LAPORAN AKHIR

PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

KARAKTERISASI BAKTERI SELULOLITIK ASAL JAWA DAN PERANANNYA DALAM MENDEGRADASI LIMBAH PERTANIAN

Jenis Kegiatan :

PKM Penelitian

Diusulkan oleh :

Nurhamida	G34051182 / 2005
Wahyu Wido Sari	G34103042 / 2004
Alowisiua-Tri Hartoyo L	G34103025 / 2004
Besty Maranatha	G34103032 / 2004
Aditya Sutrisna	G34062401 / 2006

Dibiaya oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Hibah
Program Kreativitas Mahasiswa
Nomor : 001/SP2H/PKM/DP2M/II/2008 tanggal 26 Februari 2008

INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2008

PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

1. Judul Kegiatan : Karakterisasi Bakteri Selulolitik Asal Jawa Dan Peranannya Dalam Mendegradasi Limbah Pertanian
2. Bidang Kegiatan : Penelitian
3. Ketua Pelaksana Kegiatan / Penulis Utama
   a. Nama Lengkap : Nurhamida
   b. NIM : G34051182
   c. Jurusan : Biologi
   d. Universitas/Institut/Politeknik : Institut Pertanian Bogor
   e. Alamat Rumah dan No HP : Jl. Raya Tribudisyukur Sumberjaya Lampung Barat 41352. No HP 08567752952
4. Anggota Pelaksana Kegiatan/Penulis : 5 orang
5. Dosen Pendamping
   a. Nama Lengkap dan Gelar : Dr. Anja Meryandini, M.S.
   b. NIP : 131663016
   c. Alamat Rumah Dan No Hp : Ciomas, Bogor. No HP 0811816576

Bogor, 21 September 2008

Menyetujui,

Ketua Jurusan/Program Studi

(Prof. Dr. Alex Hartana, M.Sc)
NIP.130516351

Ketua Pelaksana Kegiatan

(Nurhamida)
NIM. G34051182

Wakil Rektor Bidang
Akademik dan Kemahasiswaan,

(Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, MS)
NIP. 131473999

Dosen Pendamping

(Dr. Anja Meryandini, M.S.)
NIP. 131663016

KARAKTERISASI BAKTERI SELULOLITIK ASAL JAWA DAN PERANANNYA DALAM MENDEGRADASI LIMBAH PERTANIAN

NURHAMIDA, WAHYU WIDOSARI, ALOWISIUS TRI HARTOYO LEMA, BESTY MARANATHA, ADITYA SUTRISNA

Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Gedung Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Lt. 5, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Jawa Barat

ABSTRAK

Limbah pertanian berupa selulase dan hemiselulase merupakan masalah penting di Indonesia, hal ini disebabkan kandungan material selulosa yang melimpah namun sulit didegradasi. Diperlukan enzim selulase dengan aktivitas tinggi yang dapat diambil dari bakteri selulolitik untuk mendegradasi limbah tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mangetahui keragaman karakter dari isolat-isolat bakteri selulolitik dari Jawa.

Enam isolat bakteri dikarakterisasi enzim seluase yang meliputi suhu dan pH optimum serta substrat yang sesuai. Isolat C4-4 memiliki pH optimum 5, suhu optimum 70 °C, dan avisel sebagai substrat yang sesuai. Isolat C5-1 memiliki pH optimum 3.5, suhu optimum 90 °C, dan CMC sebagai substrat yang sesuai. Isolat C5-3 memiliki pH optimum 5, suhu optimum 80 °C, dan filter paper sebagai substrat yang sesuai. Isolat C11-1 memiliki pH optimum 8, suhu optimum 70 °C, dan CMC sebagai substrat yang sesuai. Isolat KBM 2 memiliki dua waktu produksi enzim tertinggi yaitu pada umur kultur 3 hari dan 6 hari, memiliki pH optimum 7 dan suhu optimum 50 °C pada umur kultur 3 hari, memiliki pH optimum 5 dan suhu optimum 30 °C pada umur kultur 6 hari. Substrat yang sesuai untuk KBM 2 ialah CMC. Isolat KBM 4 memiliki pH optimum 7, suhu optimum 50 °C, dan CMC sebagai substrat yang sesuai.

Isolat-isolat C4-4, C5-1, dan C-11 di uji viabilitasnya pada bahan pembawa yaitu gambut. Selulase kultur isolat–isolat tunggal maupun campuran menunjukan kemampuan selulolitik yang tinggi terhadap substrat CMC hasil ini menunjukan bahwa ketiga isolat yang dicampurkan mampu hidup bersama dengan memanfaatkan CMC sebagai sumber karbonnya, aktivtas selulase tertinggi diperloleh oleh isolat C-44 + C-11 yaitu 0.0364 nkat/ml. langkah selanjutnya adalah ,melakukan uji stabilitas terhadap tiga isolat tersebut hasilnya adalah isolate C-44 memiliki aktivitas tertinggi pada jam ke-0 sebesar 0.034 nkat/ml sedangkan C-11 dan C5-1 memiliki aktivitas tertinggi pada jam ke-2 sebesar 0.064 nkat/ml dan 0.043 nkat/ml.

Kata kunci : *Selulase, Karakterisasi, Viabilitas*

PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara agraris dan terletak di daerah tropis. Sebagai negara tropis, Indonesia memiliki biodiversitas yang sangat tinggi, baik tumbuhan maupun mikroorganismenya. Kesuburan tanah tidak hanya berdasar pada komposisi kimianya, tetapi juga dipengaruhi oleh kualitas dan kuantitas mikroorganisme alami yang mendiami tanah tersebut (Rao 1995). Mikroorganisme yang mendiami tanah dapat digolongkan ke dalam bakteri, aktinomiset, fungi, alga dan protozoa. Dimana bakteri mendominasi habitat tanah dan mungkin separuh dari biomassa seluruh mikrob di tanah.

Lignoselulosa terdiri atas tiga polimer yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin. Beragam bakteri dan fungi dapat memecah makromolekul tersebut menggunakan enzim hidrolitik (contohnya enzim selulase) atau oksidatif. Lignoselulosa di alam didapat dari kayu, rumput, limbah pertanian, sampah hutan dan limbah padat. Dengan demikian sangat dimungkinkan ditemukannya bakteri selulolitik pada tanah pertanian. Mikroorganisme penghasil selulase dari kelompok bakteri memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi selulase menjadi lebih pendek (Alam *et al.* 2004). Cendawan diketahui paling baik dalam mendegradasi selulosa, tetapi bakteri menjadi pilihan utama, hal ini dikrenakan bakteri memiliki memilki ukuran molekul selulase yang lebih kecil dibandingkan dengan cendawan sehingga lebih mudah untuk berdifusi kejaringan tumbuhan yang mengandung selulosa (Li & Gao 1997).

Berbagai metode untuk mendaur lignoselulosa, berdasar pada enzimologi pendegradasian selulosa, hemiselulosa- dan lignin telah dianjurkan. Beberapa diantaranya pengomposan dan produksi etanol yang bernilai ekonomi (Perez *et al.* 2002).

Enam isolat bakteri selulolitik asal Jawa yang diduga memiliki potensi dalam pengomposan maupun pendegradasian limbah pertanian. Keenam isolat tersebut mampu hidup pada suhu 50 °C. Oleh karena itu perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut dan pengujian terhadap proses pengomposan dan pendegradasian limbah pertanian seperti sampah pasar, jerami, tongkol jagung, kulit cokelat dan lain sebagainya. Selain itu dilakukan uji viabiltas dan stabilitas terhadap 3 isolat bakteri yaitu C-44, C5-1, dan C-11. Suatu bahan pembawa diperlukan untuk menginokulasi isolat-isolat bakteri yang berpotensial mendegradasi selulosa dalam skala laboratorium ke lapangan khususnya untuk dekomposisi limbah pertanian, bahan pembawa yang biasa digunakan adalah gambut, oleh karena itu perlu dilakukan uji viabilitas terhadap bahan pembawa yaitu gambut (Premono & Widyastut 1994).

METODE PELAKSANAAN PROGRAM

Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Februari-Juli 2008, bertempat di Laboratorium Bioteknologi Hewan dan Biomedis PPSHB LPPM Institut Pertanian Bogor.

Metode

Peremajaan isolat

Isolat koleksi hasil penelitian terdahulu yang diduga memiliki potensi diremajakan pada media agar-agar CMC 1 % (1 g CMC, 0,02 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,075 g KNO_3; 0,05 g K_2HPO_4; 0,002 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,004 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,2 g *yeast extract*; 1,5 g agar-agar bacto, dan 0,1 g glukosa dalam 100 ml media) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam untuk bakteri dan 4 hari untuk aktinomiset. Hasil peremajaan tersebut digunakan untuk penentuan kurva tumbuh dan kurva aktivitas selulase.

Pengukuran aktivitas enzim selulase harian

Bakteri yang sudah diremajakan diinokulasikan sebanyak dua lup penuh ke dalam 100 ml media CMC 1 % cair dan diinkubasi dalam inkubator bergoyang dan aktinomiset diinokulasi sebanyak 5 *cock bor*. Setiap 24 jam sekali dilakukan pengukuran kekeruhan sel dan aktivitas selulase. Waktu produksi enzim dengan aktivitas tertinggi digunakan sebagai waktu penen enzim untuk karakterisasi selanjutnya.

Enzim selulase ekstrak kasar didapat dengan mensentrifugasi hasil kultur pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Aktivitas selulase diukur menggunakan metode Miller (1959) (Lampiran 1) dengan cara menambahkan enzim ekstrak kasar sebanyak 1 ml dalam substrat CMC 1 % pada 0,2 M bufer fosfat pH 7, diinkubasi pada suhu 50 °C selama 60 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2 ml asam dinitro salisilat (DNS) dan dididihkan selama 15 menit, kemudian didinginkan sampai suhu ruang dan diukur pada panjang gelombang 540 nm. Jumlah gula yang diproduksi ditentukan dengan standar glukosa. Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol glukosa dalam satu menit.

Kadar protein diukur menggunakan metode Bradford (1976), dengan cara mencampurkan 0,1 ml enzim ekstrak kasar dengan 5 ml reagen Bradford, dikocok kuat-kuat, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Standar protein yang digunakan adalah *bovin serum albumin* (BSA).

Aktivitas spesifik enzim dihitung dari nilai aktivitas selulase dibagi dengan kadar proteinnya.

Karakterisasi enzim

Karakterisasi enzim selulase meliputi penentuan pH dan suhu optimum serta substrat yang sesuai.

Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas selulase pada substrat CMC 1 % dalam berbagai pH (pH 3 sampai dengan pH 9 dengan selang 0,5 unit) menggunakan bufer sitrat fosfat (pH 3-5,5), bufer fosfat (pH 6-8).

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas selulase pada berbagai suhu (30 °C sampai dengan 90 °C dengan selang 10 °C) dalam substrat CMC 1 % dalam bufer pH optimum dan inkubasi selama 30 menit.

Penentuan susbtrat yang paling sesuai dilakukan dengan cara menguji aktivitas selulase pada berbagai substrat (CMC, avisel, Whattman paper) dalam bufer dengan pH optimum dan diinkubasi pada suhu optimum.

Pengujian aktivitas enzim pada berbagai substrat

Prosedur yang dilakukan dalam tahap ini adalah sebanyak 5 ml substrat CMC Sigma, CMC Daisel dan avicel ditambahkan 5 ml enzim ekstrak kasar. Untuk substrat kertas saring, sebanyak 2.5 potong kertas saring 1 x 6 cm^2 ditambahkan 2.5 ml bufer dan 5 ml enzim ekstrak kasar. Reaksi antara substrat dan enzim ekstrak kasar dilakukan di dalam Erlenmeyer 100 ml selama 60 menit pada suhu optimum. Setelah itu, reaksi dihentikan dengan menambahkna 50 µl NaOH 0.2 M atau dengan menginkubasinya pada suhu 100 °C. Untuk substrat CMC Sigma dan Daisel, campuran substrat-enzim dipindahkan sebanyak 2 ml ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 ml DNS dan segera diinkubasi pada suhu 100C. Sebanyak 1 lembar kertas saring 1 x 6 cm^2 dan 3 ml larutannya (enzim ekstrak kasar dan bufer) dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml DNS kemudian segera diinkubasi pada suhu 100 °C. Setelah inkubasi campuran substrat avicel, jerami padi, tongkol jagung dan kulit pisang dengan enzim selesai segera ditambahkan 50 µl NaOH 0.2 M. Lalu suspensi tersebut disentrifus pada kecepatan 2500 rpm selama 25 menit. Sebanyak 2 ml supernatannya diambil dan ditambahakan 2 ml DNS kemudian segera diinkubasi pada suhu 100 °C. Seluruh sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Perlakuan pada substrat CMC Sigma dan Daisel, avicel, kertas saring, dan substrat limbah pertanian berbeda karena tidak semua substrat tersebut larut dalam bufer. Konsentrasi substrat tiap Erlenmeyer adalah 1% (b/v) kecuali avicel 2 % (b/v). Suhu inkubasi substrat-enzim serta pH larutan bufer disesuaikan dengan jenis isolat yang digunakan. Uji aktivitas enzim selulase pada berbagai substrat setiap isolat dilakukan secara duplo dan dua ulangan dengan menggunakan metode Miller (1959) yang telah dimodifikasi.

Viabilitas isolat terhadap gambut sebagai bahan pembawa

Bakteri selulolitik terpilih diuji ketahanan hidupnya pada media pembawa yaitu gambut. Bakteri diinokulasikan baik tunggal maupun konsorsium (campuran) pada media gambut, dan diuji tiap seminggu sekali.

Pengujian viabilitas dibandingkan dengan pertumbuhan bakteri yang dibuat konsorsium (campuran beberapa isolat) pada media produksi CMC *broth* 1 % di erlenmeyer. Bahan pembawa gambut yang akan diukur pH-nya dengan menggunakan pH-H_2O (1:10). Selanjutnya sebanyak 150 gram gambut dimasukkan ke dalam botol volume 300 ml dan disterilkan dengan panas lembab 121 °C 1 atm selama 15 menit.

Kultur biakan isolat tungal maupun kombinasi disiapkan dalam erlenmeyer yang masing-masing digoyang selama 2-3 hari. Sebanyak 30 ml kultur isolat diinokulasikan secara aseptik ke dalam gambut kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 8 minggu.

Viabilitas populasi bakteri dari isolat-isolat bakteri tersebut di dalam gambut diamati setiap dua minggu dengan metode kuantitatif cawan hitung. Percobaan disusun dengan tiga kali ulangan.

Pengujian stabilitas enzim pada kondisi optimumnya

Enzim ekstrak kasar isolat terpilih diuji kestabilannya pada suhu optimum inkubasinya dengan cara menyimpan enzim pada *waterbath* dengan suhu optimum inkubasi dan diukur aktivitasnya tiap 2 jam sekali, kestabilan diukur sampai aktivitas nol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peremajaan isolat

Keenam isolat bakteri yaitu C4-4, C5-1, C5-3, C11-1, KBM 2 dan KBM 4 yang ditumbuhkan pada media agar-agar CMC masing-masing memiliki ciri-ciri yang berrbeda. KBM2 dan KBM 4 merupakat aktinomiset, memperhatikan warna spora yang berbeda dan KBM 2 menghasilkan pigmen terdifusi berwarna kuning kecoklatan.

Isolat-isolat selulolitik memperhatikan kemampuan menghasilkan selulase dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni pada media CMC dengan pewarnaan merah kongo 0.1%.

Pengukuran aktivitas enzim selulase harian

Pertumbuhan isolat bakteri selulotik ditunjukkan adanya perubahan jumlah sel. Dari pengukuran tersebut didapatkan puncak pertumbuhan isolat C4-4 pada hari ke-5, C5-1 pada hari ke-6, C5-3 pada hari ke-6, dan C11-1 pada hari ke-3. Isolat KBM 2 dan KBM 4 merupakan bakteri berfilamen, kurva pertumbuhan untuk isolat ini tidak dapat dibuat dengan cara mengukur kepekatan sel.

Produksi selulase ekstraseluler tertinggi masing-masing isolat tercapai pada hari ke-3 dengan aktivitas 0.534 nkat/ml (C4-4), hari ke-5 dengan aktivitas 1.818 nkat/ml (C5-1), pada hari ke-4 dengan aktivitas 0.179 nkat/ml (C5-3), pada hari ke-4 dengan aktivitas 0.639 nkat/ml (C11-1), pada hari ke-3 dan ke-6 dengan aktivitas 0.739 nkat/ml (KBM 2), dan hari ke-5 dengan aktivitas 1.227 nkat/ml (KBM 4) Masing-masing isolat memiliki aktivitas spesifik harian tertinggi sebesar 4.64 nkat/mg (C4-4), 2.58 nkat/mg (C5-1), 5.58 nkat/mg (C5-3), 6.96 nkat/mg (C11-1), 6.13 dan 5.71 nkat/mg (KBM 2) dan 23.42 nkat/mg (KBM 4).

Tabel 1 Pertumbuhan isolat C4-4, C5-1, C5-3, dan C11-1 sampai 7 hari inkubasi

Isolat	Jumlah sel pada hari ke-(x 10^8)					
	2	3	4	5	6	7
C4-4	3.35	3.95	4.18	**4.51**	4.28	<30
C5-1	0.51	0.54	0.57	0.59	**0.61**	0.57
C5-3	5.18	**5.47**	4.96	4.91	5.40	5.11
C11-1	2.82	**3.51**	3.51	2.59	3.34	<30

<30: tidak memenuhi rentang statistik penghitungan koloni (30-300)

Tabel 2 Aktivitas selulase harian yang diuji pada 0.2 M buffer fosfat pH 7 dan suhu inkubasi 50 °C

Isolat	Aktivitas (nkat/ml) pada hari ke-					
	2	3	4	5	6	7
C4-4	0.270	**0.534**	0.512	0.410	0.189	-
C5-1	0.016	0.088	0.096	**0.116**	0.079	0.019
C5-3	0.005	0.152	**0.179**	0.122	0.109	0.021
C11-1	0.444	0.424	**0.639**	0.509	0.281	-
KBM 2	0.495	**0.738**	0.546	0.509	**0.669**	0.457
KBM 4	0.660	1.023	0.913	**1.447**	0.979	0.846

(-): tidak dilakukan pengukuran

Karakterisasi enzim

Pengaruh pH pada keenam isolat diuji pada masing-masing hari aktivitas tertingginya. Isolat C4-4 mencapai aktivitas tertinggi pada pH 5 (0.542 nkat/ml), Isolat C5-1 pada pH 3.5 (0.146 nkat/ml), Isolat C5-3 pada pH 5 (0.282 nkat/ml), Isolat C11-1 pada pH 8 (0.401 nkat/ml dengan bufer fosfat dan 0.596 dengan bufer tris-HCl), Isolat KBM 2 pada pH 7 dan pH 5 (0.628 nkat/ml dan 0.490 nkat/ml), dan KBM 4 pada pH 7 (0.783 nkat/ml).

Aktivitas spesifik tertinggi pada pH optimum ialah 3.95 nkat/mg (C4-4), 3.74 nkat/mg (C5-1), 7.84 nkat/mg (C5-3), 3.01 dan 4.44 nkat/mg dengan bufer fosfat dan bufer tris-HCl (C11-1), 4.36 nkat/mg dan 3.15 nkat/mg (KBM 2) dan 7.65 nkat/mg (KBM 4).

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim pada pH optimum dilakukan dengan mengujinya pada berbagai suhu (30 °C sampai 90 °C dengan selang 10 °C). Isolat C4-4 mencapai aktivitas tertinggi pada suhu 70°C dengan aktivitas 0.663 nkat/ml, isolat C5-1 pada suhu 90 °C (0.426 nkat/ml), isolat C5-3 pada suhu 80 °C (0.023