hasil samping yang kurang termanfaatkan. Selulosa

yang terkandung pada tanaman umumnya dalam bentuk lignoselulosa.

Untuk mencapai degradasi enzimatik dalam produksi etanol oleh hidrolisis enzimatik, diperlukan proses pretreatment. Beberapa metode telah diperkenalkan untuk pretreatment bahan lignoselulosa sebelum hidrolisis enzimatik. Metode-metode ini diklasifikasikan menjadi pretreatment fisik, pretreatment fisikokimia, pretreatment kimia, dan pretreatment biologis untuk meningkatkan hidrolisis enzimatik dari bahan limbah lignoselulosa (Gunam *et al.*, 2019). Pretreatment merupakan tahapan yang penting dalam konversi biokimia dari biomassa lignoselulosa menjadi contohnya *Biofuel*. Tahapan tersebut mengharuskan untuk merubah struktur biomassa selulosa agar akses ke selulosa menjadi lebih tinggi untuk enzim supaya dapat merubah menjadi gula yang dapat difermentasi (Mosier *et al.*, 2005). Oleh karena itu, proses delignifikasi yang dipilih adalah konsentrasi NaOH 4%, waktu perendaman selama 8 jam pada suhu kamar (Gunam *et al.*, 2019).

Produksi enzim selulase dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, kelembaban, konsentrasi substrat, sumber karbon, pH dan konsentrasi inokulum (Coperland, 2000). Suhu dan pH optimum dalam produksi enzim selulase adalah 36,9°C dan pH 6,9 selama 3 hari (Kusumaningrum *et al.*, 2019). Sumber karbon berperan penting dalam metabolisme sel karena berfungsi sebagai sumber energi dan element struktural sel fungi. Glukosa, sukrosa, fruktosa, maltosa dan pati dapat digunakan sebagai sumber C untuk produksi selulase (Hoa dan Hung, 2013). Dalam media pertumbuhan garam-garam mineral seperti KNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O digunakan sebagai nutrient untuk membantu pertumbuhan sel sedangkan logam kalium pada KNO₃ dan Magnesium pada MgSO₄.7H₂O merupakan kofaktor bagi aktivitas enzim selulase

(Pratiwi, 2008). Inokulum merupakan populasi mikroorganisme atau sel dalam bentuk bahan padat atau cair yang ditambahkan kedalam medium fermentasi. Kriteria inokulum yang perlu diperhatikan adalah kultur mikroba bebas dari kontaminan dan tersedia dalam jumlah yang cukup untuk tercapainya proporsi inokulum dengan medium fermentasi (Sood *et al.*, 2011).

Berdasarkan hal di atas, dilakukan penelitian produksi enzim selulase dari bakteri isolat B2S8 dengan menggunakan substrat brankasan jagung. Pada penelitian ini dievaluasi variabel yang mampu mempengaruhi produksi enzim selulase, dari bakteri ini yaitu media produksi dan konsentrasi inokulum bakteri B2S8 untuk menghasilkan aktivitas enzim yang tinggi.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioindustri dan Lingkungan, Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Analisis Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana. Penelitian dilaksanakan Juli–September 2019.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: brankasan jagung dari petani jagung di daerah Sanur, isolat bakteri selulolitik B2S8 yang diperoleh dari penelitian sebelumnya, Carboxymethyl Cellulosa (CMC) (MERCK), K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, yeast extract, NaOH, $CaCl_2$, pH buffer 4, Ph buffer 7, NH_4NO_3 , $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, peptone, reagen asam dinitro salisilat (DNS), $CuSO_4$ (Merck), natrium kalium tatarat (Merck), Reagen Folin-Ciocalteu (Merck), buffer sodium sitrat, kertas penyaring (whatman no.1), akuades, alkohol 70%, amonium sulfat.

Peralatan yang digunakan dalam

penelitian ini yaitu: gelas ukur, corong pemisah, UV-Vis Spektrofotometer (*Thermo scientific*), pH meter (*Schott instrumen*), *autoclave* (Hirayama), *laminar air flow* (*Wina Airflow*), inkubator (Mettler), *vortex* (*Maxi Max II*), gelas ukur (*Pyrex*), Erlenmeyer (*Herma*), tabung reaksi (*Pyrex*), termometer, pipet mikro (Socorex), pipet tetes, *microtube*, bunsen, *magnetic stirrer* (Precisidig), *hot plate*, timbangan analitik (Shimada), penjepit, labu ukur (Iwaki), botol duran, kapas, aluminium foil, erlenmeyer 250 mL, Erlenmeyer 1000 mL, ependorf, blender, beaker glass, saringan 60 mesh, blue tips, yellow tips, alkoholmeter.

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan ialah Rancangan Acak Kelompok (RAK). Percobaan ini merupakan percobaan faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama ialah jenis media (M) yang terdiri dari tiga level, disajikan pada tabel 1 yaitu M1 sebagai media 1, M2 sebagai media 2 dan M3 sebagai media 3. Faktor kedua ialah jumlah inokulum bakteri (S) yang terdiri dari tiga level, yaitu S1 jumlah inokulum bakteri 1%, S2 dengan jumlah inokulum bakteri sebanyak 2%, S3 dengan jumlah inokulum bakteri sebanyak 3%, S4 dengan jumlah inokulum bakteri sebanyak 4% dan S5 dengan jumlah inokulum bakteri sebanyak 5%.

Berdasarkan faktor diatas diperoleh 15 kombinasi perlakuan, yang masing-masing perlakuan diulang sebanyak 2 kali berdasarkan waktu pelaksanaannya, sehingga diperoleh 30 unit percobaan. Data obyektif yang diperoleh dianalisis dengan Analysis of Variance (ANOVA) dan apabila terdapat pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diamati, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) menggunakan perangkat lunak Minitab 17. Perlakuan terbaik ditentukan dengan perlakuan yang menghasilkan rendemen tertinggi, kadar saponin tertinggi dan ketinggian busa

tertinggi.

Persiapan Isolat dan Substrat

Isolat potensial terbaik bakteri selulolitik B2S8 didapatkan dari Laboratorium Bioindustri dan Lingkungan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana, isolat ini sudah melalui uji konfirmasi enzim selulase spesifik dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Nababan *et al.*, (2019). Kemampuan isolat bakteri selulolitik tersebut dalam menghasilkan enzim selulase telah melalui tahap pengujian kualitatif yaitu dengan pengukuran zona bening sehingga diperlukan pengujian kualitatif lanjutan guna untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri selulolitik tersebut dalam menghasilkan enzim selulase. Bahan yang digunakan sebagai substrat penelitian ini adalah brangkasan jagung dari petani sanur umur 3 bulan menggunakan batang dan daun yang sudah berwarna coklat tua.

Pengecilan ukuran

Limbah lignoselulosa brangkasan jagung ditimbang dan dikeringkan dengan menggunakan oven, sampai kadar air 10%. Setelah kering dihancurkan dengan menggunakan alat penggiling hingga menjadi bubuk yang lolos ayakan 60 mesh, selanjutnya diperoleh bubuk lignoselulosa dengan ukuran seragam (Gunam *et al.*, 2019).

Delignifikasi

Bubuk brangkasan jagung ditimbang 100 g yang sudah diayak 60 mesh untuk mendapatkan lignoselulosa bubuk yang seragam, kemudian dimasukkan ke dalam wadah dan diberi larutan 4% NaOH dengan perbandingan 1:10, direndam selama 8 jam pada suhu kamar. Setelah filtrasi, padatan yang diperoleh dicuci sampai pH netral dari pencucian diperoleh, diikuti dengan pengeringan dalam suhu oven pada 105 ° C hingga berat konstan (Gunam *et al.*, 2019).

Pembuatan media cair

Pembuatan media padat untuk uji konfirmasi bakteri selulolitik terdiri dari: KH_2PO_4 1,36 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, NaCl 2 g, yeast ekstrak 1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, CMC 5 g, dalam satu liter air destilat pada pH 6,8–7 yang selanjutnya dicampur dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut lalu dimasukkan ke dalam botol duran 1 liter (Gupta *et al.*, 2012; Dar *et al.*, 2015).

Peremajaan dan perbanyakan sel bakteri selulolitik

Isolat bakteri B2S8 dilakukan peremajaan dengan menginokulasikan 1 mL isolat ke setiap Erlenmeyer sebanyak 5 buah yang berisi 100 mL medium selulolitik yang mengandung CMC 1%, diinkubasi pada suhu ruang selama 42 jam dan digojoj dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya, dilakukan perbanyakan sel dengan menginokulasikan hasil peremajaan ke Erlenmeyer 1000 mL yang berisi 700 mL medium selulolitik yang mengandung CMC 1%, diinkubasi pada suhu ruang selama 72 jam dan digojoj dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit dan dicuci sebanyak 2 kali pengulangan dengan menggunakan NaCl 0.85% dan kemudian diatur $\text{OD}_{660\text{nm}}=5$ (Gupta *et al.*, 2012)

Produksi enzim selulase kasar pada media yang berbeda

Penggunaan brangkasan jagung pada produksi enzim selulase kasar berfungsi sebagai substrat dan sebagai zat penginduksi (*inducer*) untuk menghasilkan enzim selulase kasar. Sebanyak 15 buah erlenmeyer berisi 100 mL media cair yang berbeda dengan campuran substrat brangkasan jagung dengan konsentrasi 1% dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali sehingga diperoleh 30 unit percobaan, setelah media (media 1, 2, 3) steril didinginkan pada suhu ruang kemudian

ditambah pellet sel kultur yang sudah di adjust OD-nya=5 pada spektrofotometer panjang gelombang 660nm sebanyak 1, 2, 3, 4 dan 5% kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam *waterbath shaker* selama 3 hari

(Pandey *et al.*, 2015). Setelah diinkubasi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C (Duza and Mastan, 2013).

Tabel 1. Komposisi media produksi enzim selulase

Media 1 (Macedo <i>et al.</i> , 2013)	Media 2 (Dar <i>et al.</i> , 2015)	Media 3 (Atlas, 2010)
KH ₂ PO ₄ 6 g	KH ₂ PO ₄ 1.36 g	KH ₂ PO ₄ 1 g
K ₂ HPO ₄ 3 g	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g	K ₂ HPO ₄ 1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O 0,1 g	MgSO ₄ .7H ₂ O 0.2 g	MgSO ₄ .7H ₂ O 0,2 g
CaCl ₂ 0,1 g	CaCl ₂ .2H ₂ O 0.01 g	CaCl ₂ 0,02 g
MnSO ₄ .7H ₂ O 0,02 g	NaCl 2 g	NH ₄ NO ₃ 1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O 0,02 g	Yeast ekstrak 1 g	FeCl ₃ .6H ₂ O 0,05 g
Brangkasan Jagung 10 g	Brangkasan Jagung 10 g	Brangkasan jagung 10 g
		Peptone 2 g

Uji aktivitas endoglukonase (CMCase)

Aktivitas endoglukonase diuji dengan menggunakan campuran reaksi yang mengandung 1 mL larutan enzim selulase kasar dengan 1 mL larutan 1% CMC pada buffer sodium sitrat (pH 5,4) diinkubasi pada suhu 50°C selama 15 menit reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 mL asam dinitrosalisilat lalu dididihkan selama 5 menit (Dar *et al.*, 2015). Aktivitas selulase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu IU/mL. Satu unit merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah 1 µmol selulosa menjadi gula pereduksi per menit pada kondisi pengujian. Kadar glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa dengan enzim selulase berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 540 nm dan perhitungan berdasarkan kurva standar (Huang *et al.*, 2012; Duza and Mastan 2013; Dar *et al.*, 2015). Dari data yang didapatkan untuk standar glukosa ini memiliki kemiringan dengan persamaan $y = ax - b$ dengan x merupakan konsentrasi glukosa (mg/mL) dan y absorbansi terbaca oleh spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 540 nm. Sehingga didapatkan persamaan untuk mengetahui konsentrasi glukosa dalam sampel yaitu:

$$x = \frac{y + b}{a}$$

Konsentrasi glukosa dikonversi dalam satuan IU/mL:

1 IU = 1 µmol/menit glukosa yang dihasilkan
= 0,18 mg/menit glukosa

Sehingga,

$$\text{Aktivitas Enzi} = \frac{\text{Massa glukosa}}{\text{BMG} \times \text{Ve} \times \text{T}} \mu\text{mol/menit mL(IU/mL)}$$

Keterangan:

BMG = Berat Molekul Glukosa (180 g/mol)

Ve = Volume Ekstrak Kasar Enzim (mL)

T = Waktu Inkubasi (menit)

Uji aktivitas eksoglukanase (FPase)

Aktivitas eksoglukanase (FPase) diuji dengan menggunakan campuran reaksi yang mengandung 1 mL larutan enzim kasar (supernatan) dengan 2 buah (1x1.5 cm) kertas Whatman No.1 dan 1 mL buffer sodium sitrat 50 mM (pH 5.0) diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 mL asam dinitrosalisilat lalu dididihkan selama 5 menit. Kadar glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa dengan enzim selulase berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 540 nm dan perhitungan berdasarkan kurva standar (Dar *et al.*, 2015). Dari data yang didapatkan

untuk standar glukosa ini memiliki kemiringan dengan persamaan $y = ax - b$ dengan x merupakan konsentrasi glukosa (mg/mL) dan y absorbansi terbaca oleh spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 540 nm. Sehingga didapatkan persamaan untuk mengetahui konsentrasi glukosa dalam sampel yaitu:

$$x = \frac{y + b}{a}$$

Sehingga,

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Massa glukosa}}{\text{BMG} \times \text{Ve} \times \text{T}} \mu\text{mol} \\ \text{/menit mL(IU/mL)}$$

Keterangan:

BMG = Berat Molekul Glukosa (180 g/mol)

Ve = Volume Ekstrak Kasar Enzim (mL)

T = Waktu Inkubasi (menit)

Pengukuran kadar protein terlarut

Pengukuran kadar protein total dilakukan dengan menggunakan metode Lowry. Larutan yang dibutuhkan yaitu larutan A yaitu 2% Na_2CO_3 dalam 0,1 N NaOH, larutan B yaitu 2% Natrium Kalium Tarat dalam aquades, larutan C yaitu 1% CuSO_4 dalam aquades dan 1 N Reagen Folin-

Ciocalteu. Pembuatan larutan biuret yang terdiri dari larutan A, B dan C dengan perbandingan 100:1:1. Sampel enzim ekstrak kasar sebanyak 0,15 mL ditaruh dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 3 mL larutan biuret, diamkan selama 10 menit. Setelah 10 menit ditambahkan larutan Folin sebanyak 0,3 mL divorteks dan didiamkan selama 30 menit. Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV visible pada panjang gelombang 750 nm (Lowry, 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas enzim endoglukanase

Analisis aktivitas ekstrak kasar selulase dari isolat bakteri B2S8 ini ditentukan dengan mengukur kadar glukosa hasil hidrolisis enzim selulase dari substrat CMC dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi (Rahayu *et al.*, 2014). Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi jenis media produksi dan konsentrasi inokulum isolat bakteri B2S8 berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap aktivitas enzim selulase.

Tabel 2. Nilai rata-rata hasil analisis aktivitas endoglukanase U/mL

Media Produksi	Konsentrasi Sel Bakteri (%)				
	1	2	3	4	5
Media 1	0,0096 ±	0,0113 ±	0,0141 ±	0,0172 ±	0,0210 ±
	0,0000(k)	0,0000(j)	0,0002(i)	0,0001(g)	0,0001(f)
Media 2	0,0083 ±	0,0102 ±	0,0134 ±	0,0156 ±	0,0207 ±
	0,0002(l)	0,0002(k)	0,0001(i)	0,0002(h)	0,0000(f)
Media 3	0,0228 ±	0,0257 ±	0,0279 ±	0,0309 ±	0,0332 ±
	0,0002(e)	0,0004(d)	0,0001(c)	0,0001(b)	0,0000(a)

Keterangan: Huruf berbeda di belakang nilai rata-rata menunjukkan perbedaan yang sangat nyata pada taraf kesalahan 1% ($p < 0,05$).

Jenis Media 3 dengan konsentrasi inokulum bakteri 5% menghasilkan nilai rata-rata aktivitas tertinggi yaitu sebesar 0,0332 IU/mL dan jenis Media 2 dengan konsentrasi inokulum bakteri 1% menghasilkan nilai rata-rata terendah yaitu 0,0083 IU/mL (Tabel 1). Hal ini menunjukkan konsentrasi inokulum

yang bertambah besar. Menyebabkan aktivitas mikroorganisme dalam mendegradasi selulosa menjadi lebih cepat sehingga pertumbuhannya menjadi pesat. Pertumbuhan yang pesat pada mikroorganisme mengakibatkan pembentukan biomassa menjadi lebih besar

(Sari *et al.*, 2017). Vasudeo dan Lew (2011) memperoleh hasil selulase maksimum dari *B. amyloliquefaciens* UNPDV-22 pada pH 5,25, dan ukuran inokulum 4,95% (v/v). Semakin tinggi aktivitas enzim semakin banyak gula pereduksi yang dihasilkan. Degradasi selulosa secara enzimatik sangat dibutuhkan untuk menghasilkan gula yang tinggi. Penggunaan media pepton akan memaksimalkan kecepatan metabolisme sel untuk mengkonsumsi gula lebih tinggi dan pepton juga sebagai sumber nitrogen utama pada media produksi sehingga menghasilkan pertumbuhan biomassa yang lebih tinggi (Sunaryanto, 2015). Komponen utama untuk

berlangsungnya metabolisme sel mikroorganisme baik untuk pertumbuhan sel untuk menghasilkan metabolit tertentu sangatlah penting. Selain sumber karbon dan sumber nitrogen dalam media fermentasi juga terkandung element seperti Fe, Mn, Ca, Co (Deesuth *et al.*, 2012).

Aktivitas enzim filter paperasi (eksoglukanase)

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan media dan konsentrasi inokulum bakteri isolat B2S8 berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap aktivitas enzim selulase.

Tabel 3. Nilai rata-rata hasil analisis aktivitas filter-paperasi (eksoglukanase) (IU/mL)

Media Produksi	Konsentrasi Sel Bakteri (%)				
	1	2	3	4	5
Media 1	0,0015 ± 0,0000(j)	0,0017 ± 0,0000(j)	0,0022 ± 0,0000(h)	0,0029 ± 0,0000(f)	0,0030 ± 0,0000(f)
Media 2	0,0016 ± 0,0000(j)	0,0020 ± 0,0000(i)	0,0022 ± 0,0000(h)	0,0026 ± 0,0000(g)	0,0030 ± 0,0000(g)
Media 3	0,0033 ± 0,0000(e)	0,0035 ± 0,0000(d)	0,0042 ± 0,0000(c)	0,0052 ± 0,0000(b)	0,0060 ± 0,0000(a)

Keterangan: Huruf berbeda di belakang nilai rata-rata menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf kesalahan 5% ($p < 0,05$).

Jenis Media 3 produksi enzim selulase kasar dengan konsentrasi inokulum bakteri isolat B2S8 5% menghasilkan rata-rata aktivitas enzim eksoglukanase tertinggi yaitu sebesar 0,0060 IU/mL. Sedangkan jenis Media 1 untuk produksi enzim eksoglukanase dengan konsentrasi inokulum bakteri selulolitik 1% menghasilkan rata-rata enzim eksoglukanase terendah sebesar 0,0015 IU/mL. Penggunaan jenis media (Tabel 3) dan konsentrasi inokulum bakteri isolat B2S8 berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim eksoglukanase yang dihasilkan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Hasil hidrolisis selulosa dimanfaatkan oleh bakteri untuk pertumbuhan dalam media produksi enzim. Adapun penelitian Guha *et al.*, (2013), menyatakan bahwa aktivitas xilanase

Bacillud sp. optimum pada media yang memakai pepton sebagai sumber nitrogennya dan menghasilkan aktivitas enzim sebesar 1,2 IU/mL. Kebutuhan sumber nitrogen setiap jenis mikroorganisme sangat spesifik dan berbeda-beda. Mikroorganisme yang sejenis tetapi dari sumber yang berbeda, akan berbeda pula kebutuhan sumber nitrogennya (Sari dan Kusdiyantini, 2017). Sumber karbon terbaik untuk fermentasi adalah 1% tepung jagung, sedangkan 2% senyawa pepton dan ragi adalah sumber nitrogen terbaik (Yang *et al.*, 2014). Isolat yang memiliki aktivitas selulase pada substrat kertas saring, yaitu selulosa sintetik campuran antara selulosa amophours dan kristalin, menunjukkan isolat tersebut memiliki sinergisme antara enzim end-1,4-β-

glukanase dan ekso-1,4- β -glukanase untuk mereduksi selulosa menjadi glukosa.

Kadar protein terlarut

Hasil sidik ragam menunjukkan

Tabel 4. Nilai rata-rata hasil analisis kadar protein (mg/mL)

Media produksi	Konsentrasi sel Bakteri (%)				
	1	2	3	4	5
Media 1	0,1196 \pm 0,0027(j)	0,1533 \pm 0,0013(i)	0,1687 \pm 0,0013(h)	0,1880 \pm 0,0068 (g)	0,2150 \pm 0,0013(f)
Media 2	0,1196 \pm 0,0027(j)	0,1610 \pm 0,0013(hi)	0,1668 \pm 0,0013(hi)	0,1977 \pm 0,0041(g)	0,2189 \pm 0,0041(f)
Media 3	0,2642 \pm 0,0055(e)	0,3365 \pm 0,0013(d)	0,4021 \pm 0,0013(c)	0,5120 \pm 0,0014(b)	0,5670 \pm 0,0081(a)

Keterangan: Huruf berbeda di belakang nilai rata-rata menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf kesalahan 5% ($p < 0,05$).

Jenis Media 3 produksi enzim selulase kasar dengan konsentrasi inokulum bakteri isolat B2S8 5% menghasilkan rata-rata kadar protein tertinggi yaitu 0,5670 mg/mL sedangkan kadar protein terendah pada media pertama dan kedua untuk produksi enzim selulase dengan konsentrasi inokulum bakteri selulolitik 1% adalah 0,1196 mg/mL. Penggunaan media (Tabel 1) dan konsentrasi inokulum bakteri isolat B2S8 berpengaruh nyata terhadap kadar protein terlarut pada enzim selulase kasar yang dihasilkan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Pada penelitian ini kadar protein terlarut dalam filtrat enzim kasar diasumsikan sebagai protein enzim selulase.

bahwa perlakuan jenis media dan konsentrasi inokulum bakteri isolat B2S8 antar perlakuan berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap kadar protein.

Penambahan bakteri selulolitik berpengaruh terhadap peningkatan kadar protein pada pembuatan selulase. Karbohidrat terlarut pada substrat dimanfaatkan oleh bakteri selulolitik sebagai nutrisi untuk pertumbuhannya sehingga dalam masa inkubasi bakteri selulolitik akan berkembang lebih banyak (Rastogi *et al.*, 2009).

Aktivitas spesifik endoglukanase

Berdasarkan hasil sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi perlakuan jenis media produksi enzim selulase kasar dan konsentrasi inokulum bakteri berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap aktivitas spesifik endoglukanase.

Tabel 5. Nilai rata-rata hasil analisis aktivitas spesifik endoglukanase IU/mg

Media Produksi	Konsentrasi Sel Bakteri (%)				
	1	2	3	4	5
Media 1	0,0807 \pm 0,0017(a)	0,0629 \pm 0,0004(b)	0,0572 \pm 0,0004(c)	0,0513 \pm 0,0018(d)	0,0448 \pm 0,0003(e)
Media 2	0,0807 \pm 0,0017(a)	0,0599 \pm 0,0004(bc)	0,0578 \pm 0,0004(c)	0,0488 \pm 0,0010(d)	0,0441 \pm 0,0007(e)
Media 3	0,0365 \pm 0,0007(f)	0,0287 \pm 0,0000(g)	0,0240 \pm 0,0000(h)	0,0188 \pm 0,0000(i)	0,0170 \pm 0,0002(i)

Keterangan: Huruf berbeda di belakang nilai rata-rata menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf kesalahan 5% ($p < 0,05$).

Tabel 5 menunjukkan bahwa nilai rata-rata aktivitas spesifik endoglukanase tertinggi 0,0807 IU/mg yang diperoleh dari interaksi perlakuan media pertama dan kedua dengan konsentrasi inokulum bakteri 1%, sedangkan nilai terendah 0,0170 IU/mg, diperoleh dari perlakuan media ketiga dengan konsentrasi inokulum bakteri 5%, lebih tinggi kadar protein yang dihasilkan dari pada peningkatan aktivitas enzim, sehingga menghasilkan nilai perbandingan yang tinggi sebagai aktivitas spesifiknya. Pada interaksi perlakuan konsentrasi inokulum bakteri 5% dan konsentrasi inokulum bakteri menghasilkan perbandingan yang rendah, sehingga menghasilkan aktivitas spesifik yang rendah pula. Hal ini menunjukkan

aktivitas enzim yang tinggi belum tentu menghasilkan aktivitas spesifik yang tinggi tergantung pada kadar protein yang dihasilkan karena aktivitas spesifik diperoleh dengan membagikan aktivitas enzim dengan kadar protein yang dihasilkan. semakin besar kadar protein maka aktivitas spesifik suatu enzim akan semakin kecil (Richardson *et al.*, 2002).

Aktivitas spesifik eksoglukanase

Berdasarkan hasil sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi perlakuan jenis media produksi enzim selulase kasar dan konsentrasi inokulum bakteri berpengaruh sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap aktivitas spesifik eksoglukanase.

Tabel 6. Nilai rata-rata hasil analisis aktivitas spesifik eksoglukanase (IU/mL)

Media Produksi	Konsentrasi Sel Bakteri (%)				
	1	2	3	4	5
Media 1	0,0123 ± 0,0002(a)	0,0096 ± 0,0001(b)	0,0087 ± 0,0000(c)	0,0078 ± 0,0002(d)	0,0068 ± 0,0000(ef)
Media 2	0,0123 ± 0,0002(a)	0,0091 ± 0,0000(bc)	0,0088 ± 0,0000(c)	0,0074 ± 0,0001(de)	0,0067 ± 0,0001(f)
Media 3	0,0056 ± 0,0001(g)	0,0044 ± 0,0000(h)	0,0037 ± 0,0000(i)	0,0029 ± 0,0000(j)	0,0026 ± 0,0000(j)

Keterangan: Huruf berbeda di belakang nilai rata-rata menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf kesalahan 5% ($p < 0,05$).

Tabel 6 menunjukkan bahwa nilai rata-rata aktivitas spesifik endoglukanase tertinggi 0,0123 IU/mg yang diperoleh dari interaksi perlakuan media pertama dan kedua dengan konsentrasi inokulum bakteri 1%, sedangkan nilai terendah 0,0026 IU/mg diperoleh dari perlakuan media ketiga dengan konsentrasi inokulum bakteri 5%. Hal ini disebabkan karena terjadinya peningkatan filter paperase pada interaksi perlakuan media ketiga dengan konsentrasi inokulum bakteri 1% lebih tinggi dari pada peningkatan kadar protein terlarut, sehingga menghasilkan nilai perbandingan yang lebih tinggi sebagai aktivitas spesifik. Pada interaksi perlakuan jenis media ketiga dengan konsentrasi

inokulum bakteri 5% menghasilkan aktivitas spesifik yang lebih rendah. Hal ini disebabkan peningkatan aktivitas filter paperase yang lebih rendah daripada penurunan kadar protein terlarutnya sehingga aktivitas spesifik yang dihasilkan lebih rendah. Aktivitas spesifik enzim menunjukkan kemurnian suatu enzim. Semakin tinggi aktivitas spesifik, maka semakin tinggi pula tingkat kemurnian enzim tersebut. Hal ini disebabkan karena hilangnya protein non-enzim pada beberapa tahap pemisahan yang dilalui dalam pemurnian enzim (Humbird *et al.*, 2011).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan, antara lain:

1. Perlakuan media dan konsentrasi inokulum bakteri isolat B2S8 pada produksi enzim selulase kasar berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas enzim endoglukanase dan enzim endoglukanase.
2. Perlakuan media dengan konsentrasi inokulum bakteri selulolitik isolat B2S8 dengan konsentrasi inokulum bakteri 5% merupakan perlakuan terbaik untuk memproduksi enzim selulase kasar dengan menghasilkan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 0,0332 IU/mL, aktivitas enzim eksoglukanase sebesar 0,0060 IU/mL, kadar protein terlarut sebesar 0,5670 mg/mL, aktivitas spesifik endoglukanase sebesar 0,0807 IU/mg dan aktivitas spesifik eksoglukanase sebesar 0,0123 IU/mg.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai analisis konsentrasi substrat brangkasan jagung dan lama fermentasi terhadap aktivitas enzim selulase kasar dari bakteri isolat B2S8.

DAFTAR PUSTAKA

- Anindyawati, T. 2010. Potensi Selulase dalam Mendegradasi Lignoselulosa Limbah Pertanian untuk Pupuk organik. *Jurnal Selulosa*, 45(2):175 – 180.
- Atlas, R. M. 2010. *Handbook of Microbiological Media*. CRC press, Boca Raton, pp. 145 – 1463.
- Coperland, R. A. 2000. *Enzymes 2nd edition: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*. A Jhon Wiley and Sons, Inc. Publication. New York.
- Dar, A.M., K.D. Pawar., J.P. Jadhav., and R.S. Pandit. 2015. Isolation of Cellulytic Bacteria from the Gastro-intestinal tract of *Achatina fulica* (gastroda: pulmonata) and their Evaluation form Cellulose Biodegration. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 98:73 – 80.
- Deesuth, O., P. P. Laopaiboon. L. Jaisil. Laopaiboon. 2012. Optimization of Nitrogen and Metal ions Supplementation for Very High Gravity Bioethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice Using an Orthogonal Array Design. *Enegies* 5(2):3178 – 3197.
- Duza, M.B, and S.A. Mastan. 2013. Isolation, Characterization and Screening of Enzyme Producing Bacteria from Different Soil Samples. *International Journal of pharma and bio sciences*, 4(2):813 – 824.
- Guha, S., S. Bhutty., S.M.P. Kurana., U.K. Kohli. 2013. Optimization of Cultural Conditions for Production of Thermo-Alkali Tolerant Xylanase from *Bacillus* sp. *International Journal of Reseach in Pure and Applied Microbiology*. 3(4):116 – 120.
- Gunam, I. B. W., Aryanta, W. R. & Darma, I. B. N. S. 2011. Produksi Selulase Kasar dari Kapang *Trichoderma viride* dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi. *Jurnal Biologi Udayana*, 15(2).
- Gunam, I. B. W., N. S Antara., A.A.M.D Anggreni., Y. Setiyo., I.P.E Wiguna., I.M.M Wijaya., And I.W.W.P Putra., 2019. Chemical Pretreatment of

- Lignocellulosic Wastes for Cellulose Production by *Aspergillus niger* FNU 6018. Proceedings of the 2nd International Conference on Biosciences and Medical Engineering (ICBME2019). 020040 – 2.
- Gupta, P., K. Samant., and A. Sahu. 2012. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of their Cellulolytic Potential. International Journal of Microbiology. 10:1 – 5.
- Hartanti. 2010. Isolasi dan Seleksi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Kawah Air Panas Gunung Pancar, Bogor. Skripsi FMIPA IPB, Bogor.
- Hoa, B. T. And P. V. Hung. 2013. Optimization of Nutritional Composition and Fermentation Conditions for Cellulase and Pectinase Production for Cellulase and Pectinase Production by *Aspergillus oryzae* using Response Surface Methodology. International Food Research Journal. 20(6):3269 – 3274.
- Humbird, D., R. Davis., L. Tao., C. Kinchin., D. Hsu., A. Aden., P. Schoen., J. Lukas., B. Olthof., M. Worley., and D. Sexton. 2011. Process Design and Economics for biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. National Renewable Energy Lab.(NREL), Golden, CO (United States). No. NREL/TP-5100 – 47764.
- Kusumaningrum, A., . I.B.W. Gunam., dan M.M Wijaya. 2019. Optimasi Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Endoglukanase Menggunakan Response Surface Methodology (RSM). Jurnal Rekayasa dan Manajemen Industri. 7(2):243 – 253.
- Lowry, Rosenbrough, Farr, Randall. 1990. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Kluwer Academic Publishers. New York.
- Lynd, L. R., P.J. Weimer., W.H. Van-Zyl.,and I.S. Pretorius. 2002. Microbial Cellulosa Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology Mol. Biol. 56:506 – 577.
- Mosier, N., C. Wynman. 2005. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. Bioresource Technology. 96(6):673 – 686.
- Nabanan, M., I.B.W. Gunam., I.M.M. Wijaya. 2019. Produksi Enzim Selulase Kasar dari Bakteri Selulolitik. Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri. 7(2):190 – 199.
- Rahayu, A.G., Y. Haryani., dan F. Puspita. 2014. Uji aktivitas selulolitik dari tiga isolat bakteri *Bacillus* sp. galur lokal Riau. Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau, 1(2): 12 – 20.
- Rastogi, G., Muppidi, G.L., Gurrum, R.N., Adhikari, A., Bischoff, K.M., Hughes, S.R., Apel, W.A., Bang, S.S., Dixon, D.J. and Sani, R.K. 2009. Isolation and Characterization of Cellulose-Degrading Bacteria from the Deep Subsurface of the Homestake Gold Mine, Lead, South Dakota, USA. Journal of industrial microbiology and biotechnology. 36(4): 585-697.
- Richardson, T.H., X. Tan., G. Frey., W. Callen., M. Cabell., D. Lam., J. Macomber., J.M Short., D.E. Robertson, and C. Miller. 2002. A Novel, High Performance Enzyme for

- Starch Liquefaction Discovery and Optimization of a Low pH, Thermostable α -amylase. *Journal of Biological Chemistry*. 277(29): 26501 – 26507.
- Sari, A. R., E. Kusdiyantini., dan M.I. Rukmi. 2017. Produksi Selulase Oleh Kapang *Aspergillus* sp. Hasil Isolasi dari Limbah Pengolahan Sagu (*Metroxylon* sp.) dengan Variasi Konsentrasi Inokulum pada Fermentasi Terendam Statis. *Jurnal Akademika Biologi*. 6(1): 11 – 20.
- Sari, R., dan R. Prayudyaningsih. 2015. Rhizobium: Pemanfaatannya sebagai Bakteri Penambat Nitrogen. *Buletin Eboni*. 12(1):51 – 64.
- Sood. S., S. Bhat., R. Shinghai., And A. Kumar. 2011. Upstream Processing Inoculum Preparation in: Murray Moo-Young (ed.). *Comprehensive Biotechnology*, second edition Elsevier. 2: 151 – 164.
- Sunaryanto, R., dan B. H. Handayani. 2015. Penentuan Kombinasi Medium Terbaik Galaktosa dan Nitrogen pada Proses Produksi Etanol. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 2(1):2442 – 2606.
- Umiyasih, U. dan E. Wina. 2008. Pengolahan dan Nilai Nutrisi Limbah Tanaman Jagung sebagai Pakan Ternak Ruminansia. *Wartazoa*. 18(3):127 – 136.
- Wijaya, Rudi. 2002. Karakterisasi Enzim Serupa Tripsin dari cacing Tanah, Tesis, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Yang, W., F. Meng., J. Peng., P. Han., F. Fang., L. Ma., and B. Cao. 2014. Isolation and Identification of a Cellulolytic Bacterium from the Tibetan Pig's Intestine and Investigation of its Cellulase Production. *Electronic Journal of Biotechnology*. 11(3): 262-267.