

# Aktivitas selulase isolat jamur dari limbah media tanam jamur merang

## Cellulase activity of isolated fungus from spent straw mushroom substrate

NUR HASANAH<sup>✉</sup>, IWAN SASKIAWAN<sup>✉</sup>

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jl. Raya Bogor Jakarta Km 46. Cibinong 16911, Jawa Barat, Tel./Fax. +62-21-87907636, ✉email: 4nacall@gmail.com, ✉✉iwansaskiawan@gmail.com

Manuskrip diterima: 17 April 2015. Revisi disetujui: 24 Mei 2015.

**Abstrak.** Hasanah N, Saskiawan I. 2015. Aktivitas selulase isolat jamur dari limbah media tanam jamur merang. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1110-1115*. Enzim selulase yang dihasilkan mikroba mempunyai peranan penting dalam menghidrolisis material selulosa untuk berbagai keperluan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas selulase kultur murni jamur yang diisolasi dari limbah media tanam jamur merang. Aktivitas selulase dari 20 nomor kultur murni jamur hasil isolasi tersebut ditentukan dengan nilai indeks selulolitik melalui metode pewarnaan merah kongo 0.1% pada media CMC. Tiga kultur murni jamur, yaitu JMF 6, JMF 11, dan JMF 12 memiliki indeks selulolitik tertinggi, masing-masing 0.50, 0.66, dan 0.50. Setelah itu, nilai aktivitas enzim selulase dari ke tiga jamur tersebut ditentukan dengan menghitung gula pereduksi substrat melalui metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Penentuan kadar protein ditentukan dengan metode Bradford. Hasil menunjukkan isolat JMF 12 memiliki aktivitas tertinggi, yaitu 0.77 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 2.78 U/mg. Nilai aktivitas selulase untuk isolat JMF 6 dan JMF 11 masing-masing sebesar 0.48 U/mL dan 0.52 U/mL. Aktivitas spesifik dari JMF 6 dan JMF 11 masing-masing sebesar 1.44 U/mg dan 1.83 U/mg.

**Kata kunci:** Aktivitas selulase, limbah jamur merang

**Abstract.** Hasanah N, Saskiawan I. 2015. *Cellulase activity of isolated fungus from spent straw mushroom substrate. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1110-1115*. Microbial cellulase plays an important role in the hydrolysis of cellulolytic materials and it is applied at several industrials field. The aim of this experiment was to screen the activity of microbial cellulose of isolated fungus from the spent mushroom substrate. The cellulolytic index of fungus was determined by 0.1% Congo Red staining method with CMC media. The isolates number of JMF 6, JMF 11, and JMF 12 showed the highest cellulolytic index among 20 isolated fungi. The CI value of these isolated number were 0.50, 0.66, and 0.50 respectively. Furthermore, the specific activity of cellulase from selected fungi was determined by measurement of reducing sugar using 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. The protein content was determined by the Bradford method. The results showed that the JMF 12 has the highest cellulase activity of 0.77 U/mL and specific activity of 2.78 U/mg. The cellulase activity of the JMF 6 and JMF 11 were 0.48 U/mL and 0.52 U/mL respectively. The specific activity of the JMF 6 and JMF 11 were 1.44 U/mg and 1.83 U/mg respectively.

**Keywords:** Cellulase activity, spent mushroom substrate

## PENDAHULUAN

Indonesia sebagai negara agraris setiap tahunnya menghasilkan limbah pertanian yang sangat melimpah seperti jerami padi, tongkol jagung, batang kedelai, kulit pisang dan lain-lain. Limbah hasil pertanian tersebut masih mengandung sejumlah senyawa yang dapat dikonversi menjadi produk yang memiliki nilai ekonomi seperti kompos, pakan ternak atau digunakan sebagai medium pertumbuhan mikroba (Meryandini 2009). Senyawa tersebut sebagian besar berupa lignoselulosa yang terdiri atas tiga polimer, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin (Perez et al. 2002). Hidrolisis sempurna senyawa lignoselulosa sebagian besar menghasilkan glukosa yang merupakan bahan dasar pembuatan bioetanol. Potensi tersebut terkendala oleh sifat dari lignoselulosa yang sulit didegradasi karena struktur kristal dari selulosa yang merupakan komponen utama penyusun lignoselulosa pada

tanaman (Koesnandar 2008). Selulosa adalah polimer linier glukosa dengan ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik (Kim et al. 2004). Hidrolisis selulosa menjadi glukosa merupakan proses yang kompleks dan dapat dilakukan melalui konversi secara fisik, kimia maupun biologi. Salah satu proses konversi yang banyak diteliti adalah proses konversi biologi secara enzimatik.

Enzim yang dapat mendegradasi selulosa adalah enzim selulase. Enzim selulase mengkatalisis hidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik pada molekul selulosa sehingga menghasilkan glukosa (Sinatari 2013). Enzim dapat diproduksi oleh kelompok bakteri, kapang maupun khamir (Imas 2009). Mikroba yang umum digunakan untuk menghasilkan enzim selulase adalah *Trichoderma reesei* (Kodri et al. 2013). Selain itu juga telah diteliti produksi selulase dari jenis mikroba lain seperti *Aspergillus Niger* (Julfana et al. 2013), *Ganoderma lucidum* (Basuni 2008), *Trichoderma viride* (Tridasma 2006), *Penicillium*

*nalgiovense* (Nugraha 2006) dan lain-lain juga menunjukkan adanya kemampuan aktivitas selulolitik dan hemiselulolitik yang tinggi pada proses fermentasi untuk menghasilkan gula (Chandel et al. 2007). Enzim selulase umumnya digunakan dalam berbagai industri seperti bioteknologi makanan, tekstil, kertas, pertanian serta dalam pengembangan penelitian. Umumnya, enzim yang digunakan saat ini masih impor dan mahal.

Menurut Alam (2004), sebagian besar selulosa (90-96%) di alam didegradasi secara aerob dan sebagian kecil didegradasi secara anaerob. Hal ini menunjukkan keberadaan mikroba pendegradasi selulosa atau mikroba selulolitik di alam sangat melimpah dan dapat ditemukan pada limbah pertanian yang memiliki kandungan lignoselulosa, seperti jerami padi yang berperan sebagai substrat untuk mikroba penghasil enzim selulase. Permasalahan ketersediaan enzim selulase dapat diatasi dengan mengisolasi mikroba selulolitik dari alam. Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian terdahulu oleh Saskiawan (2013) yang melakukan isolasi mikroba dari limbah media tanam jamur merang. Selama ini, limbah media tanam jamur merang dari jerami padi hanya digunakan sebagai pakan atau dilakukan pembakaran ketika sudah tidak dapat dimanfaatkan kembali (Sunandar 2010). Selulosa dirombak oleh mikroba selulolitik dengan bantuan enzim selulase, salah satu mikroba perombak selulosa adalah jamur selulolitik. Selulosa dari sisa tumbuhan dan organisme lain diurai oleh mikroba menjadi senyawa sederhana berupa glukosa, CO<sub>2</sub> dan hidrogen yang sangat berguna sebagai zat hara bagi tumbuhan dan organisme tanah lainnya (Oramahi et al, 2003). Jamur memiliki kemampuan untuk menghidrolisis selulosa alami melalui aktivitas selulase yang dimilikinya. Perolehan mikroba selulolitik yang mampu menghasilkan aktivitas selulase yang tinggi menjadi sangat penting untuk tujuan pengomposan limbah organik. Kemampuan enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa akan meningkat apabila dilakukan optimasi pemurnian aktivitas selulase. Penelitian ini mengkaji aktivitas enzim selulase dari mikroba untuk pemanfaatan biomassa selulosa yang diisolasi dari limbah media tanam jamur merang dengan 20 nomor isolat, yaitu JMF 1 hingga JMF 20. Pokok bahasan difokuskan pada seleksi secara kualitatif dan kuantitatif aktivitas enzim selulase untuk memilih isolat yang memiliki aktivitas selulase tertinggi dari 20 nomor isolat hasil isolasi. Penelitian ini bertujuan menentukan mikroba yang memiliki aktivitas selulolitik tertinggi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain 20 isolat jamur dengan kode JMF yang diisolasi dari limbah media tanam jamur merang, PDA (*Potato Dextrosa Agar*), PDB (*Potato Dextrosa Borth*), NaOH, Kalium Natrium Tartrat-Tetrahidrat, *Carboxy Methyl-Cellulose* (CMC), *buffer phospat*, kertas saring Whatman grade 42, akuades, glukosa, DNS (*Dinitro salisilic acid*), reagen Bradford, dan larutan *congo red* 0.1%.

### Metode

#### *Pembuatan media PDA dan peremajaan isolat JMF*

Media PDA (*Potato Dextrosa Agar*) dibuat dari 39 gram serbuk PDA dipanaskan dalam 1 liter akuades. Media disterilisasi pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Sebanyak 20 isolat JMF diremajakan pada media agar miring PDA selama 3 hari pada suhu ruang.

#### *Uji kualitatif selulolitik (modifikasi Fikrinda et al. 2000)*

Seleksi mikroba selulolitik menggunakan media CMC pada cawan petri. Media CMC dibuat dengan mencampurkan 0.4 g CMC, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.03 g KNO<sub>3</sub>, 1.0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0008 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.08 yeast, 2 gr NaNO<sub>3</sub>, 18 g agar dan dilarutkan dalam 1 liter akuades. Setelah diinkubasikan 24 jam pada suhu ruang, isolat kemudian ditetesi larutan merah kongo 0.1% (b/v) dan ditambahkan larutan NaCl 1%. Aktivitas selulolitik ditentukan dengan nilai indeks selulolitik yang merupakan nisbah antara diameter zona bening dengan diameter koloni.

#### *Uji kuantitatif selulolitik (modifikasi Anggarawati 2012)*

Campuran reaksi dalam uji kuantitatif adalah 125 µl sampel ekstrak kasar enzim selulase dan 875 µl larutan substrat CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) 0.5% (b/v), campuran tersebut kemudian divorteks hingga homogen dan diinkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan 1 mL DNS (3,5- *Di Nitro Salisilic Acid*)—dan dipanaskan selama 5 menit dalam *water bath*. Hal ini dilakukan untuk menghentikan reaksi dan DNS dapat bercampur dengan produk glukosa yang terbentuk. Setelah divorteks sampai homogen, absorbansi setiap larutan sampel diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) = 540 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan pada kurva standar untuk mengetahui konsentrasi produk glukosa pada sampel. Satu unit aktivitas enzim selulase dinyatakan sebagai jumlah µmol produk glukosa hasil hidrolisis enzim selulase tiap satu menit pada kondisi pengujian. Nilai aktivitas selulase ditentukan berdasarkan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas selulase (U/mL)} = \frac{\text{konsentrasi glukosa sampel} \times 1000}{V.t.BM}$$

$$A_{\text{terkoreksi}} = ((A_s - A_b) - (A_k - A_b))$$

Keterangan:

- As = Absorbansi sampel
- Ab = Absorbansi blanko
- Ak = Absorbansi kontrol
- V = Volume enzim (125 µL)
- t = waktu inkubasi
- BM = Bobot molekul glukosa (180 g/mol)
- 1000 = konversi dari mmol ke µmol

#### *Pembuatan kurva standar glukosa*

Konsentrasi gula dalam kurva standar diukur dengan metode DNS. Pereaksi DNS dibuat dengan melarutkan 1 g

DNS (3,5-Di Nitro Salisilic Acid) secara perlahan dalam 20 mL larutan NaOH 2 N dan 50 mL aquadest. Larutan DNS tersebut kemudian ditambah dengan 30 gram K-Na tartrat dan diaduk dengan magnetic stirrer serta ditera dengan aquadest hingga volume akhir 100 mL.

Sebanyak 7 tabung reaksi dimasukkan sebanyak 1 mL larutan standar glukosa glukosa (0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.200, 0.225, 0.250 mg/mL) dan 1 tabung reaksi dengan 1 mL aquadest sebagai kontrol. Selanjutnya sebanyak 1 mL reagen DNS ditambahkan pada larutan standar glukosa tersebut. Semua tabung reaksi dipanaskan di dalam water bath selama 5 menit agar terjadi reaksi antara glukosa dengan DNS. Tabung reaksi didinginkan kemudian divorteks, sehingga homogen. Absorbansi tiap larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda = 540$  nm, konsentrasi standar glukosa ditunjukkan dengan kurva standar.

#### *Produksi enzim selulase pada media PDB (Potato Dextrosa Broth)*

Isolat yang memiliki indeks selulolitik tertinggi diuji aktivitas selulolitiknya secara kuantitatif. Dengan menggunakan *cork borer* dengan diameter 0,6 isolat tersebut dipindahkan ke 200 mL media PDB (*Potato Dextrosa Broth*) dalam labu Erlenmeyer 300 mL, kemudian diinkubasi selama 4 hari pada suhu 37°C dengan kecepatan *shaker* 120 rpm/menit. Setiap 24 jam diuji nilai aktivitas selulase isolat terpilih. Ekstrak kasar enzim selulase diperoleh dengan melakukan sentrifugasi pada sampel dengan kecepatan 9500 rpm, selama 30 menit, pada suhu 4°C. Ekstrak kasar enzim selulase berada pada bagian supernatant, sementara limbah padat sel isolat akan terendap menjadi pelet. Supernatan tersebut, selanjutnya difiltrasi dengan menggunakan kertas saring Whatman *grade 42*, sehingga diperoleh filtrat jernih yang merupakan ekstrak kasar enzim selulase.

#### *Penentuan kadar protein (Bradford 1976)*

*Pengukuran kurva standar.* Standar protein yang digunakan adalah *bovine serum albumin* (BSA) dengan konsentrasi 0.3-1.00 mg/mL dan menggunakan pelarut NaCl 0.15 M. Sebanyak 20  $\mu$ L BSA ditambahkan dalam 1 mL larutan Bradford. Reagen Bradford dibuat dengan mencampurkan *Coomassie Brilliant Blue G-250* 100 mg, etanol 95% 50 mL, asam fosfat 85% 100 mL dan akuades hingga 1 liter. Larutan divorteks dan diinkubasi selama 5 menit. Absorban larutan kemudian diukur pada  $\lambda = 595$  nm.

*Pengukuran sampel.* Sebanyak 20  $\mu$ L sampel enzim selulase ditambahkan dalam 1 mL larutan Bradford. Larutan tersebut kemudia divorteks dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Absorban larutan kemudian diukur pada  $\lambda = 595$  nm.

*Pembuatan blanko.* Sebanyak 20  $\mu$ L NaCl 0.15 M ditambahkan dalam 1 mL lautan Bradford. Larutan divorteks dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Absorban larutan kemudian diukur pada  $\lambda = 595$  nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

#### *Uji kualitatif*

Uji kualitatif 20 nomor isolat jamur dilakukan pada media CMC kompleks dan diinkubasi selama 24 jam. Terdapat 11 nomor isolat jamur yang menunjukkan hasil positif terhadap aktivitas selulolitik, yaitu isolat JMF 1, JMF 3, JMF 5, JMF 6, JMF 10, JMF 11, JMF 12, JMF 13, JMF 14, JMF 15, JMF 19. Terdapat 9 isolat JMF yang tidak menunjukkan adanya aktivitas selulolitik, yaitu JMF 2, JMF 4, JMF 7, JMF 8, JMF 9, JMF 16, JMF 17, JMF 18, dan JMF 20. Hasil analisis nilai indeks selulolitik dari 20 isolat jamur tersebut menunjukkan tiga nilai tertinggi dibandingkan dengan isolat lain yang diujikan, yaitu 0.50, 0.66, dan 0.50 masing-masing untuk isolat JMF 6, JMF 11, dan JMF 12.

#### *Uji kuantitatif*

Tiga isolat terpilih dengan nilai indeks selulolitik tertinggi kemudian diuji secara kuantitatif untuk mengetahui aktivitas selulase dengan metode DNS. Penentuan aktivitas selulolitik isolat JMF terpilih terlampir pada Lampiran 4. Nilai aktivitas selulase (U/mL) untuk isolat JMF 6 sebesar 0.4800 $\pm$ 0.012 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 1.4462 $\pm$ 0.034 U/mg, isolat JMF 11 memiliki aktivitas sebesar 0.5291 $\pm$ 0.015 U/mL dengan nilai aktivitas spesifik sebesar 1.8352 $\pm$ 0.057 U/mg dan isolat JMF 12 sebesar 0.7727 $\pm$ 0.019 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 2.7812 $\pm$ 0.081 U/mg (Gambar 2). Berdasarkan hasil uji kuantitatif, JMF 12 merupakan isolat jamur yang memiliki aktivitas selulase dan aktivitas spesifik selulase tertinggi dibandingkan dengan isolat lainnya.

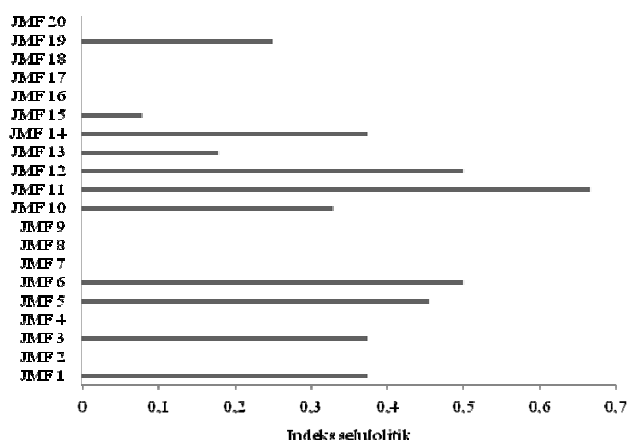
### Pembahasan

#### *Uji kualitatif*

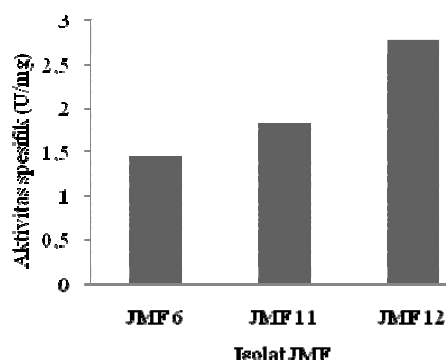
Seleksi mikroba selulolitik secara kualitatif bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas enzim selulolitik dari suatu isolat. Salah satu uji kualitatif yang umum digunakan adalah melalui pewarnaan dengan larutan merah Kongo (*Congo Red*) 0.1%. Uji ini dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media agar yang mengandung karboksilmetil selulosa (CMC) kompleks dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam lalu dilakukan pengamatan zona bening. Karboksilmetil selulosa (CMC) merupakan suatu polimer anionik yang umum digunakan pada pengujian aktivitas selulase (Lee 2008). CMC merupakan polimer dengan bobot molekul tinggi sehingga tidak dapat ditranspor ke dalam sel mikroorganisme (Kim et al. 2004). Bobot molekul CMC bervariasi dari rentang 90-250 kDa. Hal ini menyebabkan enzim pendegradasi CMC akan ditahan pada permukaan dinding sel atau dilepaskan ke luar sel dan membuat selulase yang disekresikan akan berdifusi ke dalam permukaan media agar. Enzim selulase merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat ekstraseluler (Imas 2009). Hal ini menyebabkan enzim tersebut akan disekresikan dalam media tumbuh isolat tersebut.

Tabel 1. Uji aktivitas selulase

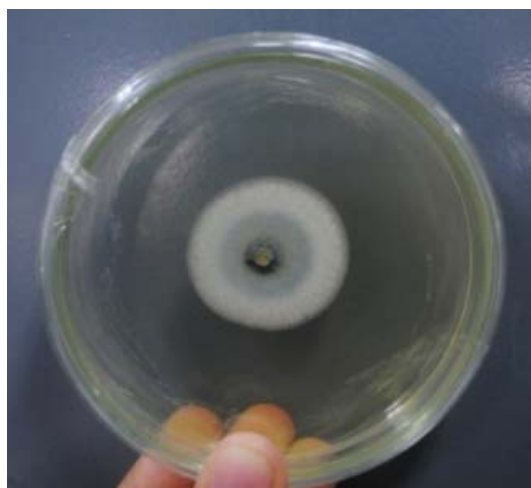
Nama isolat	Aktivitas (U/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)
JMF 6	0.4800	0.3319	1.4462
JMF 11	0.5291	0.2883	1.8352
JMF 12	0.7277	0.2778	2.7812



Gambar 1. Indeks selulolitik 20 nomor Isolat JMF



Gambar 2. Aktivitas spesifik enzim selulase isolat terpilih



Gambar 3. Isolat JMF 12

Tahap pewarnaan dilakukan dalam media agar CMC selama 60 menit. Dalam selang waktu ini, pewarna merah Kongo akan mendeteksi zona yang mampu dihidrolisis oleh selulase. Prinsip pewarnaan ini adalah zat pewarna akan berdifusi ke dalam media agar dan hanya akan diabsorpsi oleh rantai panjang polisakarida yang memiliki ikatan  $\beta$ -D-glukan (Zhang et al. 2006). Setelah itu, kelebihan pewarna merah Kongo dibilas dengan larutan garam NaCl 1% sebagai pencuci. Pencucian dengan larutan NaCl akan membuat zona hasil hidrolisis selulase akan tampak lebih jelas. Uji kualitatif terhadap 20 isolat jamur yang diisolasi dari limbah media jamur merang menunjukkan bahwa terdapat 11 nomor isolat yang mempunyai zona bening dan 9 isolat yang tidak menghasilkan zona bening. Zona bening yang diamati dikonversi menjadi nilai indeks selulolitik uji kualitatif dalam seleksi. Indeks selulolitik diperoleh dari nilai perbandingan antara diameter zona bening dan diameter zona koloni. Zona bening menunjukkan zona tempat terputusnya ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik yang menghubungkan monomer D-glukosa pada CMC (Haryati 2010). Hal ini menunjukkan bahwa isolat yang memiliki zona bening merupakan isolat yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi selulosa.

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa isolat dari limbah media tanam jamur merang memiliki potensi menghasilkan enzim selulase untuk menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik pada CMC. Selulase yang digunakan untuk proses hidrolisis ini bersifat ekstraseluler. Sifat enzim ekstraseluler terlihat dari zona bening yang terbentuk di sekitar koloni. Merah kongo berinteraksi kuat dengan ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik. Metode ini dipilih karena proses seleksi dapat berlangsung cepat, mudah, dan sensitif. Pewarnaan dengan merah kongo dapat menentukan mikrob selulolitik dalam konsentrasi selulosa yang rendah pada substrat dan dapat mempersingkat waktu inkubasi (Teather dan Wood 1982). Berbagai jenis selulase diperlukan dalam mendegradasi sempurna struktur selulosa yang kompleks (Yang et al. 2006). Hasil uji kualitatif berdasarkan penelitian ini, yaitu isolat JMF 1, JMF 3, JMF 5, JMF 6, JMF 10, JMF 11, JMF 12, JMF 13, JMF 14, JMF 15, dan JMF 19 memiliki aktivitas selulase karena mempunyai nilai indeks selulolitik, akan tetapi indeks selulolitik dari setiap 11 nomor isolat tersebut berbeda, hal tersebut menandakan bahwa terdapat perbedaan dari masing-masing isolat JMF dalam menghasilkan enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa pada medium CMC. Kemampuan jamur dalam mendegradasi CMC dapat mendukung pertumbuhan miselia jamur dikarenakan bentuk selulosa yang lebih sederhana sehingga mudah untuk dihidrolisis oleh jamur (Ezekiel 2010). Uji degradasi dengan menggunakan metode zona bening adalah uji semi-kuantitatif, karena data yang diperoleh berupa perbandingan antara diameter zona bening dan diameter koloni yang terbentuk. Zona bening yang terbentuk terkait dengan kelarutan dari enzim selulase (Mustika et al. 2013). Berdasarkan nilai indeks selulolitik dari 11 nomor isolat JMF yang positif adanya aktivitas selulase dipilih 3 nomor Isolat JMF yang memiliki indeks selulolitik tertinggi diantaranya adalah isolat JMF 6, JMF 11, dan JMF 12

(Gambar 3). Kemudian isolat tersebut diuji secara kuantitatif dan diuji kadar protein menggunakan metode Bradford.

#### Uji kuantitatif

Uji kuantitatif dilakukan dengan mengetahui aktivitas selulase yang diukur berdasarkan jumlah gula pereduksi menggunakan metode asam dinitrosalisilat (DNS) dan glukosa sebagai kurva standar. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mensentrifus media kultur lalu diambil fraksi supernatan sebagai enzim ekstraseluler. Selanjutnya, pengukuran aktivitas enzim menggunakan metode asam dinitrosalisilat (DNS) yang didasarkan pada jumlah gula pereduksi sebagai hasil hidrolisis selulase. Metode DNS dipilih dalam pengujian ini karena merupakan metode yang umum digunakan untuk pengukuran aktivitas selulase dengan mengukur jumlah gula pereduksi yang terbentuk. Metode ini praktis dan mudah dilakukan untuk pengukuran sampel dalam jumlah yang banyak. Dalam mendegradasi selulosa menjadi glukosa, enzim endo-1,4- $\beta$ -glukanase, ekso-1,4- $\beta$ -glukanase, dan  $\beta$ -glukosidase bekerja secara sinergis (Lynd et al. 2002).

Setelah enzim endo-1,4- $\beta$ -glukanase memotong bagian amorphous, ekso-1,4- $\beta$ -glukanase memotong bagian ujung rantai selulosa kristalin menjadi gula pereduksi (Meryandini 2009). Prinsip pengujian dengan metode dinitrosalisilat adalah asam 3,5-dinitrosalisilat direduksi menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat (Harisha 2007). Gugus aldehid pada rantai polisakarida dioksidasi menjadi gugus karboksil, disaat yang bersamaan, gugus aldehid gula akan mereduksi asam dinitrosalisilat. Reaksi tersebut akan berlangsung terus-menerus selama terdapat gula pereduksi dalam larutan yang diujikan. Perubahan warna yang terjadi pada reagen DNS adalah dari warna kuning menjadi oranye kemerahan (Febriana 2010).

Konsentrasi gula pereduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa. Kurva standar yang diperoleh memiliki persamaan  $y = 3.6186x - 0.0575$  dengan nilai  $R^2$  sebesar 0.9926. Nilai limit deteksi kurva standar glukosa berdasarkan hasil perhitungan (Harvey 2000) sebesar 0.0152. Limit deteksi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko (Harvey 2000). Data dari penelitian ini, masih diatas limit deteksi kurva standar yang didapatkan. Konsentrasi gula pereduksi digunakan untuk menghitung aktivitas enzim. Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah mikromol glukosa yang dihasilkan oleh satu mL enzim setiap menit. Berdasarkan hasil uji kuantitatif isolat yang memiliki nilai aktivitas selulolitik tertinggi adalah JMF 12, yaitu sebesar  $0.7727 \pm 0.019$  U/mL. Setelah diuji kadar protein diperoleh nilai aktivitas spesifik. Isolat JMF 12 memiliki aktivitas spesifik tertinggi, yaitu  $2.7812 \pm 0.081$  U/mg. Jika dibandingkan hasil uji kuantitatif dengan uji kualitatif sebelumnya dalam penelitian ini terdapat perbedaan nilai aktivitas selulase tertinggi. Hasil uji secara kualitatif menunjukkan bahwa isolat JMF 11 yang memiliki aktivitas tertinggi, sedangkan secara kuantitatif isolat JMF 12 yang memiliki aktivitas tertinggi. Seleksi mikroba selulolitik secara kuantitatif

merupakan suatu konfirmasi dan hasilnya belum tentu tepat sama dengan penapisan daerah bening atau seleksi mikroba secara kualitatif. Hal ini disebabkan oleh kondisi lingkungan mikroba yang berbeda antara medium padat dengan kultur terendam atau medium cair saat pengujian karena mempengaruhi produksi enzim (Purwadaria et al. 2003). Terdapat kemungkinan JMF 12 yang berdasarkan hasil uji kuantitatif memiliki aktivitas spesifik tertinggi akan tetapi secara kualitatif tidak, merupakan mikroba yang memerlukan kadar oksigen yang tinggi untuk pertumbuhannya. Selain itu, Setiap mikroba selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan (Meryandini 2009). Uji kuantitatif enzim selulase dalam penelitian ini menggunakan substrat CMC. Substrat CMC merupakan substrat selulosa murni yang berbentuk *amorphous* sehingga aktivitas enzim selulase pada substrat CMC merupakan aktivitas enzim endo-1,4- $\beta$ -glukanase (Lynd et al. 2002). Endo-1,4- $\beta$ -glukanase bekerja pada rantai dalam CMC menghasilkan oligosakarida atau rantai selulosa yang lebih pendek (Lynd et al. 2002).

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) tahun anggaran 2014.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Alam M, Manchur M, Anwar M. 2004. Isolation, purification, characterization of cellulolytic enzymes produced by the isolate *Streptomyces omiyaensis*. Pak J Biol Sci. 7(10): 1647-1653.
- Anggarawati D. 2012. Aktivitas enzim selulase isolat SGS 2609 BBP4B-KP menggunakan substrat limbah pengolahan rumput laut yang dipretreatment dengan Asam [skripsi]. Depok (ID): Universitas Indonesia.
- Basuni Y. 2008. Aktivitas selulase dari *Ganoderma lucidum* yang diinkubasikan dalam media jerami padi [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
- Chandel A, Chan E, Rudravaram, Narasu M, Rao, Ravindra. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. Biotechnology and Molecular Biology Review. 2 (1): 14-32.
- Ezekiel C, Odebo A, Omenka R, Adesioye F.A. 2010. Growth response and comparative cellulase induction in soil fungi grown on different cellulose media. Acta ATECH. 3(2): 52-59.
- Febriana R. 2010. Optimasi aktivitas selulase ekstraseluler dari isolat bakteri RF-10 [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Fikrinda, Anas I, Purwadaria T, Santosa D. 2000. Isolasi dan seleksi bakteri penghasil selulase ekstremofil dari ekosistem air hitam. Mikrobiologi Indonesia. 5 (2): 48-53.
- Harisha S. 2007. Biotechnology Procedures and Experiments Handbook. Kanada : Infinity Sci Pr.
- Harvey D. 2000. Modern Analytical Chemistry. Singapore (SG): McGraw-Hill.
- Haryati T., Marbun P.A., Purwadaria T. 2010. Preservasi selulase *Bacillus pumilus* PU4-2 dengan teknik imobilisasi pada pollard dan penambahan kation. Mikrobiol Indonesia. 15(1): 63-71.
- Imas T. 2009. Mikrobiologi Esensial. Jakarta: Ardy Agency.

- Julfana R, Anita T, Idiawati N. 2013. Hidrolisis enzimatis selulosa dari ampas sagu menggunakan campuran selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. JKK. 2 (1): 52-57.
- Kim K.H, Jeong, J.S, Ham, C.B, Yang, I.B, Chung, M.K, Kim, K.N, Kim, J. Compost Sci. 2004. Isolation and characterization of cellulase secreting bacterium from cattle manure: application to composting. Compost Science & Utilization. 12: 242-248.
- Kodri, Dwi B, Yulianingsih R. 2013. Pemanfaatan enzim selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* sebagai katalisator hidrolisis enzimatis jerami padi dengan pretreatment microwave. Bioproses Komoditas Tropis. 1: 1.
- Koesnandar H, Nurhayati N. 2008. Recent development in the bioconversion of lignocelluloses into ethanol, Microbiology Indonesia. 2(3): 101-102.
- Lee Y. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. Bioresource Technology. 99: 378-386.
- Lynd L, Paul J, Willem H, Isak. 2002. Microbial cellulosa utilization: fundamentals and biotechnology. Micro. Mol. Bio. Rev. 66:506-577.
- Meryandini A, Widosari W, Maranatha Bt et al. 2009. Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. Makara Sains. 13 (1): 33-38.
- Mustika R, Martina A, Leni B, Zul D, Ramadhan N. 2013. Isolasi dan seleksi jamur selulolitik dari tanah gambut di perkebunan karet Desa Rimbo Panjang kabupaten kampar Riau. Lampung, Indonesia.
- Nugraha R. 2006. Produksi enzim selulase oleh *Penicillium nalgiovense* SS240 pada substrat tandan sawit [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Oramahi H, Darmadji P, Haryadi. 2003. Optimasi kadar asam dalam asap cair dari kayu karet dengan RSM [skripsi]. Yogyakarta (ID): Universitas Gadjah Mada.
- Perez J, Munoz , Rubia T, Martinez J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview. Int Microbiol. 5:53-63.
- Purwadaria T, Marbun P, Arnold, Ketaren P. 2003. Perbandingan aktivitas enzim selulase dari bakteri dan kapang hasil isolasi dari rayap. JITV. 8 :4.
- Sinatari, Aminin, Sarjono. 2013. Pemurnian selulase dari isolat KB kompos termofilik desa Bayat Klaten menggunakan fraksinasi amonium sulfat. Chem Info. 1: 130-140.
- Sunandar B. 2010. Budidaya Jamur merang. Jakarta: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Barat.
- Teather RM, Wood PJ. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl Environ Microbiol. 43(4):777-780.
- Tridasma E. 2006. Produksi selo-oligosakarida dari fraksi selulosa tongkol jagung oleh selulase *Trichoderma viride* [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Yang Y, Biedendieck R, Wang W, Gamer M, Malten M, Jahn D, Deckwer. 2006. High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. Microb Cell Fact. 20 (10):1-8
- Zhang Y-HP, Himmel ME, Mielenz JR. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. Biotechnol Adv. 24: 452-454.