

AKTIVITAS ENZYM SELULASE YANG DIHASILKAN OLEH BAKTERI *Serratia marcescens* PADA SUBSTRAT JERAMI

*Khrisna Lazuardi Budi¹, Wijanarka², Endang Kusdiyantini²

¹Program Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika,
Universitas Diponegoro

²Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang,
Semarang

*Email:

khrisna_lazuardi@yahoo.co.id

ABSTRACT

Cellulose (EC 3.2.1.4) is enzyme complex consisting of some enzymes which together decomposing cellulose into glucose by hydrolizes the $-1,4$ bond in cellulose. The purpose of this study is to determine cellulose activity which produced by *Serratia marcescens* in different substrate concentration and at the time of incubation T_4 , T_8 , T_{12} . This research uses Randomized Block Design (RBD) factorial pattern with two factors. The first factor was variation of straw substrate which had been delignificated (V_0 , V_1 , V_2 , V_3). The second factor is the variation of time incubation (T_4 , T_8 , T_{12}). Each factor is repeated 3 times. The data obtained were analyzed using Analysis of Variance (ANOVA) ($\alpha = 0.05$). The result shown that variation concentration of straw, and the interaction (combination) between the straw substrate and the incubation time substrate was not significantly different. The result treatment of incubation time was significantly different of the cellulase activity. The result of anova analyzed is obtained that F count ($\alpha = 0.05$) value from straw substrate, interaction (combination) between the straw substrate and the incubation time substrate, and incubation time was 0.53; 2.18; 8.00. F table ($\alpha = 0.05$) value of straw substrate, interaction (combination) between the straw substrate and the incubation time substrate, and incubation time was 2.99; 2.20; 3.39. The result of anova, is continued by BNT 5% test. The result of BNT test shown that the highest incubation time of cellulase activity was in incubation time 12 hours with the average value 0.26 U/mL.

Key Word : cellulose, *Serratia marcescens*, straw substrate, incubation time

ABSTRAK

Selulase (EC 3.2.1.4) merupakan kompleks enzim yang terdiri dari beberapa enzim yang bersama-sama menguraikan selulosa menjadi glukosa dengan cara menghidrolisis ikatan $-1,4$ pada selulosa. Tujuan dari penelitian ini adalah menguji aktivitas selulase yang dihasilkan oleh *Serratia marcescens* pada konsentrasi substrat jerami yang berbeda dan pada waktu inkubasi T_4, T_8, T_{12} . Metode penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial dengan dua faktor. Faktor pertaman adalah variasi konsentrasi substrat jerami yang telah dilakukan delignifikasi (V_0, V_1, V_2, V_3). Faktor kedua yaitu variasi waktu inkubasi (T_4, T_8, T_{12}). Kedua faktor dilakukan 3 kali pengulangan. Data dianalisis menggunakan ANOVA ($\alpha = 0.05$). Hasil menunjukkan bahwa variasi konsentrasi substrat jerami dan interaksi (kombinasi) antara substrat jerami dengan waktu inkubasi tidak mempengaruhi aktivitas selulase. Hasil variasi waktu inkubasi memberikan pengaruh terhadap aktivitas selulase. Hasil perhitungan anova didapatkan nilai F hitung ($\alpha = 0.05$) dari substrat jerami, interaksi (kombinasi) antara substrat jerami dengan waktu inkubasi, dan waktu inkubasi secara berurutan sebesar 0.53; 2.18; 8.00. Nilai dari F tabel ($\alpha = 0.05$) pada substrat jerami, interaksi (kombinasi) antara substrat jerami dengan waktu inkubasi dan waktu inkubasi secara berurutan sebesar 2.99; 2.20; 3.39. Hasil uji sidik ragam yang diperoleh selanjutnya akan diuji lanjut dengan uji BNT 5%. Hasil uji BNT 5% didapatkan waktu inkubasi tertinggi aktivitas selulase terjadi pada waktu inkubasi 12 jam dengan rata-rata nilai 0.26 U/mL.

Kata Kunci : Selulase, *Serratia marcescens* Substrat jerami, Waktu Inkubasi

PENDAHULUAN

Jerami padi merupakan salah satu limbah lignoselulosa pertanian yang jumlahnya cukup melimpah dan mengandung komponen lignin, selulosa, dan hemiselulosa yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku/substrat yang digunakan untuk pembuatan selulase, sehingga memiliki nilai ekonomi dan ramah lingkungan (Nenci, 2012). Komposisi jerami yang terdiri dari berbagai macam komponen harus dilakukan proses delignifikasi untuk *pretreatment* agar di dapatkan selulosa.

Delignifikasi merupakan proses pemisahan struktur lignin yang berikatan dan menyelubungi selulosa. Proses ini diperlukan untuk mempermudah hidrolisis selulosa (Nenci, 2012). Menurut Hamisan, (2009) delignifikasi menggunakan NaOH dapat menghilangkan fraksi lignin lebih banyak dari biomassa karena kelarutan lignin dalam larutan alkali. Menurut Sun, (2002) adanya safonifikasi ikatan ester dari residu lignin atau hemiselulosa memberi dampak selulosa menjadi lebih terbuka dan lebih mudah untuk berinteraksi dengan enzim, sehingga hidrolisis selulosa menjadi glukosa akan lebih mudah.

Selulase (EC 3.2.1.4) dapat menghidrolisis selulosa menjadi polimer yang ledih sederhana seperti glukosa. Menurut Nenci, (2012) selulase merupakan suatu kompleks enzim yang terdiri dari beberapa enzim yang berkerja bertahap atau bersama-sama menguraikan selulosa menjadi glukosa dengan cara menghidrolisis ikatan -1,4 pada selulosa. Menurut Fawzya *dkk.*, (2014) salah satu penghasil enzim selulase adalah mikroorganisme seperti bakteri dan jamur.

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan *Serratia marcescens*. *Serratia marcescens* merupakan bakteri gram negatif, dari genus *serratia* dan digolongkan sebagai kelompok enterobacteriaceae (Trivedi *et al.*, 2015). Enzim yang dihasilkan oleh *Serratia marcescens* mampu menghidrolisis selulosa yang terkandung di dalam jerami yang akan digunakan sebagai sumber karbon dalam memenuhi kebutuhan pertumbuhannya.

Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas selulase yang dihasilkan oleh *Serratia marcescens* pada konsentrasi substrat jerami yang berbeda dan pada waktu inkubasi T_4, T_8, T_{12} .

METODE PENELITIAN

Preparasi Substrat Jerami

Jerami direndam dalam larutan NaOH 4% pada pH 10-11 dengan perbandingan jerami dan larutan NaOH 4% sebesar 1:10 (w/v). Jerami dicuci berkali-kali dengan akuades hingga pH netral. Kondisi pH netral dinyatakan bila pH air cucian jerami sama dengan pH akuades. Jerami hasil delignifikasi dikeringkan menggunakan oven hingga kering selama semalam dengan suhu 50°C. Tahap selanjutnya jerami dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan menggunakan saringan berukuran 125 mesh hingga mendapatkan serbuk atau bubuk jerami. Tahap berikutnya serbuk jerami ditimbang sesuai dengan perlakuan (Nenci, 2012). Serbuk jerami tersebut ditambahkan akuades dan kemudian direbus hingga mendapatkan ekstrak dari jerami. Ekstrak jerami tersebut disimpan di dalam lemari es untuk selanjutnya akan digunakan sebagai substrat.

Pembuatan Media Starter

Pembuatan media starter dengan komposisi terdiri dari $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,025 g, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0,25 g, NaCl 0,115 g, yeast extract 0,1 g, CMC 0.5 g, dilarutkan dalam akuades 50 mL (Al-Arif *et al.*, 2012).

Pembuatan Starter

Kultur kerja pada media miring selanjutnya diambil satu ose, kemudian dimasukkan kedalam media starter, dan diinkubasi menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm kurang lebih selama 18 jam. Starter diukur kerapatan sel menggunakan spektrofotometer pada 520 nm.

Pembuatan Medium Produksi Selulase

Pembuatan medium produksi dengan komposisi terdiri dari $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g,

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, NaCl 0,23 g, yeast extract 0,2 g, dilarutkan dalam akuades 100 mL (Al-Arif *et al.*, 2012). Perlakuan yang digunakan yaitu V_0 dengan penambahan CMC 1 g, V_1 dengan penambahan 100 mL ekstrak jerami 0,1 g, V_2 dengan penambahan 100 mL ekstrak jerami 0,5 g, dan V_3 dengan penambahan 100 mL ekstrak jerami 1 g.

Proses Fermentasi

Starter diambil sebanyak 5 mL dalam 100 mL medium produksi atau 5% dari medium produksi. Tahap berikutnya Erlenmeyer yang telah berisikan medium produksi dan starter diinkubasi selama 24 jam menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Media kultur diambil setiap 4 jam sebanyak 5 mL dengan komposisi 3 mL untuk pengukuran OD pertumbuhan, 1 mL untuk pengukuran aktivitas selulase, dan 1 mL untuk cadangan.

Pengukuran Pertumbuhan Sel

Medium produksi / kultur diambil sebanyak 3 mL setiap 4 jam sekali dengan interval 0 jam, 4 jam, 8 jam, 12 jam, 16 jam, 20 jam, 24 jam. Pertumbuhan sel diukur menggunakan metode turbidimetri (kekeruhan) dan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada 520 nm. Tahap berikutnya dibuat Kurva pertumbuhannya.

Pengukuran Aktivitas Selulase

Medium produksi/ kultur diambil sebanyak 1 mL pada interval waktu inkubasi 4 jam, 8 jam, 12 jam. Tahap berikutnya sampel di sentrifugasi menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifugasi didapatkan *Crude enzyme* yang akan digunakan untuk penentuan aktivitas selulase dengan metode gula reduksi.

Tahap selanjutnya 3 buah tabung reaksi disiapkan. Tabung reaksi tersebut masing-masing sampel diberi label blanko, kontrol, dan sampel. Tabung blanko dimasukkan 0,9 mL substrat CMC dan 0,1 mL akuades. Tabung sampel dimasukkan 0,9 mL substrat CMC dan 0,1 *crude enzyme*. Tabung kontrol dimasukkan 0,9 mL substrat CMC dan 0,1 *crude enzyme* lalu reaksi langsung dihentikan dengan cara direbus

ke dalam penangas selama 2-3 menit. Ketiga tabung kemudian di inkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit. Tahap berikutnya reaksi kembali dihentikan dengan cara direbus ke dalam penangas selama 2-3 menit dan ditambahkan 1mL reagen DNS, selanjutnya dipanaskan kembali selama 2-3 menit. Tahap berikutnya ditambahkan 4 mL akuades dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada 570 nm (Wijanarka *et al.*, 2016).

Aktivitas selulase didapat berdasarkan pada gula reduksi yang terbentuk. Konsentrasi gula reduksi dapat dihasilkan menggunakan rumus (Absorbansi Sampel-Absorbansi Blanko) - (Absorbansi Kontrol-Absorbansi Blanko) (Wijanarka *et al.*, 2016). Aktivitas selulase dalam satuan (U/mL) dapat dicari dengan persamaan aktivitas selulase. Menurut Irawan *et al.* (2008) penentuan nilai aktivitas selulase dihitung dengan persamaan sebagai berikut :
Aktivitas selulase (U/mL) =

$$\frac{\mu\text{g glukosa} \times \text{faktor pengenceran} \times 1000}{V \times \text{BM glukosa} \times t}$$

Keterangan:

Faktor Pengenceran : faktor pengenceran enzim (1/5)

V : volume enzim (0,1 mL)

t (waktu inkubasi) : waktu inkubasi 3 menit

BM glukosa : Berat molekul glukosa (180,2 dalton)

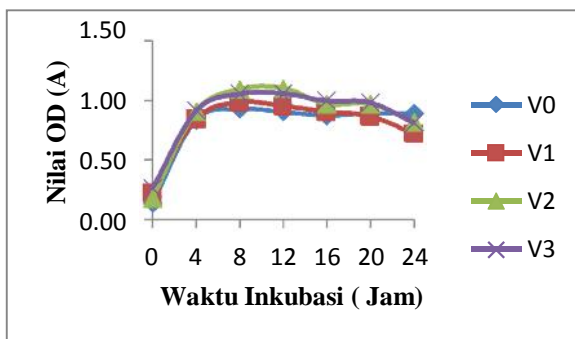
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan *Serratia marcescens*

Pertumbuhan sel *Serratia marcescens* diukur dengan menggunakan metode turbidimetri dengan alat spektrofotometer dengan 520 nm. Berdasarkan hasil yang didapatkan, waktu inkubasi 0 jam pada kurva pertumbuhan sudah memiliki nilai absorbansi yang termasuk kedalam fase log. Hal ini dikarenakan dalam penelitian ini menggunakan starter dalam proses fermentasi, sehingga waktu inkubasi 0 jam sudah menghasilkan nilai absorbansi yang termasuk kedalam fase log. Menurut Holzapfel, (2002) kultur starter merupakan bahan yang mengandung sejumlah besar mikroorganisme yang digunakan untuk

mempercepat proses fermentasi. Kurva Pertumbuhan *Serratia marcescens* dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Waktu inkubasi 0-4 jam di dapatkan hasil pertumbuhan sel memasuki fase logaritma, hal ini ditunjukkan dengan kenaikan nilai absorpsi sehingga kurva menunjukkan hasil yang meningkat drastis. Kurva Pertumbuhan *Serratia marcescens* dapat dilihat pada Gambar 4.1. Menurut Waluyo, (2004) fase log merupakan fase sel-sel membelah dengan cepat dan pertambahan jumlahnya mengikuti kurva logaritmik. Menurut Gandjar, (2006) fase eksponensial, merupakan fase perbanyakan jumlah sel yang sangat banyak, aktivitas sel sangat meningkat. Pada awal fase-fase ini kita dapat memanen enzim-enzim dan akhir pada fase ini.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *Serratia marcescens* hingga waktu inkubasi 24 jam dengan perlakuan variasi substrat jerami.

Waktu inkubasi 4-20 jam didapatkan hasil pertumbuhan menunjukkan fase stasioner. Hal ini dapat diamati dari kurva pertumbuhan yang menunjukkan kenaikan dan penurunan yang tidak terlalu drastis, sehingga masuk dalam fase

stasioner. Fase stasioner dapat dilihat dari kurva pertumbuhan pada Gambar 4.1. Menurut Gandjar, (2006) fase stasioner yaitu fase jumlah sel yang bertambah dan jumlah sel yang mati relatif seimbang.

Waktu inkubasi 20-24 jam pada perlakuan V₁, V₂, V₃ didapatkan hasil pertumbuhan menuju fase kematian. Hal ini dapat dilihat dari kurva pertumbuhan yang mulai menunjukkan penurunan. Penurunan yang dihasilkan tidak sampai menuju fase kematian. Menurut Sonia., dkk (2015) hal ini terjadi karena sumber nutrisi untuk pertumbuhan sel telah mulai berkurang.

Aktivitas Selulase Bakteri *Serratia marcescens*

CMC (*Carboxymethyl cellulose*) dan jerami merupakan salah satu selulosa yang dapat digunakan sebagai substrat dari selulase. Jerami padi yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari kelurahan/desa Bulusan,

Kecamatan Tembalang, Kota Semarang, Jawa Tengah. Jerami dilakukan delignifikasi terlebih dahulu dengan merendam jerami kedalam larutan NaOH. Delignifikasi berfungsi untuk memisahkan komponen lignin yang menyelubungi selulosa yang terkandung di dalam jerami, sehingga di dapatkan selulosa secara utuh.

Berdasarkan analisis sidik ragam (ANOVA) terhadap aktivitas selulase menunjukkan bahwa variasi konsentrasi substrat jerami pada medium produksi dan interaksi antara substrat jerami dengan waktu inkubasi tidak mempengaruhi aktivitas selulase. Hasil perhitungan sidik ragam dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil *Analysis of Varian* (ANOVA)

SK	DB	JK	KT	F Hit	F Tabel	
					0.05	0.01
Kelompok	2	0.001	0.0005	5*	3.39	5.57
Kombinasi VT	11	0.003	0.0003	2.18	2.20	3.06
V	3	0.0002	0.0001	0.53	2.99	4.68
T	2	0.002	0.001	8.00**	3.39	5.57
V><T	6	0.001	0.0002	1.33	2.49	3.63
Galat	24	0.002	0.0001			
Total	35					

Hal ini dapat diartikan bahwa variasi substrat jerami yang berbeda-beda sebagai pengganti CMC, belum optimum untuk meningkatkan aktivitas selulase. Hal ini diduga bahwa, variasi konsentrasi substrat jerami yang digunakan terlalu sedikit. Hal ini mengakibatkan selulase tidak dapat dihasilkan secara optimum dikarenakan tidak tercukupinya selulosa di dalam medium produksi. Produksi selulase yang dihasilkan oleh *Serratia marcescens* membutuhkan substrat yang terkandung di dalam media produksi. Menurut Adri *et al.*, (2013) jumlah enzim yang ada di dalam sel tidak tetap, dan tergantung pada substratnya.

Waktu Inkubasi

Penentuan waktu inkubasi yang digunakan berdasarkan dari kurva pertumbuhan.

Aktivitas selulase *Serratia marcescens* dihasilkan pada fase ekponensial atau fase awal stasioner. Hal ini yang menjadi dasar penentuan pemilihan variasi waktu inkubasi berdasarkan aktivitas enzim selulase. Variasi waktu inkubasi yang digunakan dalam penelitian yaitu T₄, T₈, T₁₂. Berdasarkan analisis (ANOVA), terhadap aktivitas selulase menunjukkan bahwa waktu inkubasi memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas selulase. Hasil perhitungan sidik ragam dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil uji sidik ragam yang diperoleh selanjutnya akan diuji lanjut menggunakan uji BNT 5%. Hasil uji lanjut menggunakan uji BNT 5% didapatkan hasil bahwa perlakuan waktu inkubasi selama 12 jam berbeda nyata dengan waktu inkubasi selama 4 dan 8 jam. Hasil uji lanjut BNT 5% dapat dilihat pada Tabel 2.

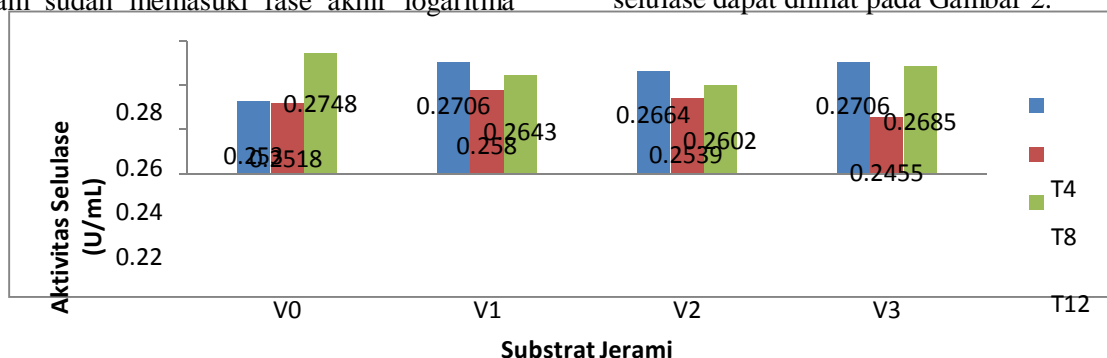
Tabel 2 Tabel Uji Lanjut BNT

Waktu (T)	Rata-Rata (X)	Beda (Selisih)		BNT 5%
		X-T ₈	X-T ₄	
T ₁₂	0.2669	0.0146*	0.0018	0.0135
T ₄	0.2651	0.0128		
T ₈	0.2523			

*) X-T₈ > BNT 5%, sehingga perlakuan waktu inkubasi Selama 12 jam berbeda nyata dengan waktu inkubasi selama 4 dan 8 jam.

Hal ini dapat diartikan bahwa waktu inkubasi tertinggi aktivitas selulase terjadi pada waktu inkubasi 12 jam dengan rata-rata nilai 0.2669 U/mL. Menurut Sonia., *dkk* (2015) produksi enzim yang merupakan metabolit primer terjadi dari fase pertumbuhan sel hingga akhir fase ekponensial atau awal stasioner. Tingginya aktivitas enzim diduga bahwa waktu inkubasi 4-12 jam sudah memasuki fase akhir logaritma

atau awal fase stasioner. Hasil aktivitas selulase tertinggi pada waktu inkubasi 12 jam dari keempat perlakuan yaitu pada perlakuan V₀ dengan nilai 0.2748 U/mL. Hal ini disebabkan perlakuan V₀ merupakan kontrol dengan substrat yang digunakan dalam medium produksi yaitu CMC. Perlakuan lainnya menggunakan variasi substrat jerami tanpa ditambahkan substrat CMC didalam medium produksi. Hasil aktivitas selulase dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Aktivitas selulase *Serratia marcescens* dalam medium produksi CMC dengan perlakuan variasi substrat jerami dengan interval waktu inkubasi (T₄, T₈, T₁₂).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa variasi substrat jerami yang berbeda-beda sebagai pengganti CMC, belum optimum untuk meningkatkan aktivitas selulase. Hal ini diduga bahwa, variasi konsentrasi substrat jerami yang digunakan kurang mencukupi kebutuhan nutrisi khususnya sumber karbon dalam medium produksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu inkubasi mempengaruhi aktivitas selulase.

DAFTAR PUSTAKA

- Adri, W., Mardiah, E., dan Afrizal. 2013. Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* dan Kemampuannya Menghidrolisis Jerami Padi. *Jurnal Kimia Unand (ISSN No. 2302-3401)*.2(2).103-108.
- Fawzya Yusro Nuri, Amelia Latifa, dan Nita Noriko. 2014. Pemanfaatan Limbah Pengolahan Agar sebagai Komponen Medium Produksi Selulase dari Mikroba. Jakarta: Universitas Al-Azhar. *JPB Perikanan* Vol. 9 No. 1 Tahun 2014: 51–60.
- Gandjar, Indrawati. 2006. Mikologi: Dasar dan Terapan. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Hamisan, A.H. 2009. Delignification of Oil Palm Fruit Bunch using Chemical and Microbial Pretreatment Methode. University Putra Malaysia, Malaysia.
- Holzapfel W. H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75 197–212
- Irawan, B., Sutihat dan Sumardi. 2008. Uji Aktivitas Enzim Selulase dan Lipase pada Mikrofungi selama Proses Dekomposisi Limbah Cair Kelapa Sawit dengan Pengujian Kultur Murni. *Skripsi*. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, Lampung
- Nenci. 2012. Isolasi dan karakterisasi selulose dari *Trichoderma viride* strain TO51 dengan substrat jerami. *Skripsi* . UI Press, Jakarta .
- Sonia Nenu Maria, Joni Kusnadi. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Selulase Dari Isolat Bakteri OS-16 Asal Padang Pasir Tengger-Bromo. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya, Malang. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol. 3 No 4 p.11-19, September 2015.
- Sun, Y. 2002. Enzymatic Hydrolysis of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production, Ph. D. *Thesis*. NC State University, Raleigh, NC.
- Trivedi Mahendra Kumar, Alice Branton, Dahryn Trivedi, Gopal Nayak, Mayank Gangwar, Snehasis Jana. 2015. Assessment of antibiogram of bifield energy treated *Serratia marcescens*. *European Journal of Preventive Medicine*
- Waluyo, I. 2004. Mikrobiologi Umum. UMM Press, Malang.
- Wijanarka, E. Kusdiyantini and S. Parman. 2016. Screening Cellulolytic Bacteria from the Digestive Tract Snail (*Achantina fulica*) and Test the Ability of Cellulase Activity. Departement of Biologi, Faculty of Science and Mathematics, Diponegoro University. *Journal of Biologi & Biologi Education* 8 (3): 385-391.