



AGROINDUSTRIAL TECHNOLOGY JOURNAL

Available online at : ejournal.unida.gontor.ac.id

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PARSIAL ENZIM SELULASE BAKTERI SELULOLITIK HASIL ISOLASI DARI LIMBAH PADAT TAPIOKA (ONGGOK)

*Isolation And Partial Characterization Of Cellulase Enzyme From Cellulolytic Bacteria
Isolated From Tapioca Solid Waste (Onggok)*

Rhytia Ayu C. Putri^{*)}, Agustin Krisna Wardani¹

¹ Dosen Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya

^{*)} email: rhytiaayu@gmail.com

ARTICLE INFO :

Received in 21 February 2018, Revised in 17 March 2018, Accepted. 13 April 2018

Abstrak

Proses hidrolisis bahan berselulosa tinggi memerlukan perlakuan pendahuluan untuk memisahkan lignin dan hemiselulosa dari selulosa, tetapi proses ini kurang efisien dan tidak ramah lingkungan. Enzim selulase adalah alternatif untuk menghidrolisa selulosa karena sifat kerja enzim yang spesifik dan tidak menghasilkan limbah yang berbahaya serta diharapkan mampu membantu memudahkan proses perlakuan pendahuluan. Bakteri selulolitik penghasil enzim selulase dapat diisolasi dari limbah pertanian yang banyak mengandung selulosa seperti limbah padat tapioka (onggok). Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2 isolat yaitu TO4 dan TO5 merupakan isolat yang potensial menghasilkan selulase. Enzim selulase dari isolat TO4 dan TO5 memiliki aktivitas optimum pada pH 5 dan suhu 50°C dengan aktivitas enzim selulase sebesar 0,597 U/mg untuk TO4 dan 0,557 U/mg untuk TO5. Hasil uji kemampuan enzim dalam hidrolisis bahan berselulosa tinggi seperti bagas tebu menunjukkan bahwa enzim selulase dari isolat TO4 mampu menghidrolisis selulosa pada bagas tebu sebanyak 15,8% setelah direaksikan selama 120 jam.

Kata kunci: *Bakteri Selulolitik, Bagas Tebu, Onggok, Selulase, Selulosa*

Abstract

The hydrolysis process of high cellulose materials requires pretreatment to separate lignin and hemicellulose from cellulose, but this process is less efficient and not environmentally friendly. Cellulase enzymes are an alternative to hydrolyze cellulose because of the specific working properties of enzymes and do not produce hazardous waste and are expected to help facilitate the pretreatment process. Cellulolytic bacteria that produce cellulase enzymes can be isolated from agricultural wastes which contain high cellulose like tapioca solid waste (onggok). The results showed that 2 isolates namely TO4 and TO5 were isolates with potential production of cellulase enzymes. Cellulase enzymes from TO4 and TO5 isolates had optimum activity at pH 5 and at 50°C with cellulase enzyme activity of 0.597 U/mg for TO4 and 0.557 U/mg for TO5. The test results of enzyme ability in hydrolysis of high cellulose materials such as sugarcane bagasse showed that the cellulase enzyme from TO4 was able to hydrolyze cellulose in sugarcane bagasse until 15.8% after 120 hours of reaction.

Keywords: *cellulase, cellulose, cellulolytic bacteria, sugarcane bagasse, tapioca solid waste*

PENDAHULUAN

Bahan bakar fosil khususnya minyak bumi yang dimiliki Indonesia jumlahnya semakin menipis. Menurut Abas *et al* (2015), produksi minyak bumi akan mengalami penurunan yang signifikan pada tahun 2066. Dengan demikian diperlukan bahan bakar alternatif untuk mengatasi krisis ini. Bioetanol merupakan salah satu alternatif pengganti bahan bakar fosil yang lebih ramah lingkungan.

Selama ini etanol lebih sering diproduksi dari bahan baku yang berbasis pati yang dikenal sebagai *first generation bioethanol*. *First generation bioethanol* memiliki kelemahan yaitu, kompetisi dengan bahan pangan. Untuk mengatasi hal tersebut diperlukan bahan baku lain yang tidak berkompetisi dengan bahan pangan seperti bahan berselulosa tinggi. Etanol yang terbuat dari bahan baku berselulosa disebut juga *second generation bioethanol*. Menurut Robak dan Balcerak (2018), *second generation bioethanol* diproduksi dari limbah pertanian seperti bagas tebu, jerami, tongkol jagung dll.

Kendala pembuatan *second generation bioethanol* adalah sulitnya proses hidrolisis bahan berselulosa tinggi. Selulosa merupakan homopolimer glukosa dengan ikatan $\beta(1-4)$ (Festucci-Buselli *et al*, 2007). Proses hidrolisis bahan

berselulosa tinggi memerlukan *pretreatment* untuk memisahkan lignin dan hemiselulosa dari selulosa. Larutan asam kuat dan basa kuat sering digunakan dalam proses *pretreatment*, tetapi kurang efisien dan tidak ramah lingkungan. Menurut Sun dan Cheng (2002), hidrolisis menggunakan metode enzimatik lebih efisien.

Enzim selulase dapat diisolasi dari bakteri selulolitik yang terdapat pada limbah pertanian, salah satunya dari limbah padat tapioka (onggok). Ketersediaan onggok di provinsi Jawa Timur cukup melimpah karena produksi singkong yang cukup tinggi pula. Pada tahun 2015, provinsi Jawa Timur memproduksi singkong sekitar 3.161.573 ton dari total produksi singkong Indonesia yang mencapai 21.801.415 ton (BPS, 2018). Onggok masih memiliki kadar selulosa yang tinggi yaitu sekitar 36,6% (Amenaghawon *et al*, 2014). Pada kondisi kadar air dan substrat selulosa yang tinggi, memungkinkan bakteri selulolitik hidup dengan baik. Pada penelitian ini dilakukan isolasi bakteri yang mampu menghasilkan enzim selulase dari onggok yang dapat menghidrolisis bahan berselulosa dengan lebih efisien sehingga diharapkan enzim selulase tersebut mampu membantu memudahkan proses *pretreatment*.

METODE PENELITIAN

Isolasi, Seleksi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik

Sampel onggok diperoleh dari PT Sumber Tani, Dampit, Kabupaten Malang. Sampel kemudian dilakukan proses pengkayaan dengan cara melakukan inkubasi pada media CMC cair dengan komposisi 0,2% CMC, 0,2% NaNO₃, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% KCl, dan 0,05% MgSO₄, 0,02% pepton pada suhu 30°C, 100 rpm selama 72 jam (Kasana *et al*, 2008). Isolasi bakteri penghasil enzim selulase dilakukan dengan cara menginokulasikan hasil pengkayaan pada media CMC dengan penambahan agar 1,5% menggunakan metode cawan sebar. Koloni yang tumbuh pada cawan diwarnai menggunakan Gram iodine selama 3-5 menit (Kasana *et al*, 2008). Zona bening yang terbentuk menunjukkan bahwa isolat yang tumbuh mampu menghidrolisis CMC. Koloni positif yang tumbuh kemudian dilakukan pemurnian dan dilakukan penentuan aktivitas selulolitik baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Pengamatan morfologi koloni bakteri, pewarnaan Gram dan uji katalase dilakukan untuk identifikasi awal isolat bakteri.

Uji Aktivitas Enzim

Sebanyak satu ose isolat murni positif ditumbuhkan pada 5 ml media CMC cair selama 24 jam pada suhu 30°C, 100 rpm. Ekstrak kasar enzim selulase didapatkan setelah melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Aktivitas enzim selulase diukur menggunakan metode DNS (3,5-dinitrosalicylic acid). Sebanyak 1 ml ekstrak kasar enzim selulase direaksikan dengan 1 ml substrat CMC 1% selama 60 menit. Campuran substrat-enzim kemudian ditambahkan 2 ml reagen DNS yang kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit, kemudian absorbansi diukur menggunakan panjang gelombang 540 nm. Kadar protein diuji menggunakan metode Bradford dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai 1 µmol gula reduksi yang dihasilkan per ml enzim per menit.

Karakterisasi Enzim Selulase

Karakterisasi dilakukan untuk menentukan pH dan suhu optimum. Penentuan pH optimum untuk enzim selulase dilakukan dengan mereaksikan 1 ml enzim selulase dengan 1% CMC pH 4,5-6 pada suhu 30°C selama 15 menit. Sedangkan penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara mereaksikan enzim selulase dengan 1% CMC pH optimum pada suhu 30-55°C selama 15 menit.

Hidrolisis Bahan Berselulosa Menggunakan Enzim Selulase Kasar

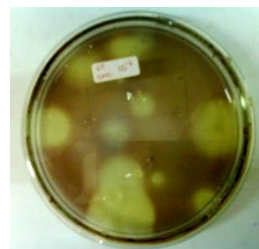
Efektifitas enzim selulase diujikan pada bagas tebu. Sampel bagas tebu diperoleh dari Pabrik Gula Krebbe, Malang. Sebelum digunakan bagas tebu terlebih dahulu dikeringkan pada suhu 70° selama 48 jam. Bagas tebu kering kemudian dihaluskan dan diayak agar ukuran menjadi seragam. Sterilisasi dilakukan pada bagas tebu agar terhindar dari kontaminasi. Sebanyak 2 gr bagas tebu direaksikan dengan 25 ml buffer pH 5 dan 25 ml ekstrak kasar enzim selulase pada suhu 50°C selama 5 hari dan pengamatan kadar alfa selulosa diamati setiap 24 jam sekali. Kadar alfa selulosa ditentukan dengan cara mereaksikan bagas tebu yang telah dilakukan perlakuan menggunakan enzim selulase dengan larutan NaOH 17,5% dengan perbandingan 1:2 antara bagas tebu dan NaOH selama 1 jam pada suhu mendidih. Setelah itu bagas tebu dikeringkan hingga berat konstan (Lawal and Ughoeke, 2010; Ogazi *et al*, 2013). Alfa selulosa dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ alfa selulosa} = \frac{\text{berat kering akhir}}{\text{berat basah awal}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri selulolitik diisolasi menggunakan CMC agar yang akan

membentuk zona bening saat ditetesi dengan Gram iodine (Gambar 1). Iodin akan membentuk kompleks berwarna coklat hingga biru kehitaman dengan selulosa, tetapi tidak pada selulosa yang telah terhidrolisis (Khatiwada *et al*, 2016). Warna kecoklatan muncul karena CMC tidak memiliki struktur heliks yang rapat seperti halnya amilosa sehingga iodine tidak dapat terperangkap sempurna dan membentuk warna biru pekat. Semakin luas diameter zona bening yang terbentuk, maka semakin tinggi pula aktifitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut.



Gambar 1. Visualisasi aktivitas enzim selulase menggunakan larutan Gram Iodin

Tabel 1. Uji Kuantitatif dan Kualitatif Enzim Selulase

Isolat	Diameter (mm)	Aktivitas Enzim (U/ml)
TO1	6	0,023
TO2	6	0,028
TO3	6	0,026
TO4	8	0,061
TO5	8	0,048

Tabel 2. Uji Morfologi dan Biokimia Isolat TO4 dan TO5

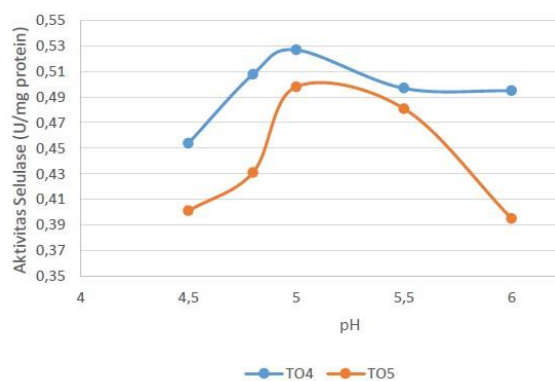
Uji Morfologi dan Biokimia	TO4	TO5
Bentuk Koloni	Bulat	Bulat

Elevasi	Datar	Cembung
Bentuk Tepi	Bergerigi	Halus
Warna Koloni	Putih	Putih
Bentuk Sel	Basil	Basil
Uji Gram	+	+

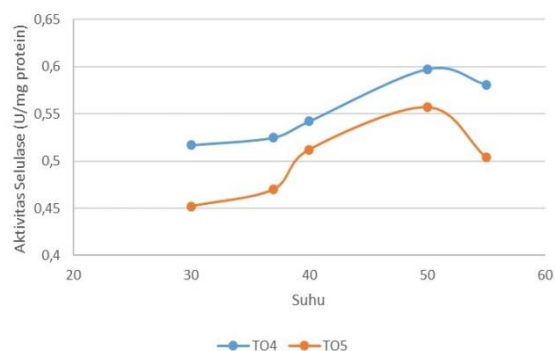
Sebanyak 5 isolat dihasilkan dari proses ini. Hasil uji aktivitas enzim selulase secara kualitatif dan kuantitatif setelah proses pemurnian isolat disajikan pada Tabel 1. Isolat TO4 dan TO5 menghasilkan diameter zona bening dan aktivitas enzim selulase yang paling besar dibandingkan dengan ketiga isolat lainnya. Kedua isolat tersebut kemudian dilakukan uji morfologi dan biokimia untuk identifikasi awal jenis mikroorganisme (Tabel 2). Berdasarkan hasil uji morfologi dan biokimia yang dilakukan pada isolat TO4 dan TO5, dapat diidentifikasi bahwa kedua isolat tersebut adalah dari jenis *Bacillus* sp. Menurut Demirkan *et al* (2014), *Bacillus* sp., memiliki karakteristik berbentuk batang, Gram positif, pembentuk spora dan katalase positif.

Produksi enzim selulase oleh isolat bakteri TO4 dan TO5 dipengaruhi oleh pH. Hal ini disebabkan karena gugus amino dan gugus karboksil pada enzim mudah dipengaruhi oleh perubahan pH. Sisi katalitik dan konformasi enzim dapat berubah jika enzim berada pada pH yang tidak optimum dan mengakibatkan enzim kehilangan aktivitasnya. Isolat TO4 dan TO5 memiliki pH optimum yang sama

yaitu pada pH 5. Meskipun demikian, isolat TO4 memiliki aktivitas enzim yang lebih tinggi daripada TO5. Aktivitas enzim selulase dari isolat TO4 pada pH 5 adalah 0,527 U/mg sedangkan TO5 adalah 0,498 U/mg. CMC_{case} yang merupakan bagian dari enzim selulase cenderung memiliki pH optimum antara pH 4-6,5 (Meryandini dkk, 2009). Enzim selulase ekstraseluler dari *Bacillus* sp. B233 juga memiliki kondisi optimum pada pH 5 (Orji *et al*, 2016).



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Selulase Isolat TO4 dan TO5



Gambar 3. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Selulase Isolat TO4 dan TO5

Faktor yang mempengaruhi aktifitas enzim selain pH adalah suhu. Ketika suhu

raksi mencapai suhu optimum, kecepatan reaksi akan meningkat karena terjadi peningkatan energi kinetik. Energi kinetik yang meningkat akan mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi substrat maupun enzim, yang pada akhirnya akan memperbesar peluang substrat dan enzim untuk bereaksi. Ketika suhu dinaikkan diatas suhu optimum maka kemungkinan denaturasi protein enzim akan semakin besar sehingga konformasi enzim akan berubah dan gugus reaktif terhambat (Meryandini dkk, 2009). Isolat TO4 dan TO5 memiliki suhu optimum pada 50°C. Pada suhu optimum yang sama, aktivitas enzim selulase isolat TO4 lebih tinggi daripada isolat TO5. Aktivitas enzim selulase dari isolat TO4 pada suhu 50°C adalah 0,597 U/mg dan 0,557 U/mg untuk enzim selulase dari isolat TO5. Menurut Sivakumar *et al* (2016), suhu optimum enzim selulase yang berasal dari *Bacillus licheniformis* B7 adalah 50°C. Enzim selulase *Bacillus pumilus* EB3 memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 50-60°C (Ariffin *et al*, 2006).

Enzim selulase dari isolat terpilih, yaitu isolat TO4 kemudian diuji kemampuannya dalam menghidrolisis substrat bahan berselulosa alami. Substrat bahan beselulosa yang digunakan adalah bagas. Bagas merupakan limbah padat industri gula tebu yang mengandung selulosa 52,7%, hemiselulosa 17,5%, lignin

24,2%, lain-lain 5,6% (Samsuri *et al*, 2007). Pengujian enzim selulase ini dilakukan karena enzim akan memiliki aktifitas dan kemampuan mendegradasi yang berbeda pada jenis substrat yang berbeda pula. Selulosa pada bagas akan didegradasi menjadi glukosa yang selanjutnya dapat dimanfaatkan salah satunya sebagai bioetanol.

Alfa selulosa adalah selulosa yang tidak larut pada larutan NaOH 17,5% dan merupakan selulosa yang sebenarnya. Kadar α -selulosa bagas selama fermentasi disajikan dalam Tabel 3. Isolat TO4 mampu mendegradasi bagas, hal ini ditunjukkan dengan menurunnya kadar α -selulosa bagas selama proses fermentasi. Sebelum fermentasi, bagas tebu memiliki kadar α -selulosa sebesar 50,8%. Setelah jam ke-120 kadar α -selulosa bagas dengan penambahan enzim selulase dari isolat TO4 turun menjadi 35%. Dengan kata lain isolat TO4 dapat mendegradasi selulosa pada bagas sebanyak 15,8%.

Tabel 3. Kadar α -Selulosa Hasil Hidrolisis Bagas oleh Isolat TO4

Waktu Fermentasi (Jam)	Kadar α -Selulosa (%)
0	50,8
24	40,9
48	40
72	36,6
96	36,3
120	35

Dalam mendegradasi selulosa menjadi glukosa, enzim selulase yang dibagi menjadi endo-1,4- β -glukanase (EC 3.2.1.4), ekso-1,4- β -glukanase (EC 3.2.1.91) dan β -glukosidase (EC 3.2.1.21) bekerja secara sinergis (Juturu *and* Wu, 2014). Akan tetapi kendala yang sering terjadi adalah terhambatnya kerja enzim selulase karena pada kondisi alami selulosa berikatan kuat dengan lignin dan hemiselulosa. Lignin dan hemiselulosa membungkus dan mengikat selulosa secara fisik, sehingga menghambat enzim selulase mendegradasi selulosa. Oleh sebab itu peningkatan luas permukaan dan pengocokan pada saat inkubasi substrat-enzim diharapkan dapat memperbesar kontak antara enzim selulase dan komponen selulosa sehingga dapat meningkatkan aktifitas enzim selulase.

PENUTUP

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa limbah padat tapioka (onggok) berpotensi memiliki bakteri yang menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase dari isolat bakteri TO4 memiliki pH optimum pada pH 5 dan suhu optimum 50°C. Isolat TO4 terbukti mampu mendegradasi selulosa yang terdapat pada bagas tebu hingga 15,8%. Saran untuk penelitian ini adalah isolat TO4 dapat dilakukan identifikasi lebih lanjut untuk mengetahui spesies bakteri yang lebih mendalam. Selain itu enzim selulase

potensial dari isolat TO4 juga dapat dilakukan proses pemurnian dan uji stabilitas enzimnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abas, N., Kalair, A., Khan, N. 2015. Review of Fossil Fuels and Future Energy Technologies. *Future*, Volume 69, pp. 31-49. DOI: 10.1016/j.futures.2015.03.003
- Amenaghawon, N. A., Ogebeide, S. E., Okieimen, C. O. 2014. Application of Statistical Experimental Design for the Optimisation of Dilute Sulphuric Acid Hydrolysis of Cassava Bagasse. *Acta Polytechnica Hungarica*, Volume 11 (9). DOI: 10.12700/APH.11.09.2014.09.14.
- Ariffin, H., N. Abdullah, M.S. Umi Kalsom, and Y. Shirai. 2006. Production and Characterization of Cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology*, Volume 3(1) pp. 47-53.
- Badan Pusat Statistik. Produksi Ubi Kayu Menurut Provinsi (ton), 1993-2015. [diakses pada 26 Oktober 2018]. Tersedia dari: <https://www.bps.go.id/linkTableDinamis/view/id/880>
- Demirkan, E., Baygin, E., Usta, A. 2014. Screening of Phytate Hydrolysis *Bacillus* sp. Isolated from Soil and

- Optimization of The Certain Nutritional and Physical Parameters on The Production of Phytase. *Turkish Journal of Biochemistry*, Volume 39 (2), pp. 206–214. DOI: 10.5505/tjb.2014.26817.
- Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C., and Joshi, C. P. 2007. Structure, Organization, and Functions of Cellulose Synthase Complexes in Higher Plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Volume 19(1), pp. 1-13. DOI: 10.1590/S1677-04202007000100001.
- Juturu, V., and Wu, J. C. 2014. Microbial Cellulases: Engineering, Production and Applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 33, pp. 188-203. DOI: 10.1016/j.rser.2014.01.077.
- Kasana, R. C, Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. 2008. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Mikrobiology*, Volume 57, pp. 503-507. DOI: 10.1007/s00284-008-9276-8.
- Khatiwada, P., Ahmed, J., Sohag, M. H., Islam, K., and Azad, A. K. 2016. Isolation, Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacterial Isolates from Municipal Solid Wastes and Rice Straw Wastes. *Journal of Bioprocess Biotechniques*, Volume 6(4). DOI: 10.4172/2155-9821.1000280.
- Lawal, S. A., and Ugheoke, B. I. 2010. Investigation of Alpha-Cellulose Content of Agro-Waste Products as Alternatives for Paper Production. *AU Journal of Technology*, Volume 13(4), pp. 258-260.
- Meryandini, A., Wahyu W., Besty M., Titi C.S., Nisa R., Hasrul S. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Journal of Science*, Volume 13(1), pp. 33-38. DOI: 10.7454/mss.v13i1.369.
- Ogazi, A. C., Aneke, A. G., and Afolabi. A. S. 2013. Optimization of Alpha Cellulose Production using an African Grass (*Penicum maximum*). International Conference on Chemical, Mining and Metallurgical Engineering (CMME'2013). Johannesburg (South Africa) 27-28 November 2013.
- Orji, F. A., Dike, E. N., Lawal, A. K., Sadiq, A. O., Suberu, Y., Famotemi, A. C., Ugbana, A. I., Fashola, F., Ita, B., Olatope, S. O., Itoandoan, E. E., Adefiranye, A. O., dan Elemo, G. N. 2016. Properties of *Bacillus* species Cellulase Produced Using Cellulose from Brewers Spent Grain (BSG) as Substrate. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, Volume 7(3), pp. 142-148. DOI: 10.4236/abb.2016.73013.

- Robak, K. and Balcerek, M. 2018. Review of Second-Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. *Food Technology and Biotechnology*, Volume 56(2), pp. 174-187. DOI: 10.17113/ftb.56.02.18.5428.
- Samsuri, M., M. Gozan, R. Mardias, M. Baiquni, H. Hermansyah, A. Wijanarko, B. Prasetya, M. Nasikin. 2007. Pemanfaatan Selulosa Bagas Untuk Produksi Ethanol Melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak dengan Enzim Xylanase. *Makara Journal of Technology*, Volume 11(1), pp. 17-24. DOI: 10.7454/mst.v11i1.437.
- Sivakumar, N., Al-Zadjali, A., Al-Bahry, S., Elshafie, A., and Eltayeb, E. A. 2016. Isolation and characterization of cellulolytic *Bacillus licheniformis* from compost. *African Journal of Biotechnology*, Volume 15(43), pp. 2434-2446. DOI: 10.5897/AJB2016.15641.
- Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Material from Ethanol Production: A Review. *Bioresouce Technology*, Volume 83(7), pp. 1-11. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7.