

Pemanfaatan Substrat Limbah Pertanian Menggunakan Enzim Selulase

Roida Ervina Sinaga

Email korespondensi : roidasinaga20@gmail.com

ABSTRACT

Three types of cellulases are endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases act synergistically to convert cellulose to glucose. This study was aimed to characterized cellulase enzyme which produced by cellulolytic bacteria from soil and applied it on agricultural waste such as rice straw, corn cob and banana peel. From 9 isolates, 1 isolate have IS 1.75. Quantitative analysis showed isolate 6-2 has the highest cellulase activity of 0.005U/ml. Highest activity of cellulase enzyme from isolate 6-2 resulted on bufer pH 7 and 40°C. Cellulase activity of isolate 6-2 was stable for 75 minutes. Isolate 6-2 has relatively low cellulase activities in CMC as it has small enzyme activity in degrading substrates of agriculture waste. The cellulose enzyme activity on ricestraw resulted 0.007U/ml, corncob resulted 0.008U/ml, and bananapeel resulted 0.013U/ml. Isolate 6-2, gram positive bacteria can degrade cellulose by using cellulase enzyme. On the application cellulase enzyme activity on bananapeel was higher than the others.

Keywords: *cellulolytic bacteria, cellulase, agricultural wast*

Pendahuluan

Di dalam tanah banyak terdapat mikroorganisme seperti bakteri, fungi, alga, dan Protozoa. Beberapa dekomposer seperti bakteri dan fungi mampu menghasilkan enzim selulase. Bakteri yang bisa menghasilkan selulase ialah *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Cellovibrio*, dan *Sporosphytophaga*, sedangkan fungi yang bisa menghasilkan selulase antara lain *Tricoderma*, *Aspergillus*, dan *Penicillium*. Selain itu, tingkat variasi genetik kelompok

bakteri sangat beragam sehingga memungkinkan dilakukan rekayasa genetik untuk optimasi produksi maupun aktivitas selulasenya (Alam *et al.* 2004). Enzim selulase adalah salah satu enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang berfungsi untuk mendegradasi selulosa menjadi glukosa yang larut dan dapat digunakan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhannya.

Limbah padat merupakan sisa-sisa bahan yang mengalami perlakuan-perlakuan, baik karena telah diambil bagian utamanya, atau karena pengolahan dan dari segi

lingkungan dapat menyebabkan pencemaran dan gangguan kelestarian (Alam *et al.* 2004). Selama ini limbah pertanian seperti jerami gandum maupun padi, tongkol jagung, kulit kacang, dan kulit pisang belum dimanfaatkan secara optimal, padahal limbah-limbah tersebut merupakan sumber energi yang potensial. Jerami padi dan tongkol jagung merupakan

limbah pertanian yang penanganannya masih dengan cara dibakar, sedangkan kulit pisang biasanya hanya dibiarkan saja hingga membusuk. Kandungan selulosanya yang tinggi dapat dikonversi menjadi gula-gula sederhana (gula pereduksi) dan selanjutnya difermentasi menjadi etanol oleh khamir atau bakteri. Dengan ditemukannya teknologi yang tepat, maka penanganan limbah pertanian seperti jerami padi, tongkol jagung dan kulit pisang yang mengandung serat terutama selulosa dapat diatasi dengan melibatkan bakteri selulolitik. Melihat banyaknya kandungan selulosa yang terdapat pada limbah pertanian maka pemanfaatan selulase dalam penanganan masalah limbah pertanian perlu dikembangkan.

Analisis Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan pada sembilan isolat untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas enzim selulase dari setiap isolat bakteri tersebut. Dari sembilan isolat yang diseleksi, delapan isolat memperlihatkan adanya zona bening (Tabel 1). Zona bening yang terbentuk disekitar

koloni menandakan bahwa bakteri tersebut telah mendegradasi selulosa yang terdapat dalam media CMC 1%.

Tabel 1 Indeks potensial bakteri selulolitik (IS) dengan inkubasi pada suhu ruang selama 48 jam

No	Nama Isolat	Diameter Bakteri (cm)	Diameter Zona Bening (cm)	IS
1	2-3	0.55	0.9	0.63
2	6-2	0.4	1.1	1.75
3	1	0.45	0.7	0.55
4	2	0.55	0.75	0.36
5	3	0.55	0.65	0.8
6	4	0.5	-	-
7	5	0.55	0.65	0.18
8	6	0.75	0.85	0.13
9	7	0.45	0.55	0.22

Penelitian Sari *et al.* (2012) menunjukkan bahwa dari duapuluh delapan isolat, sembilan isolat menghasilkan indeks selulolitik lebih besar atau sama dengan dua, tetapi isolat-isolat tersebut merupakan bakteri termofilik yang berasal dari sumber air panas. Dibandingkan dengan isolat bakteri selulolitik yang berasal dari feses luwak yang menghasilkan indeks selulolitik sebesar 1.091 (Dewi 2012), maka isolat 6-2 ini termasuk isolat yang potensial karena menurut Ochoa-Solano dan Olmos-soto (2006) bahwa isolat yang menghasilkan diameter zona bening dua kali diameter koloni merupakan produser enzim yang potensial. Selanjutnya untuk memperbanyak jumlah bakteri maka koloni bakteri yang menghasilkan zona bening

tersebut ditumbuhkan ke dalam media CMC cair.

Kurva Turbiditas dan Aktivitas Enzim Selulase

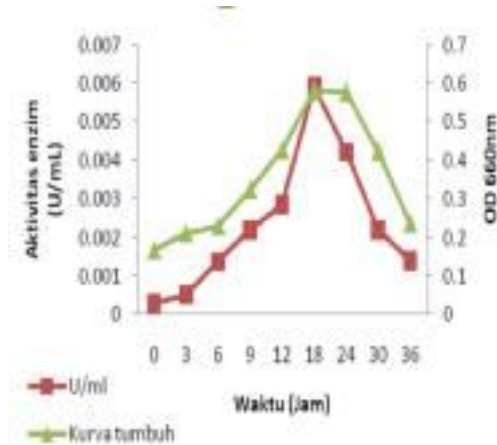
Pertumbuhan seimbang ditandai dengan bertambahnya populasi secara teratur (Pelzcar & Chan 1988). Proses tumbuh bakteri menunjukkan penambahan sel yang meningkat. Proses penambahan sel meningkat mulai jam ke-6 sampai jam ke-24. Turbiditas sel menurun pada jam ke-30 hingga jam ke-36.

Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan.

Aktivitas enzim selulase dari jam ke-0 terus mengalami peningkatan tiap 6 jam hingga aktivitas enzim tertinggi didapat pada jam ke-18 sebesar 0,005U/mL (Gambar 3). Setelah jam ke-18 aktivitas enzim kembali menurun hingga jam ke-36.

B. coagulans dan *B. amyloliquefaciens* yang juga tergolong bakteri Gram positif menghasilkan aktivitas enzim lebih tinggi dibandingkan dengan isolat 6-2 yaitu sebesar 0.812 U/mL dan 1.2 U/mL (Wizna *et al.* 2007). Isolat C5-1 yang berasal dari lahan pertanian juga menghasilkan aktivitas enzim lebih rendah dibandingkan isolat 6-2 yaitu sebesar 0.004 U/mL (Nur *et al.* 2009). Rendahnya aktivitas selulase kemungkinan dipengaruhi oleh faktor telah terbentuknya produk berupa glukosa atau oligosakarida dimana produk ini akan menghambat kerja selulase dalam

menghidrolisis substrat selulosa.



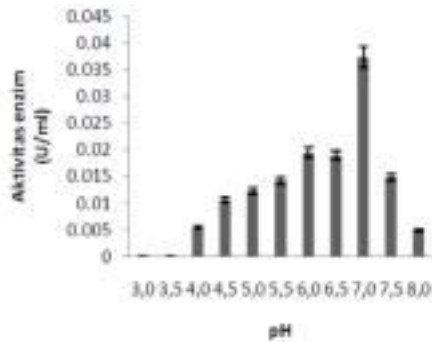
Gambar 3 Kurva turbiditas dan aktivitas enzim dari isolat 6-2 yang diinokulasi pada media CMC 1% pH 7 pada suhu ruang.

Dilihat dari kurva turbiditas dan aktivitas, enzim selulase mulai diproduksi pada jam ke-6. Dengan membandingkan antara grafik aktivitas enzimatis dengan kurva turbiditas, ditentukan waktu optimal untuk inkubasi isolat yang akan digunakan pada saat produksi enzim selulase adalah pada jam ke-18 (Gambar 3).

Pengaruh pH terhadap Aktivitas Selulase

Hubungan antara pH dengan aktivitas enzim selulase dapat dilihat bahwa aktivitas enzim tertinggi terjadi pada pH 7. Aktivitas enzim selulase pada pH 4-6.5 tidak terlalu tinggi, pada pH 7.5-8 terjadi penurunan aktivitas enzim. Aktivitas enzim tertinggi pada pH 7 sebesar 0,037 U/mL kemudian pada pH 7.5 menurun menjadi 0.015 U/mL dan

pada pH 8 sebesar 0.005 U/mL. Pada pH 4, 4.5, 5, dan 5.5 aktivitas enzim berturut-turut sebesar 0.005 U/mL, 0.011 U/mL, 0.012 U/mL, 0.014 U/mL, dan 0.019 U/mL (Gambar 4).



Gambar 4 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan isolat 6-2 dan diinkubasi pada media CMC 1% suhu ruang.

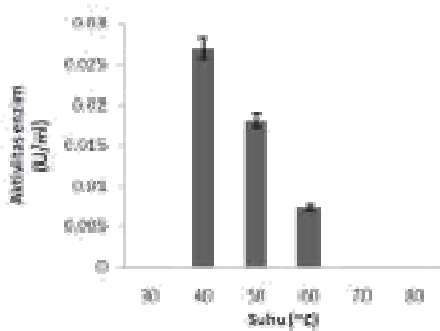
Nilai pH optimum ini termasuk pH netral. pH optimum dapat menghasilkan aktivitas yang maksimal dalam mengkatalisis suatu reaksi. Hasil penelitian yang lain menyatakan bahwa salah satu enzim selulase yaitu enzim endo-1,4- β -glukanase mempunyai aktivitas tertinggi pada pH 7. Enzim tersebut secara aktif mendegradasi CMC pada kisaran pH netral sampai dengan asam (pH 7 sampai dengan pH 4) (Hidayat 2005). Hasil yang sama diperoleh Bakare *et al.* (2005), pH optimum enzim selulase yang berasal dari *Pseudomonas fluorescence* adalah 6.5-7. *Bacillus* sp CH43 menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi pada pH 5-7 (Mawadza *et al.* 2000). *Bacillus substilis* yang diisolasi dari kotoran sapi juga menghasilkan aktivitas selulase yang tinggi pada pH 7

(Saraswati *et al.* 2012). Hasil ini menunjukkan bahwa nilai pH yang mendekati netral lebih menguntungkan bagi aktivitas enzim di dalam isolat 6-2 ini. Catriona *et al.* (1994) melaporkan bahwa kisaran pH yang baik bagi enzim selulase adalah pH 5.0-7.0.

Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim

Hasil pengujian aktivitas enzim menunjukkan suhu optimum bagi enzim selulase isolat 6-2 yaitu 40°C yang menghasilkan aktivitas sebesar 0.027 U/mL (Gambar 5). Aktivitas enzim pada suhu di atas 40°C mengalami penurunan. Hal ini diduga karena enzim mulai terdenaturasi panas. Ketika suhu lebih tinggi dari suhu optimum, protein akan mulai terdenaturasi sehingga terjadi perubahan konformasi protein pada akhirnya gugus reaktif akan terhambat.

Pada suhu 30°C, tidak ada aktivitas enzim (inaktivasi). Hal ini kemungkinan disebabkan rendahnya energi aktivasi yang tersedia. Energi aktivasi dibutuhkan untuk menciptakan kondisi tingkat kompleks aktif baik enzim maupun substrat. Peningkatan energi molekul substrat akan meningkatkan laju reaksi enzim.



Gambar 5 Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan isolat 6-2 pada media CMC 1%.

Aktivitas enzim pada suhu 70-80°C menunjukkan bahwa enzim secara sempurna kehilangan aktivitas katalitiknya akibatnya

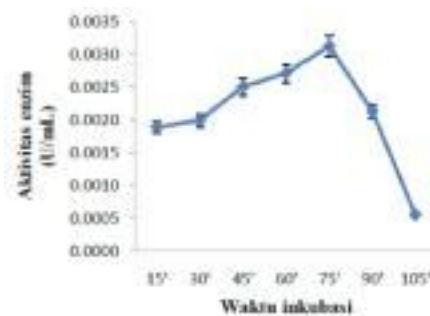
terjadi denaturasi yang menyebabkan pecahnya ikatan disulfida menjadi beberapa residu sistein sehingga enzim tidak mampu menghidrolisis substrat CMC. Akibatnya, tidak ada produk gula pereduksi yang terbentuk. Suhu yang terlalu tinggi menyebabkan interaksi lemah dalam protein (terutama ikatan hidrogen) menjadi rusak sehingga protein menjadi

terlipat (*unfolding*) lalu konformasinya menjadi tidak beraturan dan akhirnya kehilangan struktur tiga dimensinya (Nelson & Cox 2005). Hasil studi lain yang mengidentifikasi bakteri yang memiliki selulase dengan suhu optimum yang sama adalah *Salmonella typhimurium* UR (Yoo *et al.* 2004); *Streptomyces* sp. Galur J2 (Jaradat *et al.* 2008); *Bacillus* sp C14 (Aygan & Arikian 2008). Wizna *et al.* (2007) melaporkan enzim selulase yang berasal dari isolat bakteri Gram

positif menghasilkan aktivitas optimum pada suhu 40°C, sedangkan isolat bakteri Gram negatif menghasilkan aktivitas enzim optimum pada suhu 78°C (Sari *et al.* 2012). Mawadza *et al.* (2000) melaporkan aktivitas selulase yang juga dihasilkan *Bacillus* sp yang berasal dari sumber air panas optimum pada suhu 70°C. Enzim ini tergolong enzim termostabil

Stabilitas Enzim

Aktivitas enzim yang diinkubasi pada pH 7 dan suhu 40°C meningkat sampai menit ke-75 dan mulai menurun pada menit ke-90 (Gambar 6). Hal ini membuktikan adanya reaksi antara enzim selulase dan substrat CMC hingga menit ke-75, interaksi enzim-substrat menghasilkan produk. Aktivitas selulase setelah menit ke-90 dalam menghasilkan produk mulai menurun.



Gambar 6 Stabilitas enzim pada substrat CMC 1% dengan inkubasi suhu 40°C dan pH 7.

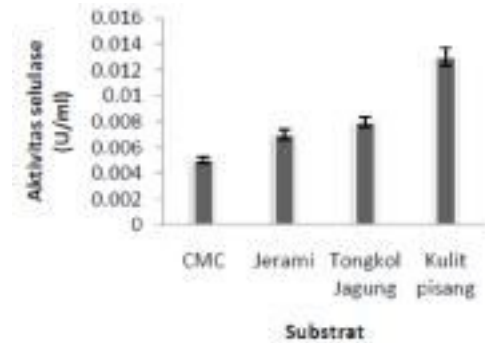
Hasil penelitian lain, isolat bakteri *Bacillus* sp yang juga berasal dari lahan pertanian, enzim selulase

stabil pada pH 6 dan suhu 50°C selama 30 menit (Vijayaraghavan & Vincent 2012). Penelitian yang sama *Bacillus substilis* menghasilkan enzim selulase yang stabil pada pH 7 dan suhu 60°C selama 30 menit (Yin *et al.* 2010). Enzim selulase yang dihasilkan dari isolat bakteri yang berasal dari kotoran sapi stabil pada pH 7 dan suhu 70°C selama 20 menit. Isolat ini tergolong bakteri termofilik (Shanmugapriya *et al.* 2012). Hasil penelitian Bakare *et al.* (2005), enzim selulase yang dihasilkan *Pseudomonas fluorescens* stabil pada pH 7 dan suhu 35°C selama 60 menit.

Aplikasi pada Substrat Limbah Pertanian

Uji substrat yang dilakukan menggunakan substrat CMC, jerami padi, tongkol jagung, dan kulit pisang menunjukkan adanya aktivitas selulase berturut-turut sebesar 0.006 U/mL, 0.007 U/mL, 0.008 U/mL, dan 0.013 U/mL. Kemampuan mikroorganisme untuk memproduksi enzim pada suatu substrat bergantung jenis enzim dan substratnya. Isolat 6-2 yang menggunakan substrat CMC menghasilkan aktivitas relatif kecil dibandingkan jerami padi, tongkol jagung dan kulit pisang. Hal ini mungkin disebabkan sangat kecilnya aktivitas enzim endo-1,4-β-glukanase pada isolat 6-2. Substrat CMC merupakan substrat selulosa murni yang berbentuk *amorphous* sehingga aktivitas enzim selulase pada substrat CMC merupakan aktivitas enzim endo-1,4-β-

glukanase (Lynd *et al.* 2002).



Gambar 7 Aktivitas enzim selulase isolat 6-2 pada substrat CMC 1% dan limbah pertanian pada pH 7 suhu 40°C.

Sekalipun memiliki aktivitas selulase yang relatif kecil terhadap substrat jerami padi dan tongkol jagung, isolat 6-2 memiliki aktivitas yang tinggi pada substrat kulit pisang yaitu sebesar 0.013 U/mL. Hal ini mungkin disebabkan oleh kandungan karbohidrat yang terdapat pada kulit pisang lebih tinggi dibandingkan jerami padi dan tongkol jagung. Karbohidrat berupa selulosa berpotensi menginduksi pembentukan enzim selulase. Kandungan selulosa pada jerami padi 32% (Mishra *et al.* 2001), tongkol jagung 40% (Yulistiani *et al.* 2012), dan kulit pisang 66.20% (Susanti 2006). Lama pemanasan menggunakan oven hanya membutuhkan waktu 3 hari, karena luasnya permukaan tempat pengeringan mempercepat penguapan pada medium. Limbah yang telah kering, mempunyai struktur yang keras dan menggumpal, sehingga harus digiling, agar menjadi limbah yang

berukuran kecil dengan luas permukaan lebih besar sehingga mudah diakses oleh enzim.

Simpulan Dan Saran

Isolat 6-2 yang tergolong bakteri Gram positif memiliki potensi dalam degradasi selulosa dengan cara mensintesis enzim selulase. Enzim selulase yang dihasilkan isolat 6-2 bersifat netral dan optimum pada suhu 40°C. Dalam aplikasi pada substrat limbah pertanian seperti jerami padi, tongkol jagung dan kulit pisang. Aktivitas tertinggi enzim selulase isolat 6-2 ialah pada substrat limbah kulit pisang.

Daftar Pustaka

- Alam MZ, Manchur MA, Anwar MN. 2004. Isolation, purification, characterization of cellulolytic enzymes produced by the isolate *Streptomyces omiyaensis*. *Pakist J Biol Sci.* 7(10):1647-1653.
- Aygan A, Arikan B. 2008. A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from van Soda lake. *Int J Agri Mol.* 10(1):369-374.
- Bakare MK, Adewale IO, Ajayi A, Shonukan OO. 2005. Purification and characterization of cellulose from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *African J Biotechnol.* 4(9):898-904.
- Catriona AW, Sheila IM, Thomas MW. 1994. Characterization of a β -D-glucosidase from the anaerobic rumen fungus *neocallimastix frontalis* with particular reference to attack on cello-oligosaccharides. *J Biotechnol.* 37(2):217-227.
- Dewi SL. 2012. Isolasi bakteri xilanolitik dan selulolitik dari feses luwak. [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Dwidjoseputro D. 2005. Dasar- dasar Mikrobiologi. Jakarta (ID): Djambatan.
- Dybkaer R. 2001. Unit katal for catalytic activity. *Pure Appl Chem* 73: 927-931.
- Hadioetomo RS. 1985. Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium Mikrobiologi. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Utama.
- Hames D, Hooper N. 2005. Biochemistry. Ed ke-3. New York (US): Taylor & Francis Group.
- Heruwatno KD, Natawihardja T, Widiastuti, Aisyah C. 1993. Pengaruh berbagai Tingkat Penggunaan Tepung Kulit Pisang Raja dalam Ransum terhadap Performans Ayam Pedaging. Bandung (ID): Padjadjaran Univ Pr.
- Hidayat I. 2005. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Endo-1,4- β -Glukanase *Bacillus* sp. AR 009 [The effect of pH on endo-1,4- β -glucanase activity from *Bacillus* sp. AR 009]. *J Biodiver.* 6(1):242-244.

- Hong J, Tamaki H, Akiba S, Yamamoto K, Kumagai H. 2001. Cloning of a gene Encoding a Highly Stable Endo- β -1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its Expression in Yeast. *J Biosci Bioengin.* 92:434-441.
- Immanuel G, Bhagavath CMA, Raj PI, Esakkiraj P, Palavesam A. 2007. Production and partial production of Cell in Coir Waste and Sawdust. *Int of J Microbiol.* 3 (1).
- Iqbal A. 2008. Potensi kompos dan pupuk kandang untuk produksi padi organik di tanah inseptiol. *J Akta Agrosia.* 11(1): 13-18.
- Jaradat Z, Dawagreh A, Ababneh Q, Saadoun I. 2008. Influence of culture conditions on cellulose production by *Streptomyces* sp. (strain J2). *Jor J Biol Sci.* 1(3):141-146.
- Kim H. 1995. Characterization and substrate specivity of an endo- β -1,4-D-glucanase I (avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Appl Environ Microbiol.* 61:959-965.
- Lynd LR, Weimer PJ, Zyl WH, Pretorius IS. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals Biotechnology. *Microbiol Mol Biol.* 66(3):506-520.
- Mawadza C, Hatti-kaul R, Zvauya R, Mattiason B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strain. *J Biotechnol.* 83(3):177-187.
- Milala MA, Shugaba A, Gidado A, Ene AC, Wafar JA. 2005. Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme production by *Aspergillus niger*. *J Agric Biol Sci.* 1(3): 325-328.
- Miller GL. 1959. Use of Dinitrosalysilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31(3): 426-428.
- Mishra B, Sharma PK, Bronson KF. 2001. Decomposition of ricestraw and mineralization of carbon, nitrogen, phosphorus and potassium in wheat field in western uttar pradesh. *J. Indian Soc Soil Sci.* 49(3):419-424.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry.* Ed ke-26. San Fransisco (US): McGraw-Hill.
- Nandi N, Rahman FH, Sinha NB, Hajra JN. 2000. Compatibility of lignin-degrading and celullulose-decomposing fungi during decomposition of rice straw. *J Indian Soc Soil Sci.* 48(2):387-389.
- Nelson DL, Cox MM. 2005. *Principles of Biochemistry.* Ed ke-4. New York (US): Worth Publisher.
- Nur HS, Meryandini A, Hamim. 2009. Pemanfaatan bakteri selulolitik yang potensial untuk dekomposisi jerami padi. *J Tanah Trop* 14(1):71-80

- Ochoa-Solano JL, Olmos-Soto J. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiol.* 23(6):519-525.
- Parakkasi A. 1990. Ilmu Gizi dan Makanan Ternak Manogastrik. Bandung (ID): Angkasa.
- Pelzcar MJ, Chan ECS. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi 2. Jakarta (ID): Indonesia Univ Pr.
- Saraswati B, Kumar MR, Kumar DJM, Balashanmugam P, Kumaran MDB, Kalaichelvan PT. 2012. Cellulase Production by *Bacillus subtilis* Isolated from Cow Dung. *Arch Appl Sci Res* 4(1):269-279.
- Sari UM, Agustien A, Nurmiati. 2012. Penapisan dan karakterisasi bakteri selulolitik sumber air panas sungai Medang, Kerinci, Jambi. *J Biol. UA* 1(2):166-171.
- Shanmugapriya K, Saravana PS, Krishnapriya, Manoharan M, Mythili A, Joseph S. 2012. Isolation, screening and partial purification of cellulase from cellulase producing bacteria. *J Adv Biotechnol Res.* 3(1):509-514.
- Sunatmo TI. 2007. Eksperimen Mikrobiologi dalam Laboratorium. Bogor (ID): Ardy Agency.
- Susanti L. 2006. Perbedaan Penggunaan Jenis Kulit Pisang terhadap Kualitas Nata. [Skripsi]. Semarang (ID): Universitas Negeri Semarang.
- Vijayaraghavan P, Vincent P. 2012. Purification and characterization of carboxymethyl cellulose from *Bacillus* sp. isolated from paddy field. *Polish J of Microbiol.* 61(1):51-55.
- Wizna, Hafilabbas, Rizal Y, Dharma the litter of mountain and swampy forest. *J Microbiol Indones.* 1(3):135-139.
- Yin L, Lin H, Xiao Z. 2010. Purification and characterization of a cellulose from *Bacillus subtilis* YJ1. *J Marine Science Technol.* 18(3):466-471.
- A, KOMPIANG IP. 2007. Selection and identification of cellulase-producing bacteria isolated from
- Yoo JS, Seo JK, Cho DH, Jang KW, Heo JY, Chung SC, Lee B. 2004. Molecular cloning and characterization of CMCase gene (celC) from *Salmonella typhimurium* UR. *J Microbiol.* 42(3):205-210.
- Yulistiani D, Puastuti W, Wina E, Supriati. 2012. Pengaruh Berbagai Pengolahan terhadap Nilai Nutrisi Tongkol Jagung : Komposisi Kimia dan Kecernaan In Vitro. Bogor (ID): Balai Penelitian Ternak.
- Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotech Adv.* 24(5):452-48