

Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Selulase Ekstremofil dari Ekosistem Air Hitam

Isolation and Selection of Extremophilic Cellulase Producing Bacteria Isolated from Black Water Ecosystem

FIKRINDA^{1,2}, ISWANDI ANAS², TRESNAWATI PURWADARIA³ & DWI ANDREAS SANTOSA^{2*}

¹Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh 23111

²Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran 1, Bogor 16144; dan Indonesian Center for Biodiversity and Biotechnology, Jalan R.E. Martadinata 8, Bogor

³Balai Penelitian Ternak Ciawi, Bogor 16002

The cellulolytic bacteria are potential organisms for biotechnological applications such as in decomposition of lignocellulose materials and enzyme technology. The black water ecosystem is a unique ecosystem because of its high diversity of flora, fauna, and microbes. The aims of this experiment were to isolate cellulolytic bacteria from the ecosystem of black water and to select their ability to grow at the extrem conditions (low and high pHs and high temperature). The total number of cellulolytic bacteria isolated at 30°C with pH 4 or 7 and at 50°C with pH 4 or 7 was 1.263. In further screening at higher temperatures, 30 bacteria were obtained at 60°C while at 70°C only 16 bacteria were selected. The isolates were further screened at different pH based on their optimal growth temperature, and they were able to grow at pH 3-11. Besides bacteria that grow at normal temperature (4-40°C) and at pH neutral (5-8.5) there at high temperatures (60 and 70°C) and low and high pHs (3 and 10, 11) showing that there are high diversity in the ecosystem of black water.

Key words: cellulolytic bacteria, black water ecosystem, extreme condition

Selulosa sebagai senyawa paling banyak di bumi tersusun atas 8 000-12 000 unit glukosa yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4-glukosida. Ikatan β -1,4-glukosida pada serat selulosa dapat dipecah menjadi monomer glukosa oleh selulase, yaitu suatu sistem enzim yang terdiri atas tiga tipe enzim utama yaitu endo-1,4- β -glukanase (EC 3.2.1.1); ekso-1,4- β -glukanase (EC 3.2.1.91) atau selobiohidrolase; dan β -D-glukosidase (EC 3.2.1.21).

Produksi selulase dalam teknologi enzim memerlukan bakteri, aktinomiset maupun cendawan, yang menghasilkan enzim ekstrasel. Meskipun berasal dari lingkungan normal (suhu >4°C atau <40°C dan pH >5 atau <8.5) mikroba selulolitik ada yang mampu menghasilkan selulase yang dapat beraktivitas pada lingkungan ekstrem dan enzim tersebut dapat digunakan dalam banyak aplikasi bioteknologi (Busto *et al.* 1995) seperti sakarifikasi bahan berselulosa, deterjen, industri makanan, dan pengolahan limbah pabrik kertas (Akiba *et al.* 1995).

Kondisi lingkungan ekstrem seperti suhu tinggi, pH rendah dan tinggi, serta kadar garam yang tinggi dapat mempengaruhi baik pertumbuhan mikroba maupun aktivitas enzim yang terlibat. Lingkungan dengan pH rendah merupakan salah satu faktor ekstrem yang dijumpai pada ekosistem air hitam yang didefinisikan sebagai sungai maupun danau yang memiliki air

berwarna hitam jernih, tidak berbau, terbentuk melalui proses alamiah yang berlangsung ribuan tahun, kaya bahan organik, dan dipengaruhi baik langsung maupun tidak langsung oleh lahan gambut (Santosa 1998). Meskipun memiliki kondisi lingkungan yang ekstrem, berbagai mikroba berpotensi telah ditemukan mampu tumbuh pada ekosistem air hitam, seperti bakteri perombak minyak bumi dan solar (Saidi *et al.* 1999) dan bakteri pengoksidasi besi dan sulfur (Nurseha 2000).

Tujuan penelitian ini mengisolasi bakteri penghasil selulase dari ekosistem air hitam dan menguji kemampuan tumbuhnya pada kondisi ekstrem.

BAHAN DAN METODE

Sumber Isolat. Isolasi bakteri dilakukan dari tanah atau sedimen yang berasal dari ekosistem air hitam Sungai Ahas, Danau Bunter Besar, Bubut, Bakuta, Balida, Buntal, Dadahup, Geritik, Naning, saluran outlet Mengkatip, Danau Panjang Besar, Sungai Purun, Danau Rantau Bujur, saluran induk primer, Sungai Jaya, Tambak Bajai, dan Telukung Punai di Kabupaten Barito Selatan, Kalimantan Tengah.

Sumber Karbon. Sumber karbon yang digunakan ialah 0.5% carboxymethyl cellulase (CMC) (DS 0.7-0.8 dari BDH Chemicals Pty. Ltd., Australia) atau 0.5% Sigmacell 20 (Sigma Chemical Co., USA).

* Penulis untuk korespondensi, Tel. 62-251-319689, Fax. 62-251-782275, E-mail: dsantosa@indo.net.id

Isolasi dan Seleksi Bakteri. Media untuk mengisolasi bakteri ialah media Paul Marjanoff (PM) yang telah dimodifikasi (Purwadaria 1988). Media isolasi disiapkan pada cawan petri dan terdiri atas dua lapisan, lapisan bawah hanya berupa media PM tanpa sumber karbon, sedangkan lapisan atas berupa media PM dengan sumber karbon Sigmacell-20 (Purwadaria *et al.* 1994). Inkubasi untuk mendapatkan isolat selulolitik tersebut dilakukan pada dua perlakuan suhu (30 dan 50°C) dan masing-masing perlakuan tersebut mendapat dua perlakuan pH 4 dan 7 sehingga diperoleh empat kombinasi.

Seleksi dilakukan berdasarkan nisbah zona bening terhadap diameter koloni pada media PM bersumber karbon CMC dengan menginkubasikan setiap isolat terpilih dari keempat kombinasi perlakuan yang dicobakan selama 48 jam. Setelah masa inkubasi berakhir dilakukan pewarnaan *congo red* 0.1% untuk memperjelas zona bening yang terbentuk (Teather & Wood 1982) dan dihitung nisbah antara diameter zona bening media terhadap diameter koloni bakteri. Isolat terpilih selanjutnya diseleksi lebih lanjut berdasarkan suhu dan pH yang dilakukan untuk kedua sumber karbon (CMC atau Sigmacell-20) dengan menginkubasikan setiap isolat selama 48 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 280 contoh tanah atau sedimen yang diisolasi pada berbagai perlakuan pH dan suhu media bersumber karbon diperoleh isolat yang diduga merupakan bakteri selulolitik (Tabel 1). Dari hasil isolasi pada ekosistem air hitam Kalimantan Tengah yang memiliki pH tanah 2.5-5.0 ini diperoleh kelompok bakteri selulolitik yang mampu tumbuh pada suhu 50°C dan pH 7 dalam jumlah lebih banyak dibandingkan dengan kelompok bakteri yang mampu tumbuh pada suhu 30°C dan pH 4. Pada contoh tanah sulfat masam dan tanah mineral terisolasi kelompok bakteri selulolitik pada suhu 50°C dan pH 4 dalam jumlah lebih banyak, sedangkan pada contoh tanah gambut lebih banyak terisolasi isolat yang mampu tumbuh pada suhu 50°C dan pH 7.

Beragamnya kelompok bakteri (termotoleran atau asidofil) yang mampu tumbuh pada ekosistem air hitam tersebut menunjukkan tingginya daya dukung ekosistem air hitam Kalimantan Tengah bagi kehidupan mikrob berpotensi. Selain itu, hal tersebut juga mengungkapkan bahwa suhu dan pH lingkungan tidak selalu membatasi isolat untuk beraktivitas di luar kondisi lingkungannya. pada penelitian terdahulu bakteri ekstremofil dari kelompok asidofil, alkalofil, dan termofil (Santosa 1998) ekosistem air hitam telah berhasil mengisolasi. Dari hasil seleksi isolat selulolitik pada media bersumber karbon CMC terpilih 30 isolat yang tersebar pada 13 contoh.

Tiga puluh isolat bakteri terpilih yang berasal dari berbagai perlakuan pH dan suhu tersebut mampu menunjukkan aktivitas selulolitiknya, terutama pada media bersubstrat CMC pada suhu 60°C dan hanya 16 isolat untuk perlakuan suhu 70°C, Delapan isolat dari perlakuan suhu tersebut bersifat mesofil, 9 isolat termotoleran, dan 13 isolat termofil (Tabel 2). Meskipun

Tabel 1. Penyebaran bakteri selulolitik pada ekosistem airhitam.

Asal Sampel	pH	Jumlah Sampel ¹		30°C		50°C	
		Jumlah	Jumlah	4	7	4	7
Sulfat masam							
Sungai Ahas (Ah)	3.0	12	10	10	3	31	58
Dadabup (Dh)	3.0	10	5	14	5	37	5
Telukung Punai (Tp)	2.5	6	6	15	8	30	14
Total		28	21	39	16	98	77
Gambut							
Danau Bunter Besar (Bb-1)	3.0	18	6	30	21	3	15
Danau Bubut (Bb-2)	3.0	27	18	35	25	5	22
Danau Belanga (Bg)	3.0	15	12	32	34	8	38
Danau Balida (Bl)	3.0	20	15	20	26	9	25
Danau Buntal (Db)	3.0	35	15	6	21	20	34
Danau Geritik (Gr)	3.0	15	7	5	20	3	8
Danau Naning (Nn)	3.0	16	9	29	42	11	20
Saluran Outlet Mengkatip (Om)	3.0	8	6	5	6	6	28
Danau Panjang Besar (Pb)	3.0	15	8	3	11	28	31
Sungai Purun (Pr)	3.0	30	18	8	35	2	64
Danau Rantau Bujur (Rb)	3.0	22	15	3	42	17	34
Saluran Induk Primer (Si)	3.0	19	10	8	29	0	14
Total		240	139	184	312	112	333
Tanah Mineral							
Bakuta (Bk)	5.0	4	2	0	1	0	1
Sungai Jaya (Sj)	5.0	5	4	20	19	25	2
Tambak Bajai (Tb)	5.0	3	2	1	5	6	0
Total		12	8	21	25	31	3

¹sampel uji, ²sampel yang mengandung isolat bakteri selulolitik.

Tabel 2. Aktivitas selulolitik kualitatif isolat pada media bersubstrat CMC atau Sigmacell-20 pada suhu 60 dan 70°C.

Kode Isolat*	Suhu Awal (°C)	60°C		70°C	
		CMC	Sigmacell	CMC	Sigmacell
		Nisbah	TK**	Nisbah	TK**
Nn-326-I ₆	30	3.0	0	15.0	0
Ah-46-II ₁	50	11.0	3	5.0	0
Bb-297-II ₁₀	50	4.0	2	-	0
Bg-248-II ₁₃	50	7.0	2	-	0
Bg-259-II ₁	50	20.0	2	-	0
Pb-139-II ₅	50	7.5	0	-	0
Pb-144-II ₅	50	3.0	2	5.0	2
Pb-144-II ₆	50	3.3	0	10.0	2
Pb-154-II ₇	50	4.0	2	2.0	2
Rb-264-II ₁	50	4.0	1	-	0
Ah-44-III ₁	30	3.3	0	4.0	0
Db-352-III ₁	30	1.7	3	-	0
Dh-14-III ₂	30	2.0	3	2.0	0
Gr-134-III ₁	30	5.5	1	-	0
Nn-329-III ₁	30	10.0	1	-	0
Om-344-III ₅	30	3.0	2	-	0
Sj-59-III ₁	30	6.5	4	-	0
Sj-338-III ₁	30	5.0	1	-	0
Sj-338-III ₅	30	4.0	1	-	0
Sj-339-III ₅	30	2.0	1	-	0
Ah-36-IV ₁₂	50	14.0	2	17.5	0
Ah-42-IV ₁	50	10.0	3	-	0
Bb-304-IV ₃	50	2.0	1	4.53	0
Bg-248-IV ₁₇	50	18.0	1	2.67	0
Bk-52-IV ₁	50	4.0	1	4.4	0
Nn-314-IV ₂	50	4.0	1	2.05	0
Om-344-IV ₅	50	4.0	2	1.71	2
Pb-149-IV ₂	50	1.8	4	1.67	0
Pb-154-IV ₃	50	6.0	2	6.5	0
Rb-269-IV ₇	50	20.0	4	1.9	0

*I: pH 4, 30°C; II: pH 4, 50°C; III: pH 7, 30°C; IV: pH 7, 50°C; **TK; tingkat kejernihan: 0 (tidak jelas); 1 (kurang jelas); 2 (agak jelas); 3 (jelas); 4 (sangat jelas); - : tidak ada aktivitas

tidak memiliki nisbah zona bening tertinggi pada substrat CMC, namun isolat Pb-149-IV₂ dan Sj-59-III₃ mampu merombak selulosa kristal tertinggi. Sebaliknya dengan isolat Bg-248-IV₇ yang memiliki aktivitas tertinggi pada media bersumber karbon CMC. Isolat Rb-269-IV₇ merupakan isolat selulolitik istimewa yang mampu tumbuh pada suhu 69°C karena isolat tersebut mampu menunjukkan aktivitas terbaiknya pada kedua sumber karbon (CMC dan Sigmacell-20). Tingginya aktivitas isolat terhadap sumber karbon yang dicobakan untuk perlakuan suhu dibandingkan dengan aktivitasnya pada suhu awal isolasinya menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki enzim termofil. Umumnya isolat terpilih yang ditumbuhkan pada suhu 70°C memiliki kemampuan selulolitik yang rendah dibandingkan dengan pada suhu 60°C.

Kemampuan membentuk zona bening pada substrat amorf seperti CMC menunjukkan adanya enzim endo- β -1,4-glukanase (CMC-ase) yang dapat memutuskan ikatan β -1,4 glikosida pada serat selulosa tersebut secara acak (Enari 1983) dan banyaknya daerah amorf pada substrat tersebut menyebabkan CMC dapat dihidrolisis dengan lebih efisien (Goto *et al.* 1992). Tingginya aktivitas spesifik enzim ini ditandai dengan tingginya nisbah diameter zona bening terhadap diameter koloni isolat yang ditumbuhkan pada media agar-agar bersumber karbon CMC. Kemampuan isolat bakteri terseleksi tersebut menjernihkan substrat CMC tidak selalu diiringi dengan kemampuannya menjernihkan selulosa kristal. Begitu pula sebaliknya, meskipun untuk keberhasilan hidrolisis selulosa secara efisien diperlukan aksi sinergi enzim yang bekerja pada selulosa amorf dan selulosa kristal seperti Sigmacell-20 yang merupakan salah satu sumber karbon yang memiliki kristalinitas yang tinggi. Tingginya kemampuan isolat merombak sumber karbon tersebut ditunjukkan oleh kemampuan isolat menguraikan butir sigmasel sehingga media pertumbuhan isolat menjadi jernih.

Dengan tidak mengurangi pentingnya peranan endoselulase/CMC-ase, enzim yang mampu menghidrolisis kristal ini menjadi penting karena kristalinitas selulosa merupakan penghambat utama dalam hidrolisis selulosa alami. Beldman *et al.* (1987) dan de Coninck-Chosson (1988) menyatakan bahwa kristalinitas selulosa merupakan faktor utama yang menentukan penguraian selulosa secara hayati oleh enzim selulolitik sehingga mikrob yang memiliki kemampuan menghidrolisis kristal yang tinggi berpotensi menghidrolisis selulosa yang terdapat di alam.

Hasil penelitian ini menemukan hanya empat isolat (Ah-46-II₁, Sj-59-III₃, Ah-42-IV₁, dan Rb-269-IV₇) (Tabel 2) yang menunjukkan aktivitas selulolitiknya pada suhu 60°C dengan nisbah diameter zona beningnya berada pada kisaran 6.5-20 dan tingkat kejernihan pada sumber karbon Sigmacell-20 yang tinggi (jelas dan sangat jelas). Meskipun memiliki pertumbuhan yang lebih baik pada suhu awal isolasinya (bersifat mesofil dan termotoleran), keempat isolat tersebut memiliki aktivitas selulolitik lebih baik pada suhu yang lebih tinggi (60 dan 70°C) sehingga enzim yang dihasilkannya bersifat termofil. Dari kedua perlakuan suhu tersebut terlihat bahwa setiap isolat memiliki

suhu pertumbuhan tersendiri untuk memberikan aktivitas terbaiknya. Dari perlakuan suhu tersebut juga ditemukan isolat termofil (memiliki pertumbuhan yang lebih baik pada suhu 60 dan 70°C) seperti Pb-144-II₅, Pb-144-II₆, Pb-154-II₇, Dh-14-III₂, Bb-304-IV₈, Om-344-IV₅, dan Pb-149-IV₂, namun dari ketujuh isolat termofil terseleksi tersebut hanya Pb-154-II₇ dan Bb-304-IV₈ yang memiliki aktivitas lebih tinggi pada kedua perlakuan suhu termofil tersebut. Sebaliknya, dari beberapa isolat mesofil dan termotoleran yang terseleksi hanya Bg-259-II₇ dan Db-352-III₂ yang memiliki aktivitas selulolitik terutama pada sumber karbon CMC yang lebih baik pada suhu awal tumbuhnya (30 atau 50°C).

Mikrob termofil dapat dimanfaatkan untuk berbagai kegiatan bioteknologi yang berlangsung lebih cepat dan lebih efisien pada suhu tinggi. Mikrob tersebut bermanfaat untuk menghilangkan atau sangat mengurangi biaya pendinginan pada berbagai proses yang memanfaatkan mikrob, selain enzim tersebut mampu mengkatalisis reaksi biokimia pada suhu tinggi (Brock & Madigan 1991). Selain itu, mikrob termofil terutama penghasil selulase sering dimanfaatkan dalam proses pengomposan (Basuki *et al.* 1995).

Dalam usaha memperoleh isolat yang beraktivitas ekstremofil dilakukan pengujian kemampuan selulolitik lebih lanjut pada berbagai perlakuan pH terhadap isolat terpilih dari dua perlakuan suhu tersebut. Hasil pengujian kemampuan selulolitik pada pH rendah menunjukkan tidak satupun isolat terpilih mampu beraktivitas hingga pH 2, dan hanya tujuh isolat bakteri yang tumbuh pada pH 3 yang menunjukkan aktivitas selulolitiknya pada sumber karbon CMC. Kemampuan isolat terpilih yang ditumbuhkan pada pH 3 tersebut tergolong rendah pada sumber karbon Sigmacell-20 (Tabel 3). Isolat selulotermofil yang memiliki pertumbuhan optimum pada pH 3 ini bersifat asidofil (pH<4). Dari tujuh isolat yang mampu beraktivitas selulolitik pada pH 3 terlihat hanya tiga isolat (Ah-46-II₁, Pb-139-II₅ dan Rb-264-II₅) yang bersifat asidofil. Isolat Pb-139-II₅ merupakan satu-satunya isolat selulotermofil asidofil (bersifat ekstremofil) yang memiliki enzim CMC-ase yang bersifat asidofil. Isolat ini dapat dimanfaatkan untuk mendekomposisi-

Tabel 3. Aktivitas selulolitik kualitatif isolat pada media bersubstrat CMC atau Sigmacell-20 pada pH 2 dan 3.

Kode Isolat	Suhu Optimum Pertumbuhan (°C)	pH 2		pH 3	
		CMC Nisbah	Sigmacell-20 TK*	CMC Nisbah	Sigmacell-20 TK*
Nn-326-I ₆	60	-	0	-	0
Ah-46-II ₁	60	-	0	3.50	1
Bb-297-II ₁₀	60	-	0	5.00	3
Bg-248-II ₁₃	60	-	0	5.00	0
Bg-259-II ₇	60	-	0	-	0
Pb-139-II ₅	60	-	0	2.67	0
Pb-144-II ₅	70	-	0	5.00	3
Pb-144-II ₆	70	-	0	-	0
Pb-154-II ₇	60	-	0	4.00	3
Rb-264-II ₅	60	-	0	2.00	3

*I: pH 4, 30°C; II: pH 4, 50°C; III: pH 7, 30°C; IV: pH 7, 50°C; **TK: tingkat kejernihan: 0 (tidak jelas); 1 (kurang jelas); 2 (agak jelas); 3 (jelas); 4 (sangat jelas); - : tidak ada aktivitas

kan bahan organik berselulosa pada bahan atau lingkungan yang bersifat masam sehingga kompos yang dihasilkan dapat meningkatkan ketersediaan hara tanah yang memiliki kendala dalam ketersediaan haranya, selain dapat mengurangi dampak negatif bagi lingkungan. Selain itu, pemanfaatan bakteri beraktivitas selulolitik tinggi tersebut pada proses dekomposisi pada lingkungan masam dapat menggantikan atau bersama cendawan yang biasanya berperan dalam proses dekomposisi bahan organik karena tingginya daya adaptasi terhadap pH rendah (Alexander 1977).

Pengujian kemampuan selulolitik 20 isolat bakteri selulotermofil terpilih yang berasal dari media pertumbuhan pH 7 pada pH 9 hingga 11 (Tabel 4) menunjukkan bahwa hampir semua isolat bakteri tersebut mampu beraktivitas selulolitik terhadap kedua substrat selulosa itu pada berbagai perlakuan pH yang dicobakan, kecuali isolat Dh-14-III₂ yang tidak menunjukkan aktivitas seluloliticnya pada pH 11, sedangkan Rb-269-IV₇ yang memiliki aktivitas selulolitik tertinggi akibat perlakuan suhu (Tabel 2) tidak menunjukkan aktivitas selulolitiknya untuk semua perlakuan pH yang dicobakan.

Hasil pengujian pada pH 9 menunjukkan bahwa isolat Nn-314-IV₂ merupakan isolat selulotermotoleran alkalofil yang diduga memiliki aktivitas endoglukanase terbaik, sedangkan isolat Bg-248-IV₁₂ merupakan isolat selulotermotoleran alkalofil yang memiliki aktivitas selulolitik terbaik terhadap selulosa kristal. Dari 20 isolat terpilih yang diuji aktivitasnya pada pH 9 ini ditemukan hanya satu isolat selulotermofil alkalofil (Om-344-III₃) dan satu isolat selulotermofil (Pb-149-IV₂) yang memiliki enzim CMC-ase alkalofil. Isolat alkalofil yang memiliki enzim alkalofil untuk kedua sumber karbon yang dicobakan (CMC dan Sigmacell-20) pada pH 9 ialah Sj-338-III₃, Sj-339-III₃, dan

Tabel 4. Aktivitas selulolitik kualitatif isolat pada substrat CMC atau Sigmacell-20 pada pH 9, 10, dan 11 pada suhu 60°C.

Kode Isolat	pH 9		pH 10		pH 11	
	CMC	Sigmacell-20	CMC	Sigmacell-20	CMC	Sigmacell-20
	Nisbah	TK*	Nisbah	TK*	Nisbah	TK*
Ah-44-III ₁	3.50	3	12.00	0	5.00	0
Db-352-III ₁	5.67	3	8.50	2	7.50	2
Dh-14-III ₂	2.00	2	9.00	0	-	0
Gr-134-III ₁	4.00	1	2.50	1	14.0	1
Nn-329-III ₁	2.50	3	2.67	0	2.40	2
Om-344-III ₃	1.50	0	2.00	0	5.00	3
Sj-59-III ₃	5.00	3	4.29	2	1.89	3
Sj-338-III ₁	2.00	3	2.00	3	2.50	2
Sj-338-III ₃	7.50	3	2.14	2	1.42	2
Sj-339-III ₃	2.67	2	2.00	2	2.50	2
Ah-36-IV ₁₂	4.05	3	3.00	1	1.50	1
Ah-42-IV ₁	5.00	1	4.80	1	1.50	1
Bb-304-IV ₁	5.00	3	5.00	1	2.00	1
Bg-248-IV ₁	2.00	4	2.67	1	2.80	3
Bk-52-IV ₁	5.00	1	5.00	1	13.33	1
Nn-314-IV ₂	10.0	2	5.00	0	1.25	2
Om-344-IV ₃	3.00	2	4.00	2	11.00	2
Pb-149-IV ₂	2.00	2	3.00	3	1.67	3
Pb-154-IV ₆	8.80	2	4.50	2	-	0
Rb-269-IV ₇	-	0	-	0	-	0

- tidak terukur; * TK; tingkat kejernihan : 0 (tidak jelas); 1 (kurang jelas); 2 (agak jelas); 3 (jelas); 4 (sangat jelas)

Bb-304-IV₆. Ditinjau dari nisbah diameter zona bening terhadap diameter isolat pada media bersubstrat CMC pada pH 10, aktivitas selulolitik 20 isolat terpilih yang mendapat perlakuan pH 7 memiliki nisbah lebih besar (2.0-12.0) dibandingkan dengan aktivitasnya pada pH 9 (1.5-10), namun sebaliknya dengan aktivitas isolat tersebut pada selulosa kristal. Isolat yang memiliki aktivitas CMC-ase terbaik pada pH 10 ialah Ah-44-III₁, sedangkan Sj-338-III₁ dan Pb-149-IV₂ mampu menjernihkan selulosa kristal (Sigmacell-20) dengan jelas.

Hasil pengamatan terhadap isolat yang ditumbuhkan pada pH 10 dan suhu 60°C tersebut menunjukkan bahwa 7 isolat bersifat alkalofil dan ditemukan isolat yang memiliki aktivitas selulolitik lebih baik dibandingkan dengan pH asal isolasinya (pH 7) sebanyak 7 isolat untuk aktivitasnya pada selulosa amorf dan 3 isolat pada selulosa kristal. Sebanyak 6 isolat memberikan aktivitas endoglukanase terbaiknya pada pH 11 dibandingkan dengan pH 9 dan 10, yaitu Gr-134-III₁, Om-344-III₃, Si-338-III₁, Bg-248-IV₁₇, Bk-52-IV₁, dan Om-344-IV₃; sedangkan isolat Pb-154-IV₆ merupakan satu-satunya isolat yang tidak mampu beraktivitas selulolitik pada pH 11. Dari seluruh isolat yang diuji pada pH 11 terlihat bahwa isolat Gr-134-III₁ memberikan aktivitas selulolitik terbaiknya pada selulosa amorf yang lebih baik daripada aktivitasnya pada pH asal isolasinya. Ditemukannya isolat yang mampu tumbuh dan beraktivitas selulolitik hingga pH 11 ini menunjukkan banyaknya isolat selulotermofil dari kelompok alkalofil karena kemampuannya untuk tumbuh di atas 40°C dan pH 8.5. Dari keseluruhan perlakuan pH yang dicobakan ditemukan enam isolat yang bersifat alkalofil (Om-344-III₃, Nn-329-III₁, Sj-338-III₁, Sj-338-III₃, Sj-339-III₃, dan Bg-248-IV₁₇) dan satu isolat termofil alkalofil, yaitu Om-344-III₃. Kroll (1990) menemukan mikroorganisme alkalofilik seperti *Aeromonas* sp. yang menghasilkan selulase dengan aktivitas optimumnya pada pH 8.0, sedangkan selulase alkali yang dihasilkan *Bacillus* sp. memiliki kisaran pH yang besar (4.5-11), tetapi aktivitas optimumnya antara pH 6-7 dan stabil pada suhu 50°C. *Clostridium* sp. sebagai mikroorganisme selulolitik anaerob yang dikenal efektif mendekomposisi selulose kristal memiliki pH optimum pertumbuhannya 7.5-8.0.

Isolat yang telah teruji kemampuan selulolitiknya pada berbagai perlakuan pH tersebut kemudian diuji lebih lanjut pada berbagai perlakuan pH pembanding (Tabel 5 dan 6). Isolat yang ditumbuhkan pada media ber-pH 4 diuji kemampuan selulolitiknya pada pH 5-7, sedangkan isolat yang berasal dari media tumbuh ber-pH 7 diuji pada pH 2-6. Untuk keperluan tersebut hanya 10 dari 30 isolat terpilih yang digunakan dengan kriteria memiliki nisbah zona bening terbaik pada media bersumber karbon CMC dan/atau mampu memberikan tingkat kejernihan yang tinggi dan sangat jelas pada media bersumber karbon Sigmacell-20. Selanjutnya isolat tersebut diuji kemampuan selulolitiknya secara kuantitatif (Fikrinda *et al.*, *in press*), sedangkan data suhu dan pertumbuhan optimum serta aktivitas optimumnya pada kedua sumber karbon yang dicobakan pada kesepuluh isolat terpilih tersebut diringkaskan pada Tabel 7.

Tabel 5. Aktivitas selulolitik kualitatif isolat pada media agar dengan sumber karbon CMC atau Sigmacell-20 pada pH 3, 4, dan 5 pada suhu 60°C.

Kode Isolat	pH 3		pH 4		pH 5	
	CMC	Sigmacell-20	CMC	Sigmacell-20	CMC	Sigmacell-20
	Nisbah	TK*	Nisbah	TK*	Nisbah	TK*
Bg-259-II ₇	-	0	24.00	0	2.50	0
Pb-139-II ₅	2.67	0	1.380	0	3.00	2
Db-352-III ₂	3.00	0	2.00	2	4.00	0
Dh-14-III ₂	1.50	0	4.00	0	4.67	2
Gr-134-III ₁	3.33	0	2.00	1	5.00	1
Sj-59-III ₃	-	0	-	0	1.42	2
Sj-338-III ₁	2.00	0	58.00	0	1.67	2
Sj-338-III ₃	-	0	6.00	0	3.00	1
Sj-339-III ₃	-	0	-	0	2.33	3
Ah-36-IV ₁₂	-	0	14.00	1	3.00	3

- tidak terukur; * TK; tingkat kejernihan : 0 (tidak jelas); 1 (kurang jelas); 2 (agak jelas); 3 (jelas); 4 (sangat jelas)

Tabel 6. Aktivitas selulolitik kualitatif isolat pada media substrat CMC atau Sigmacell-20 pada pH 6 dan 7.

Kode Isolat	pH 3		pH 4	
	CMC	Sigmacell-20	CMC	Sigmacell-20
	Nisbah	TK*	Nisbah	TK*
Bg-259-II ₇	5.5	2	4.0	0
Pb-139-II ₅	7.0	1	5.0	0
Db-352-III ₂	6.0	1	2.67	3
Dh-14-III ₂	5.33	2	2.0	1
Gr-134-III ₁	5.0	3	5.5	3
Sj-59-III ₃	5.0	3	6.5	4
Sj-338-III ₁	12.0	3	5.0	1
Sj-338-III ₃	2.5	3	4.0	1
Sj-339-III ₃	4.0	1	6.5	3
Ah-36-IV ₁₁	6.0	2	14.0	2

ta: tidak ada aktivitas; * TK; tingkat kejernihan : 0 (tidak jelas); 1 (kurang jelas); 2 (agak jelas); 3 (jelas); 4 (sangat jelas)

Perlakuan pH pembandingan ini diperlukan untuk mendapatkan informasi tentang kemampuan tumbuh bakteri selulolitik yang ditemukan pada ekosistem air hitam ini untuk bertahan pada berbagai kondisi pH dan untuk menentukan pH optimum lingkungannya. Dari 10 isolat selulotermofil terpilih yang diuji untuk seluruh perlakuan pH menunjukkan beragamnya kemampuan selulolitik isolat tersebut pada berbagai pH pertumbuhan (Tabel 3-6). Kisaran pertumbuhan masing-masing isolat selulotermofil tersebut ialah Bg-259-II₇ (pH 4-7), Pb-139-II₅ (pH 3-7), Db-312-III₂ (pH 3-11), Dh-14-III₂ (pH 3-10), Gr-134-III₁ (pH 3-11), Sj-59-III₃ (pH 5-11), Sj-338-III₁ (pH 4-11), Sj-338-III₃ (pH 3-11), Sj-339-III₂ (pH 5-11), dan Ah-36-IV₁₂ (pH 4-11).

Ditemukannya suhu dan pH optimum bagi pertumbuhan dan aktivitas selulase isolat yang terisolasi dari ekosistem air hitam melalui tahapan perlakuan suhu dan pH menunjukkan bahwa isolasi mikroba pada kondisi berbagai suhu atau pH tidak perlu dilakukan langsung pada masing-masing pH atau suhu, tetapi dapat dilakukan secara bertahap. Selain itu, dengan ditemukannya kisaran pertumbuhan bakteri selulolitik yang lebar yang terdapat pada ekosistem air hitam menunjukkan besarnya potensi bakteri tersebut untuk diaplikasikan pada berbagai kondisi lingkungan.

Tabel 7. Ringkasan data pertumbuhan dan aktivitas kualitatif sepuluh isolat terpilih pada berbagai perlakuan suhu dan pH.

Isolat*	Pertumbuhan optimum		Aktivitas optimum	
	Suhu (°C)	pH	CMC (Rasio)	Sigmacell-20 (Tingkat kejernihan)
Bg-259-II ₇	60	5	24.00	2
Pb-139-II ₅	50	4	7.00	2
Db-352-III ₂	30	4	6.00	3
Dh-14-III ₂	60	7	5.33	2
Gr-134-III ₁	30	7	5.50	3
Sj-59-III ₃	30	11	6.50	4
Sj-338-III ₁	30	10	58.00	3
Sj-338-III ₃	30	11	6.00	3
Sj-339-III ₃	30	11	6.50	3
Ah-36-IV ₁₂	30	11	14.00	3

*I: pH 4, 30°C; II: pH 4, 50°C; III: pH 7, 30°C; IV: pH 7, 50°C; tingkat kejernihan: 0 (tidak jelas); 1 (kurang jelas); 2 (agak jelas); 3 (jelas); 4 (sangat jelas); - : tidak ada aktivitas.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini terselenggara melalui dana riset unggulan terpadu V dengan peneliti utama D.A. Santosa. Sebagian dana riset diperoleh juga dari *Indonesian Center for Biodiversity and Biotechnology* (ICBB). Seluruh isolat didepositkan di ICBB-Culture Collection of Microorganisms, <http://www.icbb.org>.

DAFTAR PUSTAKA

- Akiba, S., Y. Kimura, K. Yamamoto & H. Kumagai. 1995. Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Bioeng.* 79:125-130.
- Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. Ed. Ke-2. New York. John Wiley.
- Basuki. 1994. Pengomposan Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Pemberian Inokulum Fungi Selulolitik, Nitrogen dan Fosfor. Tesis. Program Pasca Sarjana IPB.
- Beldman, G., A.G.J. Voragen, F.M. Rombouts, M.F.S.-van Leewen & W. Pilnik. 1987. Adsorption and kinetic behavior of purified endoglucanases and exoglucanases from *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng.* 30:251-257.
- Busto, M.D., N. Ortega & M. Perez-Mateos. 1995. Induction of β -glukosidase in fungal and soil bacterial cultures. *Soil Biol. Biochem.* 27:949-954.
- de Coninck-Chosson, J. 1988. Aerobic degradation of cellulose and adsorption properties of cellulases in *Cellulomonas uda* JC3: effects of crystallinity of substrate. *Biotechnol. Bioeng.* 31:495-501.
- Enari T. M. 1983. Microbial cellulases. Di dalam W.M. Fogarty (ed.). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. London. Elsevier.
- Fikrinda, I. Anas, T. Purwadaria & D.A. Santosa. Identifikasi ekstremozim selulase isolat bakteri dari ekosistem air hitam. *Hayati, in press*.
- Goto, M., K. Furukawa & S. Hayashida. 1992. An avicel-affinity site in an avicel-digesting exocellulase from a *Trichoderma viride* mutant. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:1523-1528.
- Kroll, R.G. 1990. *Microbiology of extreme environments*. Alkalophiles. hlm. 55-92. Di dalam: C. Edwards (ed.). New York: Mc Graw-Hill.
- Nurseha. 2000. Isolasi dan Uji Aktivitas Bakteri Asidofilik Pengoksidasi Besi dan Sulfur dari Ekosistem Air Hitam, Kalimantan Tengah. Tesis. Fakultas Pascasarjana IPB, Bogor.

- Purwadaria, M.B.T.** 1988. Purification and Characterisation of A *Cellulomonas* Cellulase Complex. Dissertation. New South Wales: University of New South Wales.
- Purwadaria, M.B.T., T. Haryati & J. Darma.** 1994. Isolasi dan seleksi kapang mesofilik penghasil mananase. Ilmu dan Peternakan. 7(2):26-29.
- Saidi, D. I. Anas, N. Hadi & D.A. Santosa.** 1999. Kemampuan bakteri dari ekosistem air hitam Kalimantan Tengah dalam merombak minyak bumi dan solar. J. Il. Tan. Lingk. 2(2):1-7.
- Santosa, D.A.** 1998. Ekosistem Air Hitam (Black Water Ecosystem): Biodiversity Makro dan Mikro, Isolasi DNA *in situ*, dan Kloning Shotgun Gen Penyandi Ekstremozim. Laporan Riset. Riset Unggulan Terpadu V. Dewan Riset Nasional, Jakarta.
- Teather, R.M. & P.J. Wood.** 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:777-780.