

UJI AKTIVITAS SELULASE BAKTERI SELULOLITIK YANG BERASAL DARI TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT

CELLULASE ACTIVITY TEST OF CELLULOLYTIC BACTERIA FROM OIL PALM EMPTY FRUIT BUNCH

Hamka^{(1)*}, Mujibu Rahman⁽¹⁾, Theresia Adi Susanti⁽¹⁾

^{(1)*}Program Studi Teknologi Pengolahan Hasil Perkebunan Politeknik Pertanian Negeri Samarinda

ABSTRACT

Cellulose is the main constituent component of photosynthesis in the plant biomass composed of fibrous and woody material such as straw, weeds, grass, leaves, stems and branches of plants. Cellulose in nature is rarely found in pure form but together with lignin and hemicellulose. Cellulose can be degraded by specific organisms such as bacteria, fungi, actinomycetes, and the lower animals. In this research, bacteria was isolated from oil palm empty fruit bunch and inoculating used carbon source of carboxy methyl cellulose (CMC) and enhanced by mineral salts. There were 9 (nine) bacteria isolates collected and identified by Gram stain test and colony morphologies of bacteria cells. Two of bacteria isolates were shown cellulase activity by clearing zone marked on surface of CMC agar medium with use congo red solution (1% v/v) and destained by NaOH solution of 1 M. Futhermore, one of two bacteria isolates (bac 2.3) was chosen to next experiment for determining cellulase activity and reducing sugar. The result of study showed that bac 2.3 isolate was produced cellulase activity as 15.79 units/mL and reducing sugar as 1.42 mg/mL on 36 hours of incubation time. Keywords: bacteria, cellulase activity, reducing sugar, carboxy methyl cellulose, oil palm empty fruit bunch

ABSTRAK

Selulosa merupakan komponen penyusun utama dari fotosintesis di dalam biomassa tanaman yang terdiri dari bahan berserat dan berkayu seperti jerami, rumput liar (tanaman pengganggu), rumput, daun-daunan, batang dan ranting tanaman. Selulosa di alam jarang terdapat dalam bentuk murni tetapi bersama-sama dengan lignin dan hemiselulosa. Selulosa dapat didegradasi oleh organisme spesifik diantaranya bakteri, fungi, actinomycetes dan hewan tingkat rendah (serangga). Pada penelitian ini bakteri diisolasi dari tandan kosong kelapa sawit dan diinokulasi menggunakan sumber karbon yakni Carboxy Methyl Cellulose (CMC) dan diperkaya dengan garam mineral. Ada 9 (sembilan) isolat bakteri yang diisolasi dan telah diidentifikasi dengan metode pengecatan Gram dan koloni morfologi sel bakteri. Dua (2) isolat bakteri menunjukkan aktivitas selulase yang ditandai terdapatnya zona bening dipermukaan CMC agar menggunakan larutan congo red (1% (v/v) dan penghilangan warna dengan sodium hidroksida (NaOH). 1M. Selanjutnya 1 (satu) isolat bakteri yang terbaik dipilih yaitu isolat bakteri Bac. 2.3 untuk dilanjutkan dalam penentuan aktivitas selulase dan gula reduksi. Hasil penelitian didapatkan bahwa isolat bakteri Bac. 2.3 menghasilkan aktivitas selulase dan gula reduksi sebesar 15.79 units/mL dan 1.42 mg/mL pada inkubasi waktu selama 36 jam.

Kata kunci: bakteri, aktivitas selulase, gula reduksi, carboxy methyl cellulose, tandan kosong kelapa sawit

I. PENDAHULUAN

Selulosa merupakan komponen penyusun utama dari fotosintesis di dalam biomassa tanaman yang terdiri dari bahan berserat dan berkayu seperti jerami, rumput liar (tanaman

pengganggu), rumput, daun-daunan, batang dan ranting tanaman (Jarvis, 2003). Selulosa adalah polimer linear yang terdiri molekul D-anhidrogluko piranosa yang bergabung bersama oleh ikatan β -1,4 glikosidik dari derajat

polimerisasi (Lynd *et al*, 2005) Menurut Schwarz, (2001) selulosa sulit mengalami degradasi karena berbentuk kristal dan tidak larut dalam air. Selain itu selulosa di alam jarang terdapat dalam bentuk murni tetapi bersama-sama dengan lignin dan hemiselulosa.

Selulosa dapat didegradasi oleh organisme spesifik diantaranya bakteri, fungi, actinomycetes dan hewan tingkat rendah (serangga). Baru-baru ini, beberapa bakteri; *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium josui*, *Ruminococcus albus* dan *Actinomycetes*: *Thermoactinomyces sp.*, *Thermomonospora curvata* serta *Streptomyces sp.*, dilaporkan sebagai penghasil selulosa menggunakan substrat yang berbeda seperti selulosa, karboksimetilselulosa, pati, dan glukosa sebagai sumber karbon (Schwarz, 2001; Belaich *et al*, 2002; Lopez-Contreras *et al*, 2004; dan Keller *et al*, 2005).

Selulase (1,4- β -D-glukan glukanohidrolase) adalah multienzim

II. METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Adapun peralatan yang digunakan adalah digital balance 6 digit, laminar air flow, microwave, refrigerator, freezer, microscope, hot plate and stirrer, vortex mixture, UV-visible spectrophotometer, autoclave, micro pipet (100-1000 μ L), micro pipet (20-200 μ L), micropipette (1-5 mL) and micropipette (2-20 μ L), incubator, pH Meter, centrifuge, small centrifuge, mini spin, water bath and digital camera. Sedangkan untuk alat gelas adalah beaker, glass rod, burette, glass funnels, erlenmeyer; 125, 250, 500 and 1,000 mL, volumetric cylinder, loop, oose, dan tabung reaksi

Sementara bahan kimia yang digunakan adalah KH_2PO_4 , NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CMC, dinitrosalicylic acid (DNS), rochelle salt, sodium carbonate, fenol, glukosa, akuades, congo red, agar dan bahan kimia lain.

Sumber Bakteri Selulolitik

kom-pleks yang terdiri dari tiga komponen utama yaitu endo- β -glukanase, exo- β -glukanase dan β -glukosidase dimana telah menunjukkan aktivitasnya secara sinergi dalam menghidrolisa selulosa (Emert *et al*, 1974; Ryu and Mandels, 1980).

Indonesia sebagai salah satu negara penghasil terbesar dan pemasok minyak kelapa sawit disamping itu juga sebagai penghasil tandan kosong kelapa sawit (TKKS) yang dianggap sebagai limbah dan tidak dimanfaatkan secara optimal. Diperlukan perhatian yang besar dalam pemanfaatan limbah selulosa sebagai bahan baku yang memiliki nilai biaya yang rendah jika dimanfaatkan melalui proses fermentasi menghasilkan produk yang bernilai tinggi. Penelitian ini difokuskan untuk mengisolasi bakteri selulolitik dari tandan kosong buah kelapa sawit dan menentukan potensi aktivitas enzim selulase bakteri tersebut dalam mendegradasi selulosa.

Sampel untuk isolasi bakteri selulolitik yang digunakan diambil dari tandan kosong kelapa berada di areal industri minyak kelapa sawit di PT. Tritunggal Sentra Buana Kecamatan Muara Badak Kab. Kutai Kertanegara, Kaltim.

Isolasi Bakteri Selulolitik

Media Carboxymethyl Cellulose (CMC) cair); 1 g KH_2PO_4 , 0.5 g NaCl, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan 10 g CMC didalam 1 liter air destilat dipersiapkan dan selanjutnya di sterilisasi pada 121 $^\circ\text{C}$ selama 15 menit. Setiap 1 g sampel ditambahkan 100 ml media CMC steril dan diinkubasi pada suhu ruang (30-32 $^\circ\text{C}$) dengan diaduk pada kondisi 150 rpm selama 10 hari. Setelah diinkubasi, bakteri yang didapatkan dipindahkan ke dalam cawan petri yang telah terdapat media CMC padat (1.5% agar) dengan teknik tuang. Bakteri yang berada dalam cawan petri kemudian diinkubasi selama 3 hari pada temperatur ruang (30-32 $^\circ\text{C}$). setelah diinkubasi, koloni bakteri selanjutnya ditransfer ke media CMC baru

dan diinkubasi selama 3 hari untuk mendapatkan koloni tunggal. Semua strain dari bakteri disimpan di freezer pada suhu -80°C dan akan digunakan pada pengujian selanjutnya.

Koloni Properti dari Bakteri Selulolitik

Koloni properti dari bakteri diamati berdasarkan dari koloni tunggal bakteri yang tumbuh di dalam media CMC. Kultur bakteri diinkubasi selama 3-5 hari pada temperatur ruang dan selanjutnya bentuk, warna, bentuk permukaan, struktur internal dan tepi dari koloni diamati dan dicatat.

Pengecatan Gram

Pengecatan Gram dilakukan dengan cara gelas obyek dan *cover glass* dibersihkan dengan alkohol 70% dan dikeringkan di atas nyala api. Satu tetes aquades steril ditetaskan di atas glas obyek. Dibuat apusan bakteri dengan mengambil satu oose bakteri dari biakan murni dan diletakkan pada aquades steril tersebut. Diratakan seluas 1 cm^2 kemudian difiksasi dengan dipanaskan di atas api. Apusan bakteri diwarnai dengan 1-2 tetes pewarna Gram A (Kristal violet) selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dikeringanginkan. Pewarnaan dilanjutkan dengan meneteskan larutan Gram B (iodin) selama 1 menit, dilanjutkan pencucian dengan larutan Gram C (etanol-aseton) sampai air yang terbasuh tidak berwarna dan dikeringanginkan. Selanjutnya ditetesi dengan larutan pewarna safrin (Gram D) selama 0.5 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat diamati di bawah mikroskop perbesaran 1000x. Dicatat bentuk dan warna sel bakteri (Cappucino and Shernan, 2005).

Deteksi aktivitas selulase ekstraselular di dalam CMC media agar

Untuk menentukan kemandirian dari degradasi selulosa oleh isolat bakteri selulolitik, kativitas selulase dari semua isolat bakteri yang didapatkan diuji didalam CMC agar (pH 7). Semua Kultur tunggal dari isolat bakteri selulolitik yang telah diinkubasi di dalam CMC medium pada suhu ruang selama 3 hari, kemudian dituangi dengan larutan Congo red (1%

w/v) selama 15 menit. Setelah 15 menit, larutan Congo red dibuang dan diganti dengan larutan 1 M NaCl yang didiamkan selama 15 menit (sampai terlihat adanya zona bening (clear zona)). Terbentuknya formasi clear zona mengindikasikan bakteri telah mendegradasi selulosa yang ada pada media CMC agar (Ariffin et al., 2008). Ratio ukuran koloni dan clear zone dari isolat-solat bakteri diukur. Isolat-solat dari bakteri yang menunjukkan tingginya ratio antara diameter clear zone and koloni bakteri dipilih untuk digunakan pada penelitian selanjutnya.

Penentuan Aktivitas Selulase dan Pertumbuhan Sel Bakteri di Dalam Liquid CMC Medium

isolat bakteri yang menghasilkan aktivitas selulase terbaik dipilih untuk ditumbuhkan pada liquid CMC media untuk menentukan kurva pertumbuhan, aktivitas selulase dan gula pereduksi-nya.

Persiapan Inokulum

Isolat bakteri yang terbaik dire-streak lagi di dalam CMC media agar untuk diinkubasi selama 3 hari. Koloni tunggal bakteri selanjutnya ditransfer ke daloam 100 mL CMC medium cair dan diinkubasi selama 3 hari di dalam inkubator shaker 100 rpm pada suhu ruang. Setelah diinkubasi, koloni bakteri yang ada di dala erlenmeyer siap digunakan sebagai inokulum.

Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri dari Isolat Bakteri Penghasil Selulase Terbaik.

Inokulum bakteri 1% (v/v) ditambahkan kedalam sebuah erlenmeyer 250 mL yang telah terdapat di dalamnya 100 mL CMC media. Sampel yang berada dalam erlenmeyer diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari yang dishaker 100 rpm. Konsentrasi dan jumlah sel awal dihitung dan diambil setiap hari untuk diuji menggunakan teknik tuang. Konsentrasi sel bakteri (CFU/mL) terhadap waktu diplot dalam sebuah kurva pertumbuhan.

Penentuan Aktivitas Selulase

Aktivitas selulase dari isolat bakteri terpilih diuji menggunakan metode Gorska, et al., (2001). Supernatan yang dikumpulkan dari

proses sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 4 menit. Sebanyak 0.5 mL supernatan dari kultur bakteri ditambahkan kedalam 0.5 mL dari 1% (w/v) Carboxymethyl cellulose (CMC) yang dilarutkan di dalam 0.05 M buffer fosfat (pH 7) dan kemudian dimasukkan di dalam tabung reaksi tube dan diinkubasi pada 50 °C selama 60 menit. Selanjutnya setelah 60 menit inkubasi, ditambahkan dengan 3.0 ml of dinitrosalicylic acid (DNS) reagent dan kemudian ditempatkan didalam waterbath untuk dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 min. setelah mendidih, tabung reaksi didinginkan didalam air dingin. Selanjutnya ditambahkan 10 mL akuades and reducing sugar (gula pereduksi) di dalam sampel diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm melawan kontrol 1% CMC in 0.05 M phosphate buffer). Jumlah total gula pereduksi (mg/ml) didalam reaksi diukur dengan membandingkan ke kurva standar

glukosa yang sesuai dengan metode Miller (1959).

Penentuan Gula Pereduksi

Sebagai tambahan, gula pereduksi di dalam larutan CMC selama inkubasi juga ditentukan menggunakan metode Miller (1959). Supernatan dikumpulkan dari proses sentrifugasi 10.000 rpm selama 4 menit. Sebanyak 0.5 mL dari supernatan (enzim) ditambah dengan 0.5 mL akuades. Selanjutnya ditambahkan lagi 3.0 ml dinitrosalicylic acid (DNS) reagent dan kemudian tabung reaksi dimasukkan kedalam air mendidih 100°C selama 5 menit. Setelah mendidih, ditambahkan 10 mL akuades dan gula pereduksi di dalam sampel diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm melawan kontrol 1% CMC in 0.05 M phosphate buffer). Jumlah total gula pereduksi (mg/ml) didalam reaksi diukur dengan membandingkan ke kurva standar glukosa yang sesuai dengan metode Miller (1959).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel untuk Isolasi Mikroorganisme Selulolitik

Sampel yang digunakan didalam penelitian ini untuk isolasi mikroba dikumpulkan dari pabrik minyak kelapa sawit PT. Tritunggal Sentra Buana yang terletak di Kecamatan Muara Badak

Kabupaten Kutai Kartanegara Provinsi Kalimantan Timur. Sampel untuk isolasi mikroba selulolitik ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Tipe dan Karakteristik Sampel yang Dikumpulkan dari Pabrik Minyak Kelapa Sawit PT. Tritunggal Sentra Buana

Sampel	Tipe Sampel	Karakteristik Sampel	Gambar
TKKS sebelum pengutulan minyak (1)	Serat TKKS	Berwarna coklat tua, keras, sukar untuk dipatah, masih berbentuk buah, masih mengandung banyak minyak lebih mudah ditumbuhi jamur	
TKKS setelah pengutulan minyak (2)	Serat TKKS	Berwarna coklat muda, lunak, mudah dipata, telah terurai menjadi serat, kandungan minyak tidak banyak, Jamur yang tumbuh tidak banyak	

Ada 2 (dua) sampel yang dikumpulkan dari pabrik minyak kelapa sawit PT. Tritunggal Sentra Buana, merupakan sampel yang diduga mengandung mikroba yang dapat mengdekomposisi bahan selulosa. Mikroorganisme yang diisolasi dari bahan selulosa memiliki manfaat untuk mendegradasi bahan lignoselulosa seperti tandan kosong kelapa sawit (TKKS). Sesuai yang dilaporkan oleh Smruti et al., (1995) bahwa mikroorganisme penghasil selulase dapat diisolasi dari bahan lignoselulosa seperti kayu lapuk, limbah pengolahan kayu dan daun kering yang berada di tanah. Secara umum bahan lignoselulosa mengandung nutrisi seperti karbon, oksigen, fosfat, nitrogen, garam-garam mineral dan bahan nutrisi lain yang dapat digunakan oleh mikroorganisme yang hidup di alam.

Isolasi Mikroorganisme

Supaya mampu memperoleh mikroorganisme selulolitik, CMC (bahan selulosa buatan) merupakan bahan yang mudah untuk dilarutkan di dalam air yang menggunakan medium diperkaya untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme selulolitik. Kedua sampel (TKKS) tersebut masing-masing dimasukkan ke dalam CMC broth dan selanjutnya diinkubasi selama 10 hari dengan diaduk pada kondisi 150 rpm menggunakan shaker inkubator pada suhu ruang. Dengan lama

inkubasi 10 hari, nutrisi yang ada di dalam erlenmeyer (flask) akan habis sehingga akan didapatkan mikroorganisme yang hanya mampu mendegradasi CMC. Targetnya adalah mendapatkan mikroorganisme (koloni tunggal) yang didalam media agar yang dilakukan dengan teknik gores. Tabel 2, merupakan hasil mikroorganisme selulolitik yang didapatkan dari dua sampel TKKS yang dikumpulkan dari pabrik minyak kelapa sawit PT. Tritunggal Sentra Buana di Kecamatan Muara Badak, Kabupaten Kutai Kartanegara Provinsi Kalimantan Timur.

Ada 9 (sembilan) jumlah isolat bakteri yang didapatkan berasal dari 2 (dua) sampel yang dikumpulkan dari pabrik minyak kelapa sawit PT. Tritunggal Sentra Buana berdasarkan formasi koloni dan morfologi sel yang dilihat dibawa mikroskop dimana mikroorganisme ini didapatkan dari proses *screening* yang dipisahkan dari jenis bakteri, actinomycetes dan jamur. Menurut Heck et al., (2002) dan Semedo et al., (2000) dilaporkan bahwa banyak bakteri selulolitik anaerob dan aerob dapat diisolasi dari dekomposisi tanah dan hasil samping dari bahan lignoselulosa (daun, batang, ranting dari tanaman) untuk aplikasi dibidang bioteknologi. Walaupun begitu, mikroorganisme yang diisolasi di dalam penelitian ini akan diaplikasikan dan dimanfaatkan didalam bidang bioteknologi.

Tabel 2. Sembilan (9) Isolat dari Bakteri Selulolitik yang Ditemukan dari Sampel Tandan Kosong Kelapa Sawit yang Dikumpulkan dari Pabrik Minyak Kelapa Sawit PT. Tritunggal Sentra Buana Dimana Tiap Sampel Diinkubasi Selama 10 hari pada Suhu 30°C dengan Laju Pengadukan 150 rpm.

Sampel	Jumlah isolat bakteri	Kode Isolat Bakteri
1	4	Bac 1.1, Bac 1.2, Bac 1.3, Bac 1.4
2	5	Bac 2.1, Bac 2.2., Bac 2.3, Bac 2.4, Bac 2.5

Koloni Properti Bakteri

Tabel 3, menunjukkan studi morfologi sel dan koloni dari bakteri yang diisolasi. Dibawah pengamatan mikroskop, bakteri secara jelas dapat dipisahkan dari jamur dan grup bakteri lain

(actinomycetes). Studi morfologi koloni dari bakteri dapat membantu di dalam mengklarifikasikan genus dari bakteri. Beragai faktor yang mempengaruhi bentuk dan warna dari koloni bakteri seperti tipe media kultur bakteri, pH, temperatur, dan

kondisi lingkungan (anaerobik, aerobik dan lain-lain) selama inkubasi. Di dalam penelitian ini, semua mikroorganisme dikulturkan di dalam media agar. Ada 9 isolat bakteri yang didapatkan dari sampel TKKS yang diambil dari pabrik minyak kelapa sawit PT. Tritunggal Sentra Buana. Morfologi sel dan koloni dari isolat bakteri yang didapatkan seperti bentuk, tepi koloni, warna koloni, koloni sel dan pengecatan gram dijelaskan untuk mendukung identifikasi awal dari isolat bakteri yang didapatkan.

Pengamatan menggunakan mikroskop, ada 2 (dua) tipe utama dari bentuk koloni bakteri seperti yang terlihat setelah dikulturkan di dalam CMC agar berbentuk bulat dan tidak beraturan. Warna

atau pigment dari koloni setiap isolat bakteri adalah berwarna putih (buram atau transparan) dan ada juga dalam koloninya berwarna putih-krem. Bentuk koloni bakteri yang didapatkan ada yang bulat dan bentuknya tidak beraturan. Sementara bentuk tepi koloni bakteri ada yang sedikit cembung dan bahkan cembung dengan tepi yang menyeluruh dan ada pula yang berombak pada tepinya juga diamati. Dengan menggunakan teknik pewarnaan Gram didapatkan sembilan isolat bakteri yang kesemua isolat bakteri adalah ber-Gram negatif yang ditunjukkan dengan warna merah jambu pada bakteri yang diberi pewarna Gram

Tabel 3. Bentuk Koloni Morfologi Bakteri dan Hasil Pewarnaan Gram

Isolat Bakteri	Pewarnaan Gram	Morfologi Sel	Morfologi Koloni	Gambar
Bac 1.1	Negatif	bulat	Putih krem, tidak beraturan, buram dengan sedikit cembung dan tepi yang berombak.	
Bac 1.2	Negatif	bulat	Putih krem, tidak beraturan, buram dengan sedikit cembung dan tepi yang berombak..	
Bac 1.3	Negatif	bulat	Putih krem, bulat, buram dengan sedikit cembung dan tepi yang berombak.	
Bac 1.4	Negatif	bulat	Putih, bulat, buram dengan bentuk cembung dan tepi yang berombak	
Bac 2.1	Negatif	batang	Putih krem, tidak beraturan, buram dengan sedikit cembung dan tepi menyeluruh.	
Bac 2.2	Negatif	Batang	Putih, tidak beraturan, buram dengan sedikit cembung dan tepi menyeluruh.	
Bac 2.3	Negatif	bulat	Putih, bulat, buram dengan sedikit cembung dan tepi berombak.	
Bac 2.4	Negatif	lengkung	Putih krem, tidak beraturan, buram dengan sedikit cembung dan tepi berombak.	
Bac 2.5	Negatif	bulat	Putih krem, tidak beraturan, buram, dengan sedikit cembung dan tepinya berombak.	

Penentuan Aktivitas Selulase pada CMC Agar

Semua mikroorganisme yang didapatkan dari proses skrining dapat tumbuh pada CMC agar. Bahkan, mikroorganisme yang dapat tumbuh di media CMC agar tersebut belum tentu memiliki aktivitas selulase. Pada penelitian ini dicoba didapatkan mikroorganisme yang dapat tumbuh dan memproduksi selulase ekstraseluler pada media CMC agar. Tetapi hal itu sulit diamati adanya zona bening yang mengelilingi koloni. Menurut Yoon et al., (2007). Pewarna dari Congo red memiliki karakter yang spesial dimana mampu memberikan warna pada polisakarida. Oleh karena itu pewarna Congo red selalu digunakan untuk mendeteksi enzim ekstraseluler didalam medium yang mengandung polisakarida (CMC adalah sebuah polisakarida). Setelah pewarnaan Congo red, sebuah

zone bening dari aktivitas enzim pada media CMC agar dapat diamati dengan terlebih dahulu melakukan pencucian pewarna Congo red menggunakan larutan NaCl 1 M. Untuk penentuan aktivitas selulase ekstraseluler pada media CMC agar, keseluruhan bakteri dikulturkan di dalam media CMC agar selama 3 hari dalam inkubator pada suhu 35°C.

Ada sembilan isolat bakteri yang didapatkan melalui proses *screening*, dan hanya ada 2 isolat bakteri yang diamati dan memproduksi selulase ekstraseluler yang ditunjukkan dengan adanya sebuah lingkarang zona bening yang mengelilingi koloni (isolat Bac. 1.2. dan isolat Bac.2.3). Pada Tabel 4, menunjukkan rasio antara diameter lingkaran *zona bening dengan diameter koloni bakteri*. 1 (satu) dari 2 (dua) isolat bakteri yang menunjukkan rasio tertinggi akan dipilih untuk pengujian akativitas selulase.



(A) Bac. 1.2



(B) Bac. 2.3

Gambar 1. Aktivitas Selulase yang Mendemonstrasikan Sebuah Zona Bening yang Mengelilingi Koloni dari Isolat Bakteri (A) Bac. 1.2, (B) Bac. 2.3

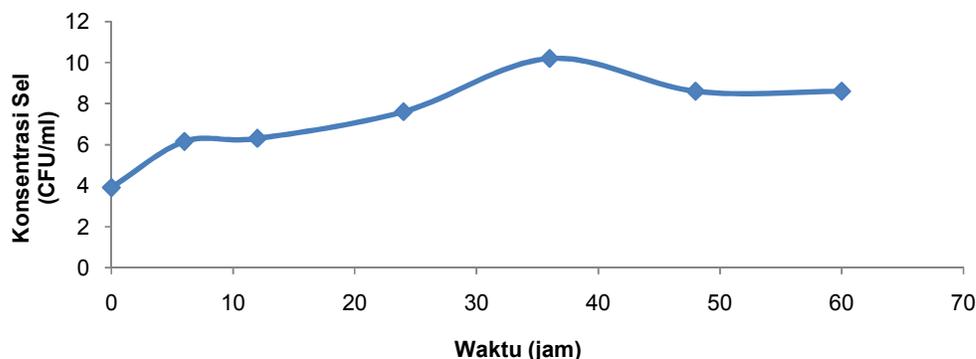
Table 4. Ratio antara Diameter Lingkaran Zona Bening dengan Diameter dari Koloni Bakteri

Kode Isolat codes	Diameter koloni (mm) (A)	Diameter zona bening (mm) (B)	Rasio aktivitas selulase (B/A)
Bac.1.2	5	1	5
Bac. 2.3	16	2	6

Penentuan aktivitas selulase dan pertumbuhan sel bakteri

Setelah isolat bakteri yaitu Bac 2.3 diambil sebagai isolat terbaik dalam rasio diameter zona bening selanjutnya

ditumbuhkan dalam media CMC untuk mengetahui bentuk kurva pertumbuhan mikroba tersebut. Adapun kurva pertumbuhan isolat bakteri Bac 2.3 dapat dilihat pada Gambar 2.

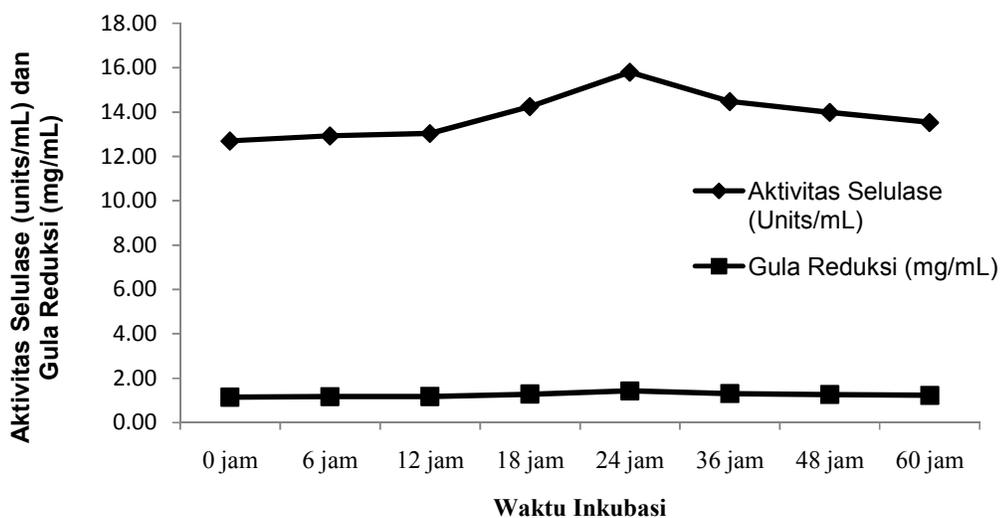


Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri Isolat Bac.2.3 Terhadap Waktu Selama Inokulasi

Berdasarkan pada gambar 2., terlihat bahwa isolat bakteri Bac 2.3 pada inkubasi 36 jam menghasilkan konsentrasi sel bakteri yang tertinggi dengan nilai 10.2 CFU/mL. Dimana isolat bakteri mendapatkan makanan yang berlimpah terutama sumber karbon yang berasal dari CMC dan kondisi yang optimum pula.

Berdasarkan aktivitas selulase dan gula reduksi yang dihasilkan dari inokulasi isolat bakteri Bac 2.3 di dalam media CMC cair selama 60 jam inokulasi dapat dilihat

pada gambar 3. Terlihat bahwa aktivitas selulase semakin meningkat dengan nilai aktivitas selulase tertinggi pada waktu inokulasi 36 jam sebesar 15,79 units/mL sementara untuk gula reduksi terjadi peningkatan laju kenaikan gula reduksi pada waktu inokulasi 36 jam sebesar 1,42 mg/mL. Meningkatnya aktivitas selulase menyebabkan gula reduksi turut pula juga meningkat. Ini dikarenakan aktivitas selulase selalu berbanding lurus dengan gula reduksi.



Gambar 3. Aktiuvitas Selulase dan Gula Reduksi Isolat Bakteri 2.3

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Kesimpulan dalam penelitian ini adalah Ada 9 (sembilan) isolat bakteri yang diisolasi dan telah diidentifikasi dengan metode pengecatan Gram dan koloni morfologi sel bakteri. Dua (2) isolat bakteri menunjukkan aktivitas selulase yang ditandai terdapatnya zona bening dipermukaan CMC agar menggunakan larutan congo red (1% (v/v)) dan penghilangan warna dengan sodium hidroksida (NaOH). 1M. Selanjutnya 1

(satu) isolat bakteri yang terbaik dipilih yaitu isolat bakteri Bac. 2.3 untuk dilanjutkan dalam penentuan aktivitas selulase dan gula reduksi. Hasil penelitian didapatkan bahwa isolat bakteri Bac. 2.3 menghasilkan aktivitas selulase dan gula reduksi sebesar 15.79 units/mL dan 1.42 mg/mL pada inkubasi waktu selama 36 jam.

B. SARAN

Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk mendapatkan kondisi optimum dari bakteri isolat Bac. 2.3.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariffin, H., N. Abdullah, M.S. Umikalsom, Y. Shirai and M.A. Hassan, (2008). Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus* EB3. J. Biosci. Bioeng. 106: 231-236. DOI: 10.1263/jbb.106.231
- Belaich, A. G. Parsiegla, L. Gal, C. Villard and R. Haser, (2002). Cel9M, A new family 9 cellulase of the *Clostridium cellulilycum* J. Bacteriol., 184: 1378-1384.
- Cappucino, J.G. And N. Shernan. (2005). Microbiology: A Laboratory Manual. Pearson Benjamin Cumming, San Fransisco.
- Emert, G., Gum E, Lang J, Liu T, Brown R., (1974). Cellulases, in Food Related Enzymes, (Whitaker, J., ed.) Advances in Chemistry Series 136, Amen Chem. Soc. Washington, DC.
- Gorska, E. Barbara, T. Stefan, R., (2001). Degradation of Cellulose by Nitrogen-fixing Strain of *Bacillus polymyxa*. Acta Microbiologica Polonica. 50(2) 129-137.
- Heck, J.X., Hertz, P.F. and Ayub, M.A.Z., (2002), Cellulase and Xylanase Production by Isolated Amazon *Bacillus* Strains Using Soya Bean Industrial Residue Based Solid-State Cultivation, Brazilian Journal of Microbiology, 33 (3) 213-218.
- Jarvis, M., (2003). Cellulose stacks up. Sci., 426: 611-622.
- Keller, N.P., G. Tunner and J.W. Bennett, (2005). Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. Nat. Rev. Microbiol., 3: 937-947.
- Lopez-Contratres, A.M., K. Gabor, A.A. Martens, B.A.M. Renkens, P.A.M. Claassen, J.V. Der Oots and W.M. de Vos, (2004). Substrate-induced production and secretion of cellulases of the *Clostridium acetobutylicum*. Appl Environ Microbiol., 70: 5238-5243.
- Lynd, L.R. W.H. Van Zyl, J.E. McBride and M. Laser, (2005). Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass. An Update, Curr Opin Biotechnol, 16: 577-583.
- Miller, G.I., (1959), "Use of Dinitro Salicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Analytical Chemistry, 31 (3) 426-428.

- Ryu D, Mandels M. (1980). Cellulases: Biosynthesis and Application. *Enzymes Microb. Tech.* 2:91.
- Semedo, L.T., Gomes, R.C., Bon, E.P., Soares, R.M., Linhares, L.F. and Coelho, R.R., (2000), "Endocellulase and Exocellulase Activities of Two *Streptomyces* Strains Isolated from a Forest Soil", *Applied of Biochemistry and Biotechnology*, 84-86(1-9) 267-276.
- Schwarz, W.H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 643-649.
- Smruti, P., Rao, K.K. and Krishna, M., (1995), "Production of Betaglucosidase by *Aspergillus terreus*", *Current Microbiology*, 3(5) 255-258.
- Yoon, J.H., Kang, S.J and Oh, T-K, (2007), "*Chryseobacterium daeguense* sp. Nov., Isolated from Waste Water of a Textile Dye Works", *International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology*, 57(6) 1355-1359.