

Karakterisasi Enzim Selulase Isolat Bakteri pada Saluran Pencernaan Rayap (*Odontotermes javanicus*)

Characterization of Bacterial Isolate Cellulase Enzymes in the Digestive Tract Termites (*Odontotermes javanicus*)

Anastasya Mokodompit^{1*}, Jantje Ngangi², dan Emma M. Moko²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Negeri Manado

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Negeri Manado

Kampus Unima di Tondano, Sulawesi Utara 95618, Indonesia

*Korespondensi penulis, e-mail: mokodompitanastasya@gmail.com

Diterima 1 Juli 2020/Disetujui 24 November 2020

ABSTRACT

Termites are insects that are very important for nutrient cycling in natural ecosystems. This is due to the ability of termites to digest lignocellulolytic biomass (cellulose, hemicellulose, and lignin) because of the symbiosis of microorganisms, namely cellulolytic bacteria in the digestive tract of termites. The use of cellulolytic bacteria is as a producer of cellulase enzymes which are used to hydrolyze cellulose into glucose monomers as carbon sources and potential energy sources. Termite samples were taken from the Tangkoko Bitung Protected Forest area of North Sulawesi. This study aims to characterize cellulase enzymes produced by cellulolytic bacteria in the digestive tract of *Odontotermes javanicus* termites by determining the optimum activity of cellulase enzymes based on the appropriate pH, temperature and substrate concentration. The measurement of the activity of cellulase enzyme crude extract was carried out according to the highest production hours of cellulase using a modified method of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) on the CMC substrate. The optimum production of cellulase enzyme crude extract at 6th hour with an activity of 0.0054 U / mL. The highest activity of cellulase enzymes at pH 3.5 and 90°C. Cellulase from isolate BRO1 has the highest activity at 1.5% CMC substrate concentration.

Keywords: cellulase enzyme, termite, *Odontotermes javanicus*.

ABSTRAK

Rayap merupakan serangga yang sangat penting untuk daur nutrisi pada ekosistem alami. Hal ini disebabkan oleh kemampuan rayap dalam mencerna biomassa lignoselulolitik (selulosa, hemiselulosa, dan lignin) karena adanya simbiosis mikroorganisme yakni bakteri selulolitik didalam saluran pencernaan rayap. Pemanfaatan bakteri selulolitik yaitu sebagai penghasil enzim selulase yang digunakan untuk menghidrolisis selulosa menjadi monomer glukosa sebagai sumber karbon dan

sumber energi yang potensial. Sampel rayap diambil dari kawasan Hutan Lindung Tangkoko Bitung Sulawesi Utara. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik pada saluran pencernaan rayap *Odontotermes javanicus* dengan penentuan aktivitas optimum enzim selulase berdasarkan pH, suhu dan konsentrasi substrat yang sesuai. Pengukuran aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dilakukan sesuai jam produksi tertinggi selulase dengan menggunakan modifikasi metode 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) pada substrat CMC. Produksi ekstrak kasar enzim selulase optimum pada jam ke-6 dengan aktivitas sebesar 0.0054 U/mL. Aktivitas tertinggi enzim selulase pada pH 3.5 dan suhu 90°C. Selulase dari isolat BRO1 mempunyai aktivitas tertinggi pada konsentrasi substrat CMC 1.5%.

Kata kunci: enzim selulase, rayap, *Odontotermes javanicus*.

PENDAHULUAN

Bakteri selulolitik adalah bakteri yang memiliki kemampuan menguraikan selulosa menjadi monomer glukosa dan menjadikannya sebagai sumber karbon dan sumber energi). Pemanfaatan bakteri selulolitik yaitu sebagai penghasil enzim selulase yang digunakan untuk menghidrolisis selulosa. Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase berbeda, tergantung gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan. Enzim selulase adalah biokatalisator yang berperan mengkatalisis proses hidrolisis selulosa menjadi rantai selulosa yang lebih pendek atau oligosakarida yang selanjutnya akan diubah lagi menjadi glukosa. Penelitian ini menggunakan rayap kasta pekerja yaitu rayap *Odontotermes javanicus*.

Rayap *O. javanicus* merupakan kontributor utama biodegradasi senyawa lignoselulosa. Saluran pencernaannya mengandung bakteri yang memiliki kemampuan tinggi mendegradasi lignoselulosa secara efisien. Glukosa yang merupakan hasil akhir dari proses hidrolisis selulosa dapat digunakan sebagai sumber nutrisi yakni bahan pangan, makanan ternak, dan sebagai sumber substrat untuk fermentasi atau bahan baku pada proses biokonversi untuk memproduksi senyawa organik lainnya seperti etanol, butanol, dan aseton dalam skala besar (Kumar *et al.*, 2009). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakter enzim selulase pada isolat bakteri selulolitik dari saluran pencernaan rayap *Odontotermes javanicus* yang meliputi suhu optimum, pH optimum dan konsentrasi substrat optimum. Oleh karena itu karakterisasi enzim selulolitik yang di isolasi dari saluran pencernaan rayap ini perlu dilakukan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2017-November 2017. Sampel Rayap diambil dari kawasan Hutan Lindung Tangkoko Bitung Provinsi Sulawesi Utara. Isolasi Bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, Institut Pertanian Bogor (IPB). Karakterisasi Enzim dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Sumberdaya Bioteknologi Hewan dan Biomedis (PPSHB) Institut Pertanian Bogor (IPB).

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian, yaitu : *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), spektrofotometer UV-VIS, Cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, tabung endorff, lemari pendingin, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, *shaker*, *stopwatch*

inkubator bergoyang, sentrifuse, outoklaf, pipet tetes, tip steril, jarum ose, bunsen, alat pengaduk, hot plate dan peralatan laboratorium lainnya.

Bahan yang di gunakan dalam penelitian, yaitu: Isolat bakteri (Saluran pencernaan Rayap), media CMC (*Carboxymethyl cellulose*), glukosa, akuades steril, larutan kongo red 0,1%, MgSO₄, K₂HPO₄, Yeast extract, Agar bacto, FeSO₄, KNO₃, CaCl₂ H₂O, bufer sitrat fosfat, NaOH, HCL dan *Dinitrosalicylic acid* (DNS).

Penelitian ini terbagi atas beberapa tahapan yang diawali dengan peremajaan isolat dan uji zona bening. Isolat yang terpilih dengan kode isolat BRO₁ diremajakan pada media agar miring CMC 1% kemudian dilakukan uji zona bening dengan menentukan nilai indeks selulolitik yang dihasilkan dari proses isolasi bakteri pada saluran pencernaan rayap *O.javanicus*. Nilai Indeks Selulolitik (IS) bakteri dapat dihitung dengan pengukuran zona bening yang terbentuk di sekitar koloni dikurangi diameter koloni dibagi diameter koloni (Kader & Omar, 1998). Kemudian dilanjutkan pada tahapan produksi ekstrak kasar enzim yang dilakukan lewat proses sentrifuse dengan tujuan untuk memisahkan supernatan enzim dengan suspensi bakteri. Supernatan yang dihasilkan kemudian diuji aktivitas enzimnya dengan menggunakan metode *Dinitrosalicylic acid* (DNS) Miller (1956). Aktivitas selulase dinyatakan dengan Unit/mL di mana 1 unit enzim selulase merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah 1 µmoL glukosa dalam satu menit. Karakterisasi enzim selulase dilakukan dengan menentukan nilai aktivitas optimum enzim yang meliputi penentuan pH optimum, suhu optimum dan konsentrasi substrat optimum aktivitas enzim selulase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peremajaan Isolat dan Uji Zona Bening

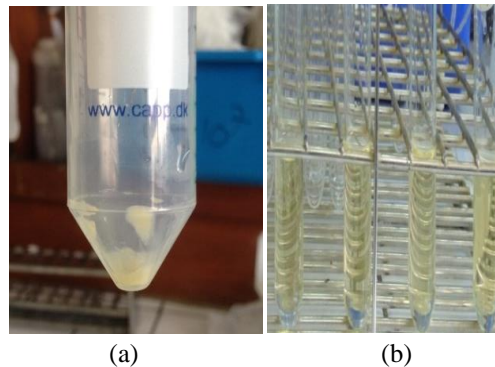
Peremajaan isolat dilakukan pada media selektif agar miring CMC 1%. Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik saluran pencernaan rayap *O.javanicus* secara kualitatif dapat diketahui dengan mengamati zona bening yang terbentuk dalam media CMC 1% (Gambar 1) yang merupakan media umum digunakan pada pengujian aktivitas selulase (Lee 2008). Seleksi bakteri selulolitik isolat BRO1 dilakukan dengan menentukan indeks selulolitik. Indeks selulolitik diperoleh dari perbandingan ukuran diameter koloni bakteri dan diameter zona bening yang terbentuk pasca inkubasi selama 24 jam melalui pewarnaan *congo red* 0,1%. Dari pengujian yang telah dilakukan isolat terpilih dengan kode BRO₁ memiliki nilai indeks selulolitik yaitu sebesar 0,75.



Gambar 1 Zona bening pada media CMC 1%, diinkubasi selama 24 jam dengan suhu ruang dan diwarnai *congo red* 0,1%.

Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Produksi ekstrak kasar enzim selulase yang dihasilkan dari saluran pencernaan rayap *O. javanicus* dilakukan dengan meremajakan isolat yang terpilih yakni BRO₁ dalam media agar miring CMC 1% ditunjukkan pada Gambar 2. Isolat bakteri kemudian ditubuhkan dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 24 jam. Isolat BRO₁ dikulturkan kedalam 100 mL media cair CMC 1% dan di shaker selama 24 jam dengan inkubasi suhu ruang.



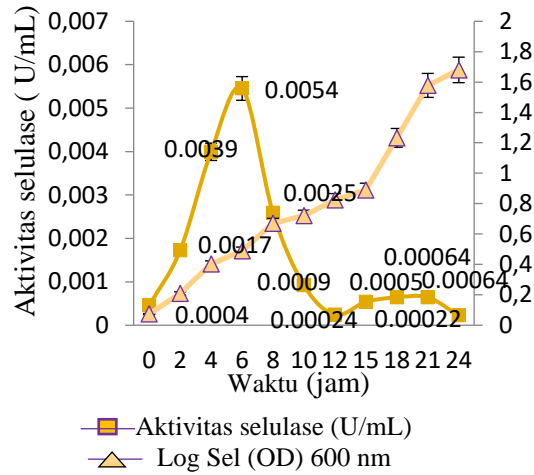
Gambar 2 Pemisahan suspensi bakteri dan supernatan ekstrak kasar enzim dengan proses sentrifugasi. (a) pelet bakteri, (b) supernatan ekstrak kasar enzim.

CMC pada media produksi berfungsi sebagai substrat dan sekaligus sebagai zat penginduksi. Ekstrak kasar enzim selulase diperoleh dengan memisahkan suspensi bakteri dengan supernatan sebagai enzim ekstrak kasar dengan melakukan sentrifugasi. Proses sentrifugasi dilakukan selama 30 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 6000 rpm. Hasil ekstrak kasar enzim selulase digunakan untuk karakterisasi enzim.

Pembuatan Kurva Tumbuh dan Kurva Aktivitas Selulase

Pengamatan pertumbuhan isolat bakteri dan aktivitas enzim selulase dilakukan mulai dari jam ke-0 dan jam ke 2 selanjutnya 3 jam hingga jam ke-24 ditunjukkan pada Gambar 3. Aktivitas enzim selulase menunjukkan puncak aktivitas pada jam ke-6 (0,0054 U/mL) dan mengalami penurunan pada saat kultur bakteri selulase pada jam ke-12 (0,0024 U/mL). Terlihat pula aktivitas enzim yang cenderung kembali naik pada jam ke-15 (0,0005 U/mL) sampai jam ke-21 sebesar (0,00064 U/mL) dan kembali mengalami denaturasi pada jam ke-24 sebesar (0,00022 U/mL). Waktu produksi tertinggi enzim terjadi pada jam ke-6 dan selanjutnya akan digunakan untuk mengkarakerisasi enzim selulase.

Bakteri selulolitik isolat BRO₁ yang diuji mampu tumbuh dengan baik pada media yang mengandung CMC 1% sebagai komponen inducernya. Kurva tumbuh bakteri didapatkan dengan menentukan waktu diinkubasi dan densitas optiknya (OD). Besarnya absorbansi yang diperoleh dilihat dari hasil pengukuran spektrofotometer dengan panjang gelombang 620 nm. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan metode DNS berdasarkan jumlah gula pereduksi sebagai hasil dari degradasi selulosa oleh selulase. Prinsip penentuan gula pereduksi menggunakan metode DNS adalah senyawa yang akan bereaksi dengan gula reduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang merupakan senyawa yang mampu menyerap kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang 540 nm (Sastrohadmidjojo 2005).



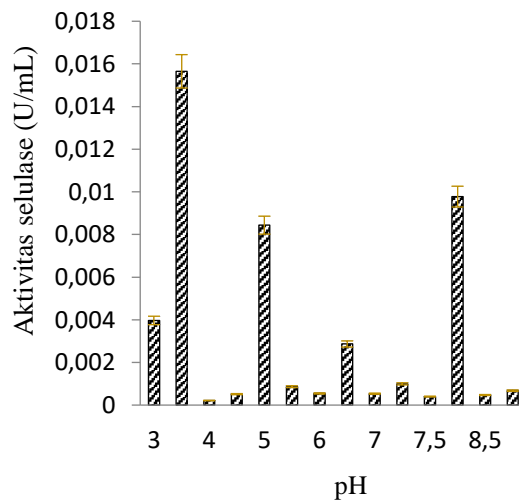
Gambar 3 Pertumbuhan bakteri dan aktivitas selulase dalam 100 mL media cair CMC 1% dengan inkubasi kultur pada suhu ruang selama 24 jam.

Isolat bakteri BRO₁ mempunyai puncak aktivitas selulase yang dicapai pada waktu optimum jam ke-6. Pertubuhan bakteri dilihat dari meningkatnya nilai absorbansi desinsitas optik dengan waktu inkubasi. Waktu optimum produksi enzim digunakan untuk inkubasi isolat pada pengujian tahap selanjutnya.

Karakterisasi Enzim Selulase

pH Optimum

Aktivitas enzim selulase ini mencapai puncak aktivitas tertinggi dengan pH optimumnya yakni pH 3,5 sebesar 0.015 U/mL. Aktivitas selulase isolat BRO₁ terlihat cukup tinggi pada pH 5 sebesar (0.008 U/mL) dan pH 8 (0.009 U/mL) ditunjukkan pada Gambar 4.

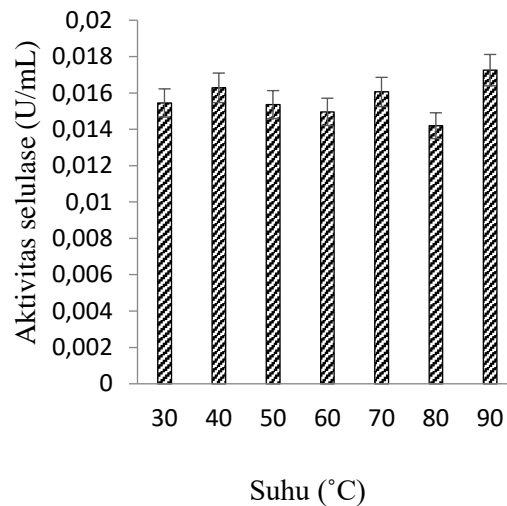


Gambar 4 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim isolat BRO₁ dengan menggunakan bufer sitrat (pH 3,0-5,5) bufer fosfat (pH 6,0-8,0) dan bufer Tris-HCl (pH 8,5-9.0).

Data pada hasil penelitian ini menunjukkan aktivitas isolat BRO₁ berada pada puncak aktivitas tertinggi yakni pH 3,5. Hal ini menunjukkan bahwa isolat BRO₁ memiliki pH optimum yang asam. Aktivitas selulase Isolat BRO₁ terlihat naik turun pada pH 5-8. Perubahan pH atau pH yang tidak sesuai akan menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim berubah. Selain itu perubahan pH juga menyebabkan denaturasi pada protein penyusun enzim itu sendiri (Murray *et al.*, 2003) sehingga menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Nilai pH optimum dari enzim yang sama dapat berbeda-beda tergantung pada substrat dan sumber enzim selulase tersebut (Sinaga 2013).

Suhu Optimum

Hasil pengujian pengaruh suhu terhadap aktivitas selulase isolat BRO₁ memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 90°C sebesar (0.017 U/mL) (Gambar 5). Aktivitas selulase BRO₁ terlihat naik turun pada berbagai suhu.



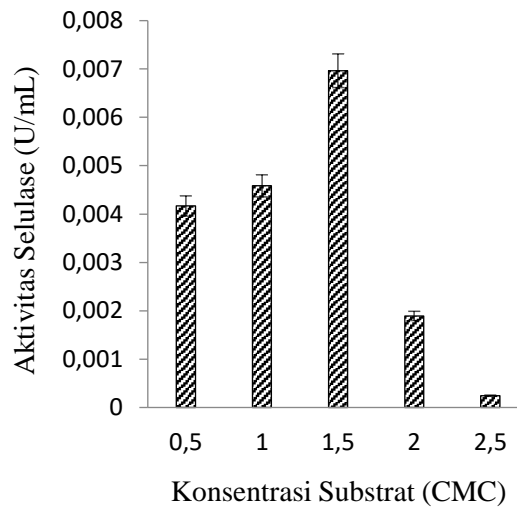
Gambar 5 Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim isolat BRO₁ di pH 3,5 pada media CMC 1%.

Aktivitas enzim isolat BRO₁ yang terlihat pada Gambar 5 menunjukkan adanya aktivitas selulase pada kondisi suhu 30°-90° C. Pada penelitian ini kondisi optimum enzim terhadap pengaruh suhu berada pada puncak aktivitas tertinggi yakni suhu 90° C. Enzim yang memiliki aktivitas pada suhu 50°-80° C disebut termoenzim dan aktivitas optimum diatas 80° C disebut hipertermoenzim (Baehaki *et al.*, 2004). Penelitian lain juga menunjukkan aktivitas yang sama terhadap isolat C5-1 (Meryandini, 2009), sehingga enzim selulase yang dihasilkan oleh isolat BRO₁ termasuk hipertermoenzim. Enzim selulase memiliki aktivitas optimum pada rentang suhu 50°-80° C yang dikenal sebagai termoenzim atau termostabil (tahan panas). Berdasarkan hal tersebut maka enzim selulase yang dihasilkan oleh BRO₁ termasuk dalam golongan enzim yang stabil pada suhu tinggi.

Uji Aktivitas Enzim Selulase Terhadap Pengaruh Konsentrasi Substrat

Aktivitas selulase isolat BRO₁ pada berbagai konsentrasi substrat dilakukan dengan menggunakan substrat selulosa murni yakni *Carbocymethyl cellulose* (CMC).

Aktivitas selulase optimum berada pada konsentrasi substrat 1,5% CMC dengan aktivitas sebesar (0.0069 U/mL).



Gambar 6 Pengaruh konsentrasi substrat CMC terhadap aktivitas enzim selulase isolat BRO₁ pada suhu 90° C dalam bufer sitrat pH 3,5.

Konsentrasi substrat terhadap aktivitas optimum enzim mencapai puncak tertinggi pada konsentrasi substrat 1,5% dengan aktivitas sebesar (0.006 U/mL). Aktivitas selulase ini lebih besar dibandingkan konsentrasi substrat 0,5-1 % berdasarkan kurva aktivitas yang terlihat pada Gambar 6. Besarnya konsentrasi substrat sebanding dengan besarnya aktivitas selulase, artinya pada konsentrasi substrat yang rendah aktivitas enzim selulasenya juga rendah dikarenakan sisi aktif enzim hanya sedikit mengikat substrat sehingga produk glukosa yang dihasilkan juga sedikit. Begitu juga dengan semakin meningkatnya konsentrasi substrat maka semakin bertambah pula produk glukosa yang dihasilkan.

Berdasarkan kurva yang terlihat pada konsentrasi substrat 0,5-1,5% terus mengalami peningkatan aktivitas, hingga terlihat aktivitas optimumnya berada pada konsentrasi substrat 1,5%. Walaupun aktivitas selulase yang dihasilkan oleh isolat BRO₁ optimum pada konsentrasi tersebut, tetapi peningkatan konsentrasi substrat diatas 1,5% tidak mampu meningkatkan aktivitas selulase, hal ini disebabkan hampir semua enzim telah membentuk kompleks enzim substrat, sehingga tidak terdapat lagi sisi aktif enzim yang bebas, saat sisi aktif pada enzim mulai berikatan dengan substrat maka kecepatan maksimum reaksi akan tercapai, namun setelah penambahan substrat selanjutnya tidak akan mempengaruhi reaksi (Nelson & Cox 2005). Simanjuntak (2013) menjelaskan bahwa semakin banyak konsentrasi substrat maka sisi aktif enzim yang berkontak dengan substrat juga semakin banyak, akibatnya semakin banyak selulosa yang dihidrolisis menjadi glukosa. Tingginya jumlah produk glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis selulosa oleh selulase dapat menurunkan aktivitas enzim.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa, Isolat BRO₁ memiliki potensi untuk mendegradasi selulosa dengan adanya aktivitas enzim selulase. Aktivitas enzim selulase isolat BRO₁ memiliki puncak aktivitas yang optimum pada jam ke-6 dengan aktivitas selulase sebesar (0.0054

U/mL). Isolat BRO₁ memiliki aktivitas pada kisaran pH 3-9 dan suhu 30°-90° C. Aktivitas enzim selulase Isolat BRO₁ optimum pada pH 3,5 memiliki aktivitas sebesar (0.015 U/mL) dan optimum pada suhu 90° C dengan aktivitas selulase sebesar (0.017 U/mL). Aktivitas selulase terhadap pengaruh konsentrasi substrat berada pada puncak aktivitas optimum dengan konsentrasi substrat CMC 1,5% dan memiliki aktivitas selulase sebesar (0.0069 U/mL).

DAFTAR PUSTAKA

- Baehaki A, Nurhayati T, Suhartono MT. 2014. Karakterisasi protease dari bakteri tanah rawa Indramayu, Sumatera Selatan. *J Teknol Indust Pangan*. 22 (2): 37-42.
- Kader AJ, Omar O. 1998. Isolation of cellulolytic fungi from Sayap-Kinabalu Park, Sabah. Serawak. ASEAN Review of Biodiversity and Enviromental Conservation. hlm 1-6.
- Kumar GS, Chandra MS, Sumanth Mn Vishnupriya A, Reddy BR, Choi YL. 2009. Cellulolitic Enzymes Production From Submerged Fermentation of Different Substrates by Newly Isolated *Bacillus* sp.. *J korean Soc Appl Biol Chem*. 52(1): 17-21.
- Lee Y. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*. 99: 378-386.
- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*. 31 : 426-428
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Ed ke-26. San Fransisco (US): McGraw-Hill.
- Nelson DL, Cox MM. 2005. *Principles of Biochemistry*. Ed ke-4. New York (US): Worth Publisher.
- Simanjuntak, MT. 2003. *Biokimia*. Sumatera Utara. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
- Sinaga RE. 2013. Karakterisasi enzim selulase dan aplikasinya pada substrat limbah pertanian [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.