



RINGKASAN

STUDI GEN PENYANDI ENZIM ENDOGLUKANASE DAN AKTIVITASNYA DARI BAKTERI SELULOLITIK *INDIGENOUS* BEKATUL SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO*

Akyunul Jannah, Aulanni`am, Tri Ardyati, Suharjono

Program Pascasarjana Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya, Malang

2019

Peningkatan produksi dan konsumsi beras berimbas pada peningkatan produk samping penggilingan padi, salah satunya adalah bekatul. Melimpahnya bekatul harus diimbangi dengan pemanfaatannya untuk meningkatkan nilai ekonominya. Bekatul dapat dimanfaatkan sebagai sumber glukosa melalui degradasi selulosa menggunakan enzim selulase. Enzim selulase diproduksi oleh jamur dan bakteri. Tingginya kadar selulosa dan nutrisi dalam bekatul berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produksi enzim selulase.

Penelitian ini bertujuan menginformasikan gen penyandi endoglukanase dan aktivitas enzim bakteri selulolitik *indigenus* bekatul sebagai upaya untuk meningkatkan pemanfaatan bekatul di Indonesia dan optimalisasi produksi enzim selulase. Bakteri selulolitik diisolasi dari bekatul yang berasal dari penggilingan padi beras putih jenis Ciherang. Isolat bakteri selulolitik terbaik dipilih berdasarkan hasil skrining secara kualitatif dan kuantitatif. Skrining secara kualitatif dilakukan dengan mengukur nilai indeks selulolitik pewarnaan *Congo red*, sedangkan secara kuantitatif dengan mengukur aktivitas enzim selulase meliputi endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase menggunakan metode DNS (Dinitrosalicylic acid). Isolat terpilih ditumbuhkan pada media CYPE (1 % CMC; 0,5 % pepton; 0,5 % ekstrak khamir; 0,1 % K_2HPO_4 ; 0,02 % $MgSO_4$ dan 0,5 % NaCl) untuk mengetahui kondisi optimum produksi enzim selulase pada variasi pH (5, 6, 7 dan 8), logam (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Na^+ dan Ca^{2+} dan suhu (30, 37, 45 dan 50 °C). Enzim selulase dimurnikan secara parsial menggunakan 80 % ammonium sulfat jenuh dan diukur aktivitas optimumnya pada variasi pH (6,7,8 dan 9), suhu (40, 50, 60 dan 70 °C) dan konsentrasi substrat CMC (1 %; 2 %; 3 %; 4 % dan 5 %) serta kinetika enzim. Bakteri selulolitik terpilih diidentifikasi secara fenotip dan molekular berdasarkan sekuen 16S rDNA. Gen endoglukanase dideteksi menggunakan primer *forward* (5'- TTCGCAGCAAGTGTAAACGGA-3') dan *revers* (5'- CTCGCCGTACATCGCATAGT-3'), dan diamplifikasi menggunakan mesin



PCR dengan pengaturan suhu pradenuaturasi 94 °C selama 4 menit, denaturasi 94 °C, 30 detik, annealing 54 °C, 30 detik dan extension 72 °C selama 1 menit dan perpanjangan akhir 72 °C selama 2 menit dengan siklus 35 kali.

Isolasi bakteri selulolitik *indigenus* bekatul didapatkan 2 isolat terpilih dari 22 isolat yaitu isolat BE 8 dan BE 14 dengan kemampuan selulolitik tertinggi dan secara *in vitro* kedua isolat memiliki sistem selulase yang lengkap yaitu aktivitas endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase, hal ini yang membedakan karakter isolat selulolitik *indigenus* bekatul dengan isolat selulolitik yang lain. Penambahan logam Mn^{2+} pada media produksi selulase isolat BE 8 dapat meningkatkan aktivitas selulase sebesar 2 % dibandingkan kontrol yaitu dari aktivitas 3,48 U/mL menjadi 3,55 U/mL. Pada media produksi selulase isolat BE 14, penambahan logam Na^+ meningkatkan aktivitas enzim sebesar 1 % dibandingkan kontrol yaitu dari aktivitas 3,20 U/mL menjadi 3,23 U/mL. Penambahan logam Co^{2+} dan Ca^{2+} pada media pertumbuhan isolat BE 8 menghasilkan aktivitas selulase masing-masing 2,32 dan 2,42 U/mL dibandingkan kontrol 3,48 U/mL dengan penurunan masing-masing sebesar 33,33 % dan 30,46 %. Pengaruh logam Co^{2+} dan Ca^{2+} pada media pertumbuhan isolat BE 14 diperoleh aktivitas masing-masing 1,87 dan 2,9 U/mL. Aktivitas tersebut menurun dibandingkan aktivitas kontrol 3,2 U/mL, dengan penurunan masing-masing 41,56 % dan 9,38 %. Produksi enzim selulase kedua isolat optimum pada pH 7 dan suhu 37 °C dan aktivitas masing-masing 2,82 U/mL dan 3,55 U/mL. Aktivitas spesifik enzim selulase hasil pemurnian parsial meningkat 5,8 kali untuk isolat BE 8, aktivitas optimumnya pada konsentrasi substrat 5 %, pH 5 dan suhu 60 °C. Isolat BE 14 aktivitas spesifik meningkat 3,2 kali dengan aktivitas optimumnya pada konsentrasi substrat 5 %, pH 6 dan suhu 60 °C. Isolat BE 8 mempunyai nilai V_{max} sebesar 4,5537 U/mL dan K_M sebesar 0,6184 % (6,184 mg/mL). Isolat BE 14 mempunyai nilai V_{max} sebesar 4,1981 U/mL dan K_M sebesar 1,1156 % (11,156 mg/mL).

Identifikasi secara fenotipik dan filogenetik, isolat BE 8 merupakan *Bacillus subtilis* dengan similaritas 100 %, sedangkan isolat BE 14 merupakan *Bacillus cereus* dengan similaritas 99,9 %. Isolat BE 8 dan isolat BE 14 memiliki Gen endoglukanase masing-masing berukuran 862 bp (246 asam amino) dan 874 bp (263 asam amino). Secara *in silico* Gen endoglukanase isolat BE 8 mempunyai domain katalitik selulase yang di dalamnya ditemukan gen *BglC*, CBM (*Cellulose Binding Module*) yang merupakan daerah pengikatan enzim dengan substrat pada residu 228 – 246, sisi aktif pada asam amino Asp44, Glu84 dan Glu172; termasuk dalam



kelompok Glikosil Hidrolase/GH1 dan GH5. Gen endoglukanase isolat BE 14 mempunyai domain yang mengandung Gen *BscZ* yang merupakan karakter endo- β -1,4-glukanase Y ditemukan pada urutan basa 25-152, Glu74 dan Asp131, merupakan penanda sisi aktif dari endoglukanase isolat BE 14; termasuk dalam kelompok Glikosil Hidrolase 8 (GH 8). Secara fungsional, sekuen protein gen pengkode endoglukanase isolat BE 8 dan BE 14 memiliki aktivitas selulase khususnya endoglukanase yang ditunjukkan adanya domain selulase dan sisi aktif glutamat dan aspartat. Hasil penelitian ini menguatkan bahwa isolat bakteri selulolitik *indigenus* bekatul mempunyai sistem selulase yang lengkap dengan adanya enzim kelompok GH1, GH5 untuk isolat BE8 dan enzim kelompok GH8 isolat BE 14.



SUMMARY

STUDY ON ENDOGLUCANASE ENCODING GENE AND CELLULOLYTIC ACTIVITIES OF INDIGENOUS BACTERIA FROM RICE BRAN BY IN VITRO AND IN SILICO ANALYSIS

Akyunul Jannah, Aulanni`am, Tri Ardyati, Suharjo
Postgraduate Program, Biology Department, Faculty of Mathematic and Natural Sciences
Brawijaya University
2019

Increasement production of rice and consumption causes the increase of by product of rice milling, one of which is rice bran. The abundance of rice bran should be followed by the balance of their utilization, in order to increase the economic value. Rice bran has possibility to be used as source of glucose through cellulose degradation using cellulase enzymes produced by fungi and bacteria. The high content of cellulose and nutrients in rice bran affected the growth and production of cellulase enzymes.

The objective of this were to elaborate endoglucanase-coding genes and enzymatic activities of rice bran indigenous cellulolytic bacteria to increase the utilization of Indonesia rice bran and to optimize the cellulase production. The cellulolytic bacteria used in this study was isolated from rice bran white rice mill variety Ciherang. The best cellulolytic bacterial isolate was selected based on the qualitatively screening and quantitatively. Qualitative screening was carried out by measuring the cellulolytic index using Congo red staining, while quantitatively by measuring cellulase activity including endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase using DNS (Dinitrosalicylic acid) method. Selected isolates were grown on CYPE (1 % CMC; 0,5 % peptone; 0,5 % yeast extract; 0,1 % K_2HPO_4 ; 0,02 % $MgSO_4$ and 0,5 % NaCl) medium observed to obtain the optimum for condition cellulase production at various pH (5, 6, 7 dan 8), metal ions (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Na^+ dan Ca^{2+}) and temperature (30, 37, 45 dan 50 °C). The cellulase were partially purified using 80% saturated ammonium sulfate to obtain the optimum activity at various pH (6,7,8 dan 9), temperature (30, 40, 50, 60 dan 70 °C), substrate concentration of CMC (1 %; 2 %; 3 %; 4 % dan 5 %) and enzyme kinetics. The cellulolytic bacteria was identified phenotypically and phylogenetically based on 16S rDNA sequences. The endoglucanase gene was detected using a forward primer (5'-TTCGCAGCAAGTGTAAACGGA-3') and reverse (5'-CTCGCCGTACATCGCATAGT-3'), and amplified using PCR machine with



condition of predenaturation at 94 °C for 4 minutes, denaturation of 94 °C, 30 seconds, annealing at 54 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 1 minute and final extension of 72 °C for 2 minutes with 35 cycle.

Isolation of cellulolytic indigenous bacteria of rice bran resulted 2 isolates from 22 isolates, namely BE 8 and BE 14 with the highest cellulase activity and in vitro analysis complete cellulase system containing endoglucanase activity, exoglucanase and β -glucosidase, this characteristics cellulolytic isolates indigenous of rice bran with others. Both isolate BE 8 and BE 14 able to produce cellulase enzymes at pH 7, addition of metal ion Mg^{2+} and temperature 37 °C. Addition of metal ion Mn^{2+} to cellulase production of BE 8 isolate increase cellulase activity by 2% compared to control ie from 3.48 U/mL to 3.55 U/mL. In cellulase production media BE 14 isolates, the addition of metal Na^+ increased the cellulase activity by 1% compared to control ie from the activity of 3.20 U/mL to 3.23 U/mL. Addition metal ion of Co^{2+} and Ca^{2+} on BE 8 isolate growth medium produced cellulase activity of 2.32 and 2.42 U/mL respectively compared to control of 3.48 U/mL with a decrease of 33.33 % and 30.46 % respectively. The effect metals ion of Co^{2+} and Ca^{2+} on growth medium of BE 14 isolates was obtained by activities of 1.87 and 2.9 U/mL respectively. These activities decreased compared to control activities 3.2 U/mL, with decreases of 41.56 % and 9.38 % respectively. Both isolate BE 8 and BE 14 able to produce cellulase optimal at pH 7 and temperature 37 °C and cellulase activity 2,82 U/mL and 3,55 U/mL respectively. The specific activity of cellulase from partial purification were increased 5.8 times for BE 8 isolates and 3.2 times for BE 14 isolates, respectively. The optimum activity was at 60 °C, 5% CMC, and pH 5 for BE 8 isolate. The optimum activity of BE 14 isolate at 60 °C, 5% CMC and pH 6. Value of V_{max} of BE 8 isolate showed of 4.5537 U/mL and K_M of 0.6184 % (6.184 mg/mL). V_{max} values of BE 14 isolate showed of 4.1981 U/mL and K_M of 1.1156 % (11.156 mg/mL).

Identification base on phenotypic and phylogenetic of BE 8 isolate was *Bacillus subtilis* with similarity 100 %, while BE 14 isolate was *Bacillus cereus* 99,9 % of similarity. Endoglucanase genes of BE 8 isolate and BE 14 isolate were 862 bp (246 amino acid) and 874 bp (263 amino acid). In silico analysis showed that endoglucanase gene BE 8 isolate had a catalytic cellulase domain with *BglC* gene and CBM (Cellulose Binding Module). Enzyme binding region with substrate was at residue 228 - 246, active site of amino acids were Asp44, Glu84 and Glu172 included in Glycosyl Hydrolase/GH1 and GH5 group. Endoglucanase gene of



BE 14 isolate had a domain containing BscZ gene with the character of endo-1,4-glucanase-Y found in base sequence of 25-152. The active site were Glu74 and Asp131 of endoglucanase BE 14 isolates belongs to Glycosyl Hydrolase 8 (GH8) group. Functionally, the protein sequences of the endoglucanase-encoding genes BE 8 and BE 14 isolates had endoglucanase activity, indicated by the presence of cellulose domain and glutamate and aspartate as active sites. The results of this study to confirm that cellulolytic bacterial indigenous of rice bran has a complete cellulase system in the presence of the GH1 and GH5 for isolate BE 8 and GH8 for isolate BE 14.



DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
SUMMARY	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Bekatul	8
2.2 Media Pertumbuhan Bakteri Selulolitik	9
2.2.1 Sumber karbon dalam media produksi selulase	9
2.2.2 Sumber nitrogen dalam media produksi selulase..	10
2.3 Produksi Enzim Selulase	11
2.3.1 Kondisi kultur dan lingkungan pada produksi	11
enzim selulase	11
2.3.2 Efek ion logam	12
2.3.3 Inhibitor	12
2.4 Pemurnian Enzim	13
2.5 Faktor-Faktor Yang Memengaruhi Sistem Induksi	15
Untuk Produksi selulase	15
2.6 Organisasi Gen Penyandi Selulase	16
2.6.1 Gen Endoglukanase	17
2.6.2 Gen Eksoglukanase	19
2.6.3 Gen β -1,4-glukosidase	19
2.7 Sumber-Sumber Enzim Selulase	20
2.8 Kerangka Konsep Penelitian	22
BAB III METODE PENELITIAN	25
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	25
3.2 Kerangka Operasional	25
3.3 Isolasi dan Skrining Bakteri Selulolitik dari bekatul	26
3.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Selulolitik	27
3.5 Pembuatan Starter	28
3.6 Uji Aktivitas Enzim Selulase Kasar Menggunakan	28



Metode DNS	28
3.6.1 Pembuatan kurva standar glukosa menggunakan metode DNS	28
3.6.2 Uji Aktivitas Endo- β -1,4-glukanase	29
3.6.3 Uji Aktivitas Ekso- β -1,4-glukanase	29
3.6.4 Uji Aktivitas β -glukosidase	30
3.7 Optimasi Produksi Enzim Selulase oleh Bakteri <i>Indigenus</i> Bekatul	30
3.7.1 Optimasi Produksi Selulase dengan Variasi pH ...	30
3.7.2 Optimasi Produksi Selulase dengan Variasi logam	31
3.7.3 Optimasi Produksi Selulase dengan Variasi Suhu	31
3.8 Produksi Enzim Selulase Pada Kondisi Optimum	31
3.9 Dialisis Ekstrak Enzim	32
3.10 Optimasi Aktivitas Enzim Selulase Hasil Pemurnian Parsial	32
3.10.1 Optimasi aktivitas dan kestabilan enzim selulase pada variasi pH	32
3.10.2 Optimasi aktivitas dan kestabilan enzim selulase pada variasi suhu	33
3.10.3 Penentuan V_{max} dan K_M enzim selulase hasil pemurnian parsial	33
3.11 Identifikasi Bakteri Selulolitik	34
3.11.1 Identifikasi bakteri selulolitik secara fenotip menggunakan Microbact 12E	34
3.11.2 Identifikasi bakteri secara filogenetik menggunakan 16S rDNA	34
3.12 Identifikasi Gen Penyandi Endoglukanase	36
3.12.1 Desain primer	36
3.12.2 Amplifikasi gen penyandi endoglukanase menggunakan PCR	37
3.12.3 Sekuensing dan analisis gen endoglukanase	37
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Kondisi Optimum Produksi Enzim Selulase oleh Isolat Bakteri <i>Indigenus</i> Bekatul	39
4.1.1 Bakteri selulolitik <i>indigenus</i> bekatul	39
4.1.2 Kurva pertumbuhan isolat bakteri selulolitik terpilih	41
4.1.3 Aktivitas enzim secara kuantitatif	44
4.1.4 Produksi optimum enzim selulase bakteri selulolitik <i>indigenus</i> bekatul	47
4.2 Aktivitas Enzim Selulase Hasil Pemurnian Parsial Isolat Bakteri Terpilih	52
4.2.1 Pengaruh suhu pada aktivitas ezim selulase hasil pemurnian parsial	53



4.2.2 Pengaruh pH terhadap aktivitas ezim selulase hasil pemurnian parsial	55
4.2.3 Kinetika enzim selulase	57
4.3 Spesies Bakteri Selulolitik <i>Indigenous</i> Bekatul	59
4.3.1 Karakteristik fenotip bakteri selulolitik	59
4.3.2 Identifikasi spesies bakteri selulolitik berdasarkan sekuen 16S rDNA	62
4.4 Karakterisasi Gen Pengkode Enzim Selulase	64
4.4.1 Gen pengkode endoglukanase isolat BE 8	67
4.4.2 Karakter gen pengkode endoglukanase isolat BE 14	76
4.5 Pembahasan Umum Hasil Penelitian	82
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	86
5.1 Kesimpulan	86
5.2 Saran	86
DAFTAR PUSTAKA	88
LAMPIRAN	98



DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Agen <i>Presipitasi</i> protein	14
2	Komposisi kimia bekatul	39
3	Klasifikasi reaksi enzim ekstraselular	40
4	Laju pertumbuhan isolat bakteri selulolitik pada fase akhir eksponensial	43
5	Aktivitas enzim β -1,4-endoglukanase (CMCase), eksoglukanase (avicelase) dan glukosidase (Selobiase) 6 isolat terpilih	45
6	Aktivitas selulase sebelum dan setelah pemurnian secara parsial untuk Isolat BE 8 dan isolate BE 14	52
7	Karakteristik fenotip bakteri selulolitik isolat BE 8, BE 14 dan <i>Bacillus</i> acuan	61
8	Nilai similaritas gen pengkode endoglukanase isolat BE dibandingkan dengan gen endoglukanase dari isolat acuan	67



DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Bekatul (<i>Rice Bran</i>)	8
2	Ion-ion pembentuk garam	14
3	Skema sederhana dari hidrolisis selulosa amorf dan mikrokrystal oleh sistem selulase	17
4	Diagram domain endoglukanase endoglukanase	18
5	Kerangka Konsep Penelitian	22
6	Kerangka Operasional Penelitian	26
7	Potensi bakteri selulolitik <i>Indigenous</i> bekatul	40
8	Kurva pertumbuhan isolat bakteri terpilih	42
9	Aktivitas selulase pada variasi pH media produksi waktu inkubasi 24 jam	47
10	Aktivitas selulase pada variasi logam media produksi	49
11	Aktivitas selulase pada variasi suhu media produksi	51
12	Aktivitas enzim isolat BE 8 dan BE 14 pada variasi suhu	53
13	Stabilitas suhu enzim isolat BE 8 dan BE 14	54
14	Aktivitas enzim isolat BE 8 dan BE 14 pada variasi pH	55
15	Stabilitas pH enzim isolat BE 8 dan BE 14	56
16	Aktivitas enzim selulase isolat BE 8 dan BE 14 pada berbagai konsentrasi substrat CMC	57
17	Hubungan $1/V$ dengan $1/S$ berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk isolat BE 8 dan BE 14	58
18	Dendogram yang menunjukkan similaritas isolat BE dengan Genus <i>Bacillus</i>	60
19	Dendogram yang menunjukkan similaritas antar strain isolat BE 8, BE 14 dengan genus <i>Bacillus</i> acuan	62
20	Pohon filogeni yang menunjukkan kekerabatan antar isolat-isolat bakteri selulolitik dengan bakteri acuan berdasarkan sekuen 16S rDNA dengan algoritma Likelihood	63
21	Pita gen pengkode endoglukanase isolat bakteri selulolitik <i>indigenous</i> bekatul	65
22	Pohon filogeni berdasarkan sekuen gen endoglukanase isolat BE 8 dan BE 14 dengan isolat acuan menggunakan algoritma Tamura-Nei Bootstrap 1000	66
23	<i>Start</i> dan <i>stop codon</i> hasil pensejajaran nukleotida gen pengkode endoglukanase isolat BE 8 terhadap gen endoglukanase dari berbagai strain <i>Bacillus subtilis</i>	68
24	Domain fungsional gen pengkode endoglukanase isolat BE 8	69
25	Daerah sisi aktif gen endoglukanase <i>Bacillus subtilis</i>	70
26	Mekanisme reaksi hidrolisis selulosa oleh enzim Glikosil Hidrolase (GHs) melalui reaksi <i>Double displacement</i> yang	



melibatkan reaksi antara donor proton dan nukleofil terhadap substrat

27	Mekanisme katalitik dari kelompok enzim GH1 dalam menghidrolisis ikatan β -glikosidik	71
28	Struktur protein isolat BE 8 (<i>Bacillus subtilis</i>), (b) <i>Bacillus subtilis</i> sdau9506 (GHs)	72
29	Interaksi protein endoglukanase protein isolat BE 8 dengan substrat selobiosa	73
30	Daerah <i>ORF</i> dari isolat BE 14 (<i>Bacillus cereus</i>)	74
31	Domain katalitik gen endoglukanase <i>Bacillus cereus</i>	77
32	Mekanisme reaksi hidrolisis oleh enzim GH8	78
33	Daerah sisi aktif gen endoglukanase isolat BE 14	78
34	Struktur protein endoglukanase	79
35	Interaksi antara endoglukanase isolat BE 14 dengan substrat selobiosa secara <i>In silico</i>	80
		81



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Potensi bakteri selulolitik hasil isolasi dari bekatul	98
2	Morfologi isolat bakteri selulolitik	99
3	Uji Kualitatif Bakteri selulolitik menggunakan <i>Congo red</i>	100
4	Sifat Gram isolat bakteri selulolitik terpilih	103
5	Kurva standar glukosa	104
6	Kurva standar jumlah sel	106
7	Pertumbuhan isolat bakteri selulolitik terpilih	107
8	Optimasi produksi enzim selulase	109
9	Karakterisasi enzim selulase hasil pemurnian parsial	110
10	Data Fenotip isolat bakteri selulolitik terpilih	115
11	Sekuen 16S rDNA isolat bakteri selulolitik	116
12	Analisis molekuler gen endoglukanase	119
13	Analisis data menggunakan metode statistik SPSS versi 16	141
14	Publikasi Jurnal Internasional "Indonesian Journal of Chemistry" ..	149
15	Seminar Internasional	157



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
Bgl	betaglucosidase
bp	base pair
CBH	cellobiohidrolase
CBM	carbohydrat binding module
CMC	carboxymethyl cellulose
CMCase	carboxymethyl cellulase
DNS	dinitrosalysilyc acid
g	gram
kDa	kilo Dalton
mM	miliMolar
mL	mililiter
PCR	polimorphisme chain reaction
DNA	deoxyribonucleotide
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SSF	solid state fermentation
μL	microliter
rpm	rotation per minute
OD	optical density
aa	asam amino
GH	glycosil hydrolase
ORF	open reading frame



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil dan pengguna beras terbanyak di Asia. Pemerintah Indonesia menargetkan produksi beras tahun 2017 meningkat 3,9 % dari 72 juta ton pada tahun 2016 menjadi 77 juta ton (Badan Ketahanan Pangan, 2016). Peningkatan produksi dan konsumsi beras ini berimbas pula pada peningkatan produk samping penggilingan padi, salah satunya adalah bekatul. Bekatul diperoleh dari penggilingan padi pada penyosohan II sebesar 17 % (Moongngarm *et al.*, 2012). Melimpahnya bekatul ini harus diimbangi dengan pemanfaatannya sebagai produk olahan yang bermanfaat untuk meningkatkan nilai ekonominya.

Pemanfaatan bekatul di Indonesia sebagian besar digunakan untuk pakan ternak dan sebagian kecil digunakan untuk produk olahan makanan. Alternatif pemanfaatan bekatul yang lain adalah sebagai penghasil glukosa melalui degradasi selulosa dalam bekatul menggunakan enzim selulase. Glukosa banyak dimanfaatkan oleh industri makanan, minuman, bahan baku pembuatan bioetanol, sebagai prekursor untuk pembuatan vitamin C, asam sitrat, asam glukonat, asam polilaktat, dan sorbitol.

Enzim selulase dapat diproduksi oleh mikroorganisme seperti jamur dan bakteri selulolitik. Mikroorganisme penghasil selulase dari kelompok bakteri memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk mendegradasi selulosa menjadi lebih pendek (Miranda *et al.*, 2009). Bakteri menghasilkan molekul selulase yang lebih kecil dibandingkan dengan jamur sehingga lebih mudah untuk berdifusi ke jaringan tumbuhan yang mengandung selulosa (Pandey *et al.*, 2014) atau laju pertumbuhan lebih cepat, mudah beradaptasi pada lingkungan ekstrim dan lebih mudah dilakukan rekayasa genetika (Ariffin *et al.*, 2006).

Beberapa jamur penghasil enzim selulase menghasilkan sistem selulase yang tidak lengkap sehingga berpengaruh pada kinerjanya dalam mendegradasi selulosa. Komposisi endoglukanase dan eksoglukanase *Trichoderma reesei* sebesar 80 % dan β -glukosidasenya lebih rendah sehingga produk utama hidrolisisnya bukan glukosa namun selobiosa (Ahmed



& Vermette, 2008). Salah satu jamur yang biasa dimanfaatkan untuk hidrolisis selulosa adalah *Aspergillus niger*. Jamur ini menghasilkan endo- β -1,4-glukanase, ekso- β -1,4-glukanase rendah dan β -glukosidase tinggi (Juhasz *et al.*, 2003). Kim & Kim (1993) melaporkan bahwa *Bacillus circulans* mempunyai aktivitas tinggi CMCase (endo- β -1,4-glukanase), aviselase (ekso- β -1,4-glukanase) dan β -glukosidase. Berdasarkan hal tersebut maka pada penelitian ini dilakukan isolasi bakteri selulolitik *indigenus* bekatul sebagai penghasil enzim selulase dengan harapan diperoleh sistem selulase yang lengkap dan efisien untuk hidrolisis selulosa yang sesuai untuk substrat bekatul.

Bakteri selulolitik dapat diperoleh dari biomassa yang kaya selulosa khususnya dari limbah pertanian seperti ampas tebu, dedak, jerami, bekatul, dan lain sebagainya. Rahna *et al.* (2013) menyatakan bahwa habitat yang kaya substrat selulosa merupakan sumber terbaik untuk isolasi mikroorganisme selulolitik. Kadar karbohidrat dalam bekatul sebesar 25 % (22-25 % serat tidak larut (selulosa) dan 0,1-1,5 % serat terlarut) (Faria *et al.*, 2012), dalam ampas tebu sebesar 37,65 % (Husin, 2007), dedak mengandung selulosa sebesar 10,38 % (Butt *et al.*, 2004) dan jerami sebesar 37,71 % (Fadel & MacKill, 1994). Selulosa dalam ampas tebu dan jerami kadarnya lebih besar jika dibandingkan dengan kadar selulosa dalam bekatul, akan tetapi kandungan nutrisi dalam bekatul lebih lengkap antara lain adanya 14,9 % protein; 12,5 % lemak, dan 2,1 % abu (mineral) (Ardiansyah, 2010). Kandungan protein dan mineral dalam ampas tebu dan jerami rata-rata ≤ 1 % (Fadel & MacKill, 1994; Husin, 2007). Bekatul memiliki mikronutrien vitamin (seperti *Thiamin*, *Niacin*, vitamin B-6, vitamin E, vitamin B kompleks, dan *Riboflavin*), mineral (besi, fosfor, magnesium, kalium, potassium, kalsium, mangan, aluminium, klor, silikon, natrium dan seng) dan lain-lain (Widowati, 2001). Mikronutrien tersebut penting karena mikroorganisme secara umum membutuhkan nutrisi untuk mendukung pertumbuhan selnya selain makronutrien (Prescott *et al.*, 1999).

Kandungan nutrisi bekatul sangat berpotensi bagi berlangsungnya kehidupan mikroorganisme selulolitik karena tingginya kadar selulosa dan ketersediaan media pendukung yang lengkap seperti protein dan mineral. Bajaj *et al.* (2009) telah mengisolasi *Bacillus* strain M-9 *indigenus* bekatul yang terdekomposisi dan mampu memproduksi endoglukanase secara signifikan pada media CYPE (pH 9-10). Nirmala & Shindu (2011)



juga telah mengisolasi *Bacillus circulans indigenus* bekatul yang terdekomposisi dan mampu memproduksi endoglukanase pada media CYPE pada pH 9-10.

Kemampuan mikroorganisme dalam memproduksi enzim selulase dikendalikan oleh gen yang berbeda-beda dan dipengaruhi oleh ketersediaan selulosa sebagai substrat dalam media pertumbuhannya. Enzim selulase bersifat inducibel, bisa diproduksi ketika terdapat substrat selulosa. Beberapa hal yang menentukan keberhasilan hidrolisis selulosa antara lain aktivitas enzim selulase, mikroorganisme penghasil enzim selulase dan sumber selulosa yang digunakan (Bhat, 2000). Bekatul merupakan sumber selulosa yang perlu dieksplorasi lebih banyak lagi pemanfaatannya terutama sebagai sumber bakteri selulolitik, sehingga diperoleh enzim selulase yang cocok untuk substrat bekatul dengan karakteristik gen yang dimiliki. Bekatul dari jenis padi yang berbeda memengaruhi kadar selulosa yang terdapat di dalamnya. Hal tersebut juga memengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik. Pada penelitian ini menggunakan bekatul padi varietas Ciherang Indonesia, dan pada uji pendahuluan diketahui kadar selulosanya sebesar 22,2 %. Padi varietas Ciherang termasuk padi varietas unggul dan banyak ditanam oleh petani Indonesia khususnya petani Kabupaten Malang yaitu sekitar 47 % dari total varietas yang ditanam (Ihsan, 2011; Sukarelawati, 2017). Bakteri *indigenus* merupakan bakteri asli yang mendiami suatu ekosistem tertentu (seperti dalam tanah atau permukaan dalam dan luar makhluk hidup) dari hasil proses alami tanpa campur tangan manusia yang berperan pada proses biodegradasi, biobleaching, biocomposting, fiksasi nitrogen, meningkatkan kesuburan tanah dan juga dalam produksi hormon pertumbuhan tanaman (Kumar & Gopal, 2015). Penggunaan bakteri *indigenus* bekatul sebagai sumber enzim selulase sudah banyak dilakukan (Bajaj *et al.*, 2009; Nirmala & Shindu, 2011), dan pemanfaatan bekatul sebagai media produksi enzim selulase (Kodali & Pogaku, 2006; Khan *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2012). Pada penelitian tersebut masih mempelajari tentang karakterisasi, optimasi dan pemurnian enzim selulase isolat bakteri selulolitik *indigenus* bekatul, sehingga pada penelitian ini dilakukan analisis terhadap gen yang berperan dalam menyandi enzim selulase serta aktivitas enzimatis selulase isolat bakteri selulolitik *indigenus* bekatul dari padi *Strain* lokal Indonesia sehingga diharapkan dapat meningkatkan aktivitas enzim, efisiensi dan spesifitas substrat selulosa.



Enzim selulase merupakan sistem multienzim yang terdiri atas kompleks endo- β -1,4-glukanase (CMCase; EG; EC 3.2.1.4), ekso- β -1,4-glukanase (selobiohidrolase; CBH; EC 3.2.1.91), dan β -1,4-glukosidase (GH; EC 3.2.1.21). Sistem enzim tersebut bekerja secara sinergi untuk mendegradasi substrat selulosa menjadi glukosa. Mula-mula enzim endo- β -1,4-glukanase mendegradasi secara acak ikatan non kovalen dalam struktur amorf selulosa menghasilkan rantai glukon dengan panjang yang berbeda-beda, selanjutnya enzim ekso- β -1,4-glukanase menghidrolisis pada ujung rantai selulosa untuk memecah struktur polimer menjadi gula yang lebih pendek seperti selobiosa dan terakhir enzim β -1,4-glukosidase menghidrolisis disakarida (selobiosa) dan tetrasakarida menjadi glukosa (Singh, 1999). Enzim endo- β -1,4-glukanase mempunyai peranan penting dalam inisiasi hidrolisis selulosa. Beberapa endo- β -1,4-glukanase juga memiliki aktivitas endo dan eksoglukanase seperti *Cytophaga hutchinsonii* (Zhu *et al.*, 2013) dan *Saccharophagus degradans* (Watson *et al.*, 2009) sehingga mampu menghidrolisis selulosa dengan cepat. Kinerja endo- β -1,4-glukanase yang demikian disebut endoglukanase prosesif. Menurut Watson *et al.* (2009) apabila endoglukanase prosesif digabungkan dengan β -glukosidase sudah cukup untuk degradasi selulosa sehingga enzim ini sangat diminati. Pada industri biorefineri selulosa, biaya koktail enzim menjadi penghalang utama ekonomi perusahaan, maka perlu dicari endoglukanase yang bekerja secara efisien untuk menghasilkan glukosa. Sebagian besar endoglukanase prosesif dimiliki keluarga GH9 dan GH5. Endoglukanase prosesif EG5C-1 *Bacillus subtilis* BS-5 yang termasuk dalam famili GH5 memiliki rasio aktivitas yang tinggi antara eksoglukanase terhadap endoglukanase sehingga mampu menghidrolisis selulosa terlarut seperti CMC dan selulosa tidak larut seperti *Phosphoric acid-swollen cellulose* (PASC), *p*-nitrofenil- β -D-cellobiosida, filter paper (FP) dan avicel dengan aktivitas masing-masing 4170, 700, 2550, 405 and 320 U/ μ mol (Wu *et al.*, 2018)

Pola degradasi enzim selulase menggambarkan karakter fenotip dari mikroorganisme tersebut. Karakter fenotip merupakan kombinasi dari ekspresi genetik dan pengaruh lingkungan. Ekspresi gen dapat dilihat dari karakter-karakter pada suatu sekuen gen, diantaranya domain fungsional, sisi aktif, motif protein, analisis homologi, konstruksi pohon filogeni dan sebagainya melalui penggunaan perangkat bioinformatika (*in silico*). Ekspresi gen dapat digunakan sebagai dasar untuk meningkatkan aktivitas dan produksi enzim



khususnya enzim selulase. Gen enzim selulase dari mikroorganisme aerobik baik gen endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase dikode oleh +1500 pasangan basa (bp) yang mengandung domain katalitik, *Cellulose Binding Module* (CBM) dan protein *Linker Flexible*. Domain katalitik merupakan daerah pengikatan substrat dengan enzim, sedangkan CBM berfungsi mengenali dan meningkatkan interaksi antara enzim selulase dengan permukaan selulosa. Semakin besar afinitas pengikatan CBM maka konversi selulosa menjadi molekul yang lebih kecil semakin besar pula. Pada substrat CMC dan selulosa amorf biasanya selulase tidak memerlukan CBM untuk hidrolisis. Protein *Linker Flexible* merupakan protein pendek yang menghubungkan dua domain protein. Eksplorasi endoglukanase masih terus dilakukan untuk mendapatkan aktivitas dan efisiensi yang tinggi. Enzim endoglukanase memiliki peranan penting dalam inisiasi hidrolisis selulosa namun selama ini masih belum dapat memenuhi persyaratan yang diperlukan dalam industri (Nurachman *et al.*, 2010), sehingga pada penelitian ini dilakukan karakterisasi gen endoglukanase dari isolat bakteri selulolitik *indigenous* bekatul.

Gen penyandi selulase bakteri *Anaerocellum thermophilum* yaitu *CelA* mempunyai berat molekul 230 kDa mengkode 1711 asam amino (berat molekul 190 kDa) yang terdiri dari dua domain katalitik yang homolog dengan kelompok *Glycosyl Hidrolase* (GH) 9 dan GH48 serta tiga domain homolog dengan keluarga *Cellulose binding module* (CBM) tipe 3 dihubungkan oleh Pro - Thr - Ser. Gen endoglukanase *CelZ Clostridium stercorarium* memiliki domain GH9 dan eksoglukanase *CelY* memiliki domain GH48 (Zverlov *et al.*, 1997). Karakter gen endoglukanase bakteri *Bacillus subtilis* BSn5, *Bacillus subtilis* dan *Bacillus amyloliquefaciens* hasil isolasi dari rumput laut memiliki domain katalitik GH5 dan domain CBM tipe 3 (CBM3) (Pertiwi, 2014). Endoglukanase *Bacillus cereus* F65185 mempunyai ukuran sekuen 1500 bp/499 aa dengan posisi domain katalitik pada protein 78-391 dan merupakan golongan GH5 (*Cellulase A*) (Zwick *et al.*, 2012).

Enzim selulase secara umum banyak digunakan dalam aplikasi industri dan dituntut menjadi enzim yang lebih stabil, sangat aktif dan spesifik. Pemanfaatan bekatul sebagai penghasil glukosa harus memerhatikan penggunaannya. Menurut Demain (2000) kebutuhan industri akan enzim meningkat sebanyak 1,6 billion US dollar, 60 % dipenuhi oleh negara-negara di Eropa dan 40 % dari USA dan Jepang. Diperkirakan 75 % kebutuhan enzim untuk



industri adalah enzim golongan hidrolase salah satunya adalah enzim selulase. Enzim selulase menjadi teknologi yang paling menjanjikan di masa depan sehingga dibutuhkan penelitian berkelanjutan untuk kemajuan dalam aspek untuk pengolahan selulosa (seperti biaya, spesifisitas substrat, dan aktivitas spesifik) yang diinginkan untuk mencapai peningkatan secara ekonomi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana kondisi optimum produksi enzim selulase oleh isolat bakteri selulolitik *indigenous* bekatul?
2. Bagaimana aktivitas enzim selulase dari isolat bakteri *indigenous* bekatul hasil pemurnian parsial?
3. Apakah nama spesies isolat bakteri *indigenous* bekatul yang mempunyai kemampuan selulolitik paling tinggi?
4. Bagaimana karakter gen endo- β -1,4-glukanase dari isolat bakteri selulolitik *indigenous* bekatul secara *in vitro* dan *in silico*?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menganalisis kondisi optimum produksi enzim selulase oleh isolat bakteri selulolitik *indigenous* bekatul.
2. Mengevaluasi aktivitas enzim selulase isolat bakteri *indigenous* bekatul hasil pemurnian parsial.
3. Mengidentifikasi spesies isolat bakteri *indigenous* bekatul yang mempunyai kemampuan selulolitik paling tinggi.
4. Membuktikan gen endo- β -1,4-glukanase dari isolat bakteri selulolitik secara *in vitro* dan *in silico*.



1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini antara lain:

1. Bagi peneliti

- a. Memperoleh isolat bakteri yang berpotensi sebagai penghasil enzim selulase.
- b. Memberikan data dan informasi ilmiah mengenai karakter-karakter fenotip, molekular dan gen endoglukanase bakteri penghasil enzim selulase.
- c. Mengembangkan dan menerapkan Ilmu Mikrobiologi dan Genetika dalam identifikasi bakteri penghasil enzim selulase.

2. Bagi masyarakat akademisi

- a. Membuka peluang untuk penelitian selanjutnya, tentang potensi enzim selulase untuk hidrolisis bekatul menjadi glukosa.
- b. Memperkaya informasi sumber daya alam yang mempunyai potensi untuk ditemukannya bakteri penghasil enzim selulase.
- c. Memberikan informasi yang luas tentang biodiversitas mikroorganisme Indonesia dan membuka peluang untuk eksplorasi enzim-enzim lainnya.

3. Bagi masyarakat umum

- a. Hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan oleh industri pangan untuk hidrolisis substrat selulosa khususnya bekatul menjadi glukosa.
- b. Memberikan nilai ekonomi bekatul yang lebih tinggi sebagai sumber penghasil glukosa.

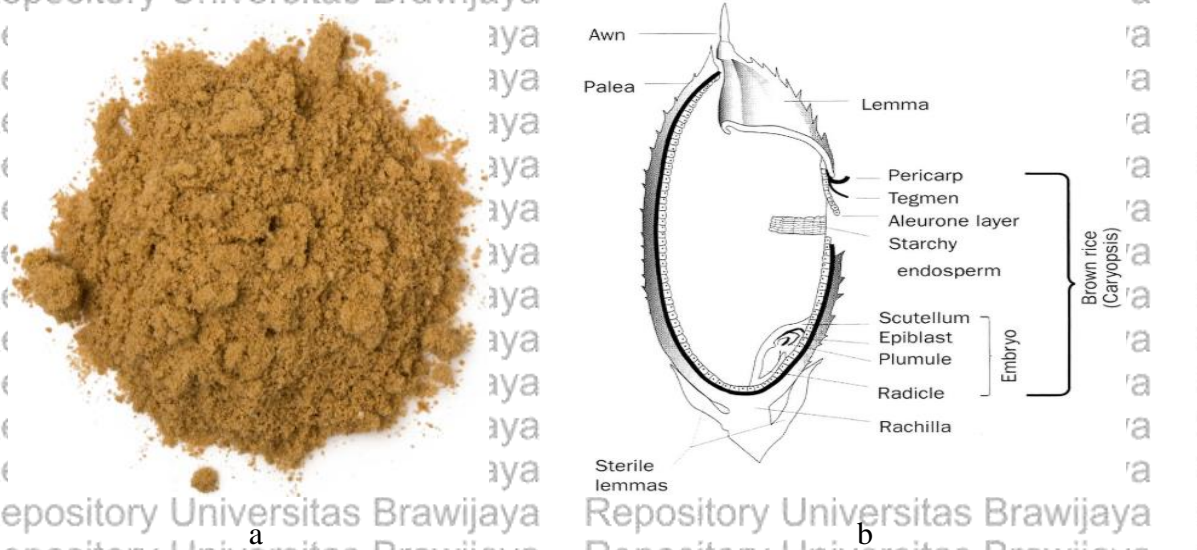


BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bekatul

Bekatul merupakan hasil samping penggilingan padi yang berasal dari lapisan luar beras pecah kulit dalam proses penyosohan beras (Widowati, 2001). Proses pengolahan padi menjadi beras menghasilkan 50 % beras, 20 % sekam, 17 % pecahan-pecahan beras atau menir, 10 % bekatul, dan 3 % tepung beras (Gambar 1) (Ardiansyah, 2010).

Di Indonesia, proses penggilingan padi menjadi beras umumnya dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama penggilingan padi menghasilkan beras, sekam dan menir. Beras yang dihasilkan dari penggilingan pertama masih banyak mengandung kulit ari maka harus digiling kembali untuk mendapatkan beras yang lebih bersih dan putih. Pada penggilingan kedua ini dihasilkan dedak dan bekatul. Dedak merupakan bagian yang kasar, sedangkan bekatul merupakan bagian yang halus.



Sumber : Orthoefer (2001)

Gambar 1. Bekatul (*Rice bran*).

a. Serbuk bekatul , b. Biji beras

Bekatul mengandung senyawa 42,8 % hemiselulosa; 32,8 % selulosa; 24,4 % lignin; 14,9 % protein; 12,5 % lemak 3,6 % air dan 2,1 % abu (Ardiansyah, 2010). Kandungan nutrisi



bekatul antara lain vitamin (seperti *Riboflavin*, *Niacin*, *Thiamin*, vitamin E, vitamin B-6 dan vitamin B kompleks), mineral (seperti : kalium, magnesium, besi, natrium, fosfor, potassium, kalsium, mangan, seng, aluminium, khlor dan silikon) (Widowati, 2001). Mikroorganisme secara umum membutuhkan nutrisi untuk mendukung pertumbuhan selnya. Nutrisi yang dibutuhkan terdiri atas makronutrien dan mikronutrien. Makronutrien yang dibutuhkan yaitu senyawa karbon (C), nitrogen (N), kalium (K), magnesium (Mg), fosfor (P), kalsium (Ca), sulfur (S), besi (Fe) dan natrium (Na) dan Mikronutrien yang dibutuhkan yaitu mangan (Mn), tembaga (Cu), nikel (Ni), seng (Zn), kobalt (Co), molibdenum (Mo) (Prescott *et al.*, 1999).

2.2 Media Pertumbuhan Bakteri Selulolitik

Banyak senyawa turunan selulosa yang dimanfaatkan dalam berbagai bidang kehidupan dan yang banyak digunakan pada isolasi bakteri selulolitik adalah *Carboxy methyl cellulose* (CMC) dan *Hydroxy ethyl cellulose* (HE cellulose) (Klemm *et al.*, 1998). Bakteri tersebut mampu tumbuh dalam media sintetik yang hanya mengandung sumber karbon organik (misalnya selulosa), sumber nitrogen dan beberapa garam mineral lainnya (Wendisch & Kutzner, 1991).

Produksi selulase dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain media tumbuh yang digunakan (seperti sumber karbon, nitrogen, rasio karbon nitrogen dan mineral), pH dan laju aerasi (Philippidis, 1994). Media tumbuh yang biasa digunakan terdiri atas: (1) media sintetik; dan (2) media non sintetik. Media sintetik merupakan media yang semua komponennya telah diketahui dan biasanya digunakan untuk mengetahui sifat faal dan genetika mikroorganisme seperti media Thyrode, Locke. Media non sintetik merupakan media dengan senyawa penyusun tidak diketahui pasti baik susunan maupun kadarnya seperti pepton, ekstrak daging, ekstrak ragi (Madigan, 2003).

2.2.1 Sumber karbon dalam media produksi selulase

Selulosa merupakan substrat yang dapat berperan sebagai inducer dalam proses sintesis selulase. Selain menginduksi sintesis selulase, inducer juga berfungsi sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan sel. Sumber karbon yang terbaik untuk produksi enzim selulase adalah selulosa. Produk CMC merupakan salah satu contoh media selektif untuk mendukung



pertumbuhan organisme selulolitik (Yin *et al.*, 2010; Rahna *et al.*, 2013;). Produksi enzim selulase meningkat apabila ditumbuhkan pada media selulosa dan aktivitas menurun jika ditumbuhkan pada substrat glukosa sebagai sumber karbon tunggal (Lederberg, 1992; Lynd *et al.*, 2002; Jahangeer *et al.*, 2005). Enzim selulase diinduksi ketika adanya selulosa dan direpresi ketika ada gula sederhana seperti glukosa (Lynd *et al.*, 2002). Produksi selulase oleh *Trichoderma viride* efektif pada media 1 % sukrosa yaitu eksoglukanase (2,68 U/mL), endoglukanase (2,17 U/mL) and β -glukosidase (2,06 U/mL) diikuti sumber karbon yang lain glukosa, selulosa, maltosa dan CMC (Gautam *et al.*, 2010). Produksi selulase ditingkatkan dengan penambahan sumber karbon selulosa, sukrosa, selobiosa dan lain-lain (Ray *et al.*, 2007). Singh *et al.* (2012) juga menyatakan bahwa sukrosa dengan konsentrasi 3 % merupakan sumber karbon yang dapat memaksimalkan aktivitas selulase dibandingkan 3 % laktosa.

2.2.2 Sumber nitrogen dalam media produksi selulase

Berbagai sumber nitrogen baik organik maupun anorganik dapat memengaruhi produksi enzim selulase. Mohamed *et al.* (2010) mela porkan bahwa produksi enzim selulase oleh *Bacillus subtilis* strain KO meningkat pada penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ atau tripton pada media molase. Jaradat *et al.* (2008) juga menyatakan bahwa 0,2 % ammonium khlorida merupakan sumber nitrogen terbaik bagi pertumbuhan *Streptomyces* sp. Strain J2 dibandingkan ekstrak khamir, KNO_3 , pepton, dan asparagin.

Produksi enzim selulase terbaik ketika kondisi nitrogen terbatas tetapi menurun dengan adanya pepton yang berlebihan (Gautam *et al.*, 2010). Singh *et al.* (2012) melaporkan penggunaan ammonium sulfat pada konsentrasi 3 % memberikan aktivitas selulase tertinggi sebesar 0,361 U/mL.

Sumber nitrogen organik dan anorganik (berkisar 0,5 - 3,0 % (b/v)) seperti pepton, malt ekstrak, ekstrak khamir, amonium nitrat, dan natrium nitrat dapat meningkatkan hasil dan aktivitas selulase. Sumber nitrogen organik terbaik adalah 1 % ekstrak khamir dapat meningkatkan aktivitas ketiga komponen enzim selulase eksoglukanase (2,40 U/mL), endoglukanase (2,28 U/mL) dan β -glukosidase (1,99 U/mL) (Gautam *et al.*, 2010), tetapi masih belum seefektif ammonium nitrat (Sun *et al.*, 1999). Namun pernyataan tersebut



berbeda dengan yang dilaporkan Rahna *et al.* (2013) bahwa 0,5 % *malt* ekstrak merupakan sumber nitrogen terbaik untuk produksi selulase oleh *Bacillus subtilis*. Ray *et al.* (2007) juga menyatakan bahwa sumber nitrogen organik lebih sesuai untuk produksi selulase untuk *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans* dibandingkan sumber nitrogen anorganik.

2.3 Produksi Enzim Selulase

Produksi enzim selulase berhubungan dengan keberhasilan fermentasi yang banyak dipengaruhi oleh lingkungan dan nutrisi untuk pertumbuhan mikroorganisme dalam memproduksi enzim sebagai gambaran metabolismenya. Faktor-faktor yang memengaruhi produksi enzim selulase antara lain konsentrasi inokulum, suhu fermentasi, nilai pH, kehadiran induser, medium aditif, aktivator, inhibitor, aerasi, waktu pertumbuhan, dan lain-lain (Immanuel *et al.*, 2006).

2.3.1 Kondisi kultur dan lingkungan pada produksi enzim selulase

Kondisi kultur dan lingkungan berperan penting pada produksi enzim selulase oleh bakteri (Levin & Forchiassin, 1995). Saat ini, studi tentang produksi enzim selulolitik lebih banyak menggunakan kultur atau fermentasi fasa cair (SMF) dibandingkan fasa padat (Lynd *et al.*, 2002). Keunggulan penggunaan fermentasi fasa cair adalah kemudahan dalam hal sterilisasi, proses kontrol, dan sistem teknologinya. Pada fermentasi fase padat (SSF) membutuhkan waktu lama untuk produksi enzim. Singh *et al.* (2012) memproduksi enzim selulase dari isolat bakteri *Bacillus circulans* membutuhkan waktu 120 jam pada fermentasi fase padat. Pola produksi enzim bergantung juga pada jenis strain, kondisi kultur dan golongan enzim konstitutif atau inducibel. Nirmala & Shindu (2011) juga melaporkan bahwa *Bacillus circulans* hasil isolasi dari bekatul mempunyai aktivitas selulolitik khususnya dalam produksi endoglukanase menggunakan fermentasi fasa cair pada inkubasi 72 jam. *Streptomyces* sp. dalam memproduksi enzim selulase membutuhkan waktu fermentasi selama 72 – 120 jam (Harchand & Singh, 1997; Alani *et al.*, 2008), enzim selulase diproduksi secara maksimal oleh *Bacillus subtilis* setelah fermentasi 36 jam (Yin *et al.*, 2010), *Bacillus* strain M-9 pada inkubasi 72 jam (Bajaj *et al.*, 2009). Pada awal fermentasi aktivitas

endoglukanase masih rendah karena mikroorganisme masih menggunakan media



pertumbuhan diperkaya lainnya dibandingkan selulosa sebagai sumber karbon tunggal. Enzim selulase akan menghidrolisis selulosa jika bahan media lain telah habis. Penurunan aktivitas enzim setelah fermentasi karena berkurangnya aktivitas selulase (Nirmala & Shindu, 2011).

Kondisi lingkungan seperti pH, suhu, dan lama fermentasi merupakan hal penting yang perlu diperhatikan pada produksi enzim selulase. Produksi enzim secara optimum membutuhkan kondisi lingkungan yang optimum juga. Kondisi lingkungan tersebut sangat bervariasi bergantung pada jenis bakteri atau mikroorganismenya. *Bacillus subtilis* YJ1 mempunyai suhu optimum 60 °C dan pH 7 (Yin *et al.*, 2010), beberapa strain dari *Bacillus* yang lain mempunyai kondisi optimum pada suhu 65 °C dan 70 °C (Mawadza *et al.*, 2000), *Mucor circinelloides* pada suhu 55 °C (Saha, 2004), *Bacillus circulans* dari biomassa pertanian optimum memproduksi selulase pada suhu 25 °C dan pH 7 dengan jumlah inokulum 0,5 mL (6×10^6 cfu/mL) (Singh *et al.*, 2012). Aktivitas endoglukanase maksimum pada pH 9 dan suhu 45 °C (6,6 U/mL) (Nirmala & Sindhu, 2011). *Bacillus* strain M-9 menghasilkan aktivitas optimum endoglukanase pada pH 5 pada suhu 60 °C (Bajaj *et al.*, 2009).

2.3.2. Efek ion logam

Sebagian besar ion logam seperti K^+ dan Na^+ tidak memengaruhi aktivitas selulase, sedangkan Co^{2+} dan Mn^{2+} pada konsentrasi 1, 5 dan 10 mM dapat meningkatkan aktivitas selulase dari *Bacillus subtilis*. Fenomena ini menjelaskan bahwa dalam sisi aktif enzim selulase tersebut mengandung gugus Sulfhidril (S-H) (Yin *et al.*, 2010). Menurut studi sebelumnya K^+ dan Na^+ tidak memengaruhi aktivitas selulase *Rhizopus oryzae* (Murashima *et al.*, 2002), sedangkan aktivitas selulase *Mucor circinelloides* dan *Chalara paradoxa* meningkat dengan adanya Co^{2+} dan Mn^{2+} (Saha, 2004; Lucas *et al.*, 2001).

2.3.3. Inhibitor

Inhibitor merupakan senyawa yang menghambat aktivitas enzim. Inhibitor ini digunakan untuk meningkatkan produksi metabolit target dan menekan produk yg tidak diinginkan. Adanya *Sodium dodecyl sulfate* (SDS), Tween 20 dan



Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) pada konsentrasi 10 mM menurunkan aktivitas selulase *Bacillus* strain M-9 sebesar 31-63 % dibandingkan kontrol (Bajaj *et al.*, 2009).

Beberapa inhibitor yang lain dilaporkan oleh Yin *et al.* (2010) bahwa pada konsentrasi 10 mM SDS, *Iodoacetic acid* (IAA), *p-chloromercuribenzoate* (pCMB) menghambat sekitar 95, 67, 44 % dari aktivitas enzim, sedangkan 10 mM β -mercaptoethanol (β -Me) dan Dithiothreitol (DTT) dapat meningkatkan aktivitas selulase *Bacillus subtilis* YJ1. Hal ini dikarenakan IAA dan pCMB dapat berikatan dengan kelompok sulfhidril (S-H) pada sisi aktif enzim dengan tingkat interaksi yang berbeda dan kemudian menghambat aktivitas selulase. Senyawa β -Me dan DTT dapat mengurangi ikatan disulfida dan renaturasi aktivitas selulase kembali, jika oksidasi atau agregasi dari protein enzim ini terjadi selama pemurnian dan penyimpanan. Fenomena ini menunjukkan bahwa sisi aktif enzim terdapat ikatan sulfhidril (S-H) (Singh *et al.*, 1990).

2.4 Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim sangat penting untuk memperoleh pengetahuan tentang sifat struktural dan fungsional serta meramalkan aplikasinya (Bajpai, 2014). Pemurnian dan pemisahan enzim umumnya didasarkan pada kelarutan, ukuran, polaritas, dan afinitas pengikatan. Pemurnian artinya membebaskan suatu bahan dari pengotor atau bahan-bahan lain yang tidak diinginkan (Channel, 1998). Pemilihan metode pemisahan yang tepat mempertimbangkan penggunaan enzim untuk skala produksi, *timeline*, dan sifat-sifat enzim (Berg *et al.*, 2002).

Pada pemurnian enzim, secara umum diawali dengan proses pemekatan enzim. Pemekatan enzim dapat dilakukan dengan dua metode yaitu preparatif (penyiapan) dan analitik. Metode preparatif bertujuan untuk mempertahankan aktivitas protein seperti metode dengan pengendapan dengan senyawa organik, ultrafiltrasi, liofilisasi, pengendapan garam dan dialisis (Bollag & Edelstein, 1991). Berikut ini agen yang sering digunakan dalam presipitasi protein (Tabel 1).



Tabel 1. Agen presipitasi protein

Agen	Tipe	Karakteristik
Poli-etilen glikol	Pelarut	Bermuatan, tidak mudah terbakar
Aseton	Pelarut	Berisiko untuk terdenaturasi/kehilangan aktivitas, mudah terbakar
Etanol	Pelarut	Berisiko untuk terdenaturasi, mudah terbakar
Ammonium sulfat	Garam	Stabil, mudah larut
Sodium sulfat	Garam	Stabil, mudah larut

Sumber: Marshak (1996)

Pemurnian enzim dengan cara pemekatan menggunakan garam berdasarkan prinsip *Salting out*. Pada konsentrasi garam yang tinggi (>0,15 M), kelarutan protein menurun dan menyebabkan protein mengendap, kejadian ini disebut *Salting out* (Wiengfield, 2016). Pada saat garam ditambahkan ke larutan enzim, tegangan permukaan air meningkat, menghasilkan interaksi hidrofobik yang meningkat antara protein enzim dan air. Protein merespon situasi ini dengan menurunkan luas permukaannya dalam upaya untuk meminimalkan kontak dengan pelarut air (Timasheff & Arakawa, 1997).

← Peningkatan presipitasi (*Salting out*)

Anion : $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$

Kation : $\text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$

→ Peningkatan kelarutan (*Salting in*)

Sumber : Wingfield (2016)

Gambar 2. Ion-ion pembentuk garam

Garam ammonium sulfat mempunyai kelarutan yang tinggi di dalam air (*Salting in*) dibandingkan garam fosfat karena ammonium sulfat mempunyai kekuatan ionik yang besar (Gambar 2), dan pada konsentrasi garam yang tinggi kekuatan ionik garam ammonium sulfat semakin kuat sehingga lebih mudah mengikat air dan protein akan mengendap/presipitasi dan disebut *Salting out* (Parsegian, 1995). Protein hasil pemekatan tersebut masih mengandung kadar garam yang tinggi. Hal tersebut dapat dihilangkan dengan cara dialisis protein enzim di dalam larutan bufer (Wang & Yeh, 2006). Protein enzim memiliki berat



molekul yang relatif tinggi, pemisahan berdasarkan ukuran atau massa molekul mendukung pemurnian enzim. Dialisis adalah metode yang umum menggunakan membran semipermeabel digunakan untuk menghilangkan garam, molekul organik kecil, dan peptida.

Proses dialisis enzim membutuhkan volume dialisis yang banyak, cairan di luar kantong dialisis, dan jangka waktu beberapa jam atau hari untuk mencapai kesetimbangan. Gerak dialisis arus balik juga dapat digunakan, larutan dialisis dialirkan ke satu arah, dan dialisis dalam arah berlawanan di luar membran.

Pemurnian parsial protein enzim selulase *Bacillus subtilis* menggunakan 80 % ammonium sulfat jenuh dan dialisis dalam larutan 0,05 M bufer fosfat pH 8, suhu 4 °C selama 24 jam (Pokhrel *et al.*, 2014). Pengendapan protein enzim selulase dari *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* menggunakan 0-80 % ammonium sulfat dan dialisis dalam 0,05 M bufer fosfat pH 8 dengan tiga kali penggantian bufer dan dilanjutkan pemurnian menggunakan DEAE separosa dan sepadex 150. Hasil pemurnian ini diperoleh protein selulase sebesar 32,5 kDa (Gautam & Sharma, 2014). Presipitasi protein enzim selulase dari *Bacillus* sp. menggunakan ammonium sulfat jenuh 40-80 % dan didialisis menggunakan 0,025 M buffer fosfat pH 7 yang mengandung EDTA dan 2-mercaptoetanol pada suhu 4 °C selama semalam, kemudian dilanjutkan dengan pemurnian menggunakan DEAE selulosa dan shepadex G-75. Protein selulase yang dihasilkan mempunyai berat molekul 58 kDa (Gautam dan Sharma, 2014).

2.5 Faktor-Faktor yang Memengaruhi Sistem Induksi untuk Produksi Selulase

Enzim induktif disintesis ketika ada molekul induser (ketika substrat tersedia) dan terlibat pada reaksi katabolisme. Molekul induser merupakan suatu molekul dengan berat molekul rendah dan dapat berupa substrat atau senyawa yang analog dengan substrat. Enzim tersebut merupakan produk gen yang bersifat induktif. Pada umumnya gen *inducible* memiliki kecepatan basal transkripsi yang rendah, sehingga adanya induser (substansi yang memacu transkripsi) maka laju sintesis enzim akan meningkat (Murray *et al.*, 2006).

Selulase merupakan enzim induktif dan produksinya diatur dan dikendalikan oleh mekanisme aktivasi dan represi. Produksi enzim selulase tidak hanya diinduksi oleh adanya



substrat namun juga direpresi oleh gula-gula yang tersedia dalam substrat. Induser alami dari sistem selulase telah dipelajari sejak 1962 (Sukumaran *et al.*, 2005).

Menurut Thieman dan Cummings (2003) metode regulasi sintesis enzim berupa induksi dan represi dengan mengontrol transkripsi mRNA pada operon (gen-gen pengendali) karena adanya pengaruh konsentrasi substrat dan produk. Operon merupakan bagian/segmen/kelompok gen-gen pada kromosom sel bakteri yang terdiri atas rangkaian:

1. Gen struktural (S): gen yang berhubungan dengan sintesis dan fungsi protein tertentu (enzim).
2. Gen regulator (R): gen yang berikatan dengan gen operator dan mengkode protein repressor.
3. Gen operator (O): gen berfungsi mengontrol gen struktural.

Enzim-enzim sebelum disintesis melalui beberapa jalur katabolik maka induser (substrat) harus tersedia. Apabila induser tidak tersedia maka sintesis enzim diblokir karena protein represor mengikat gen O, namun apabila induser tersedia maka protein tertentu disintesis karena operon akan terinduksi dan protein repressor menjadi tidak aktif, disebut enzim induktif (Thieman dan Cummings, 2003).

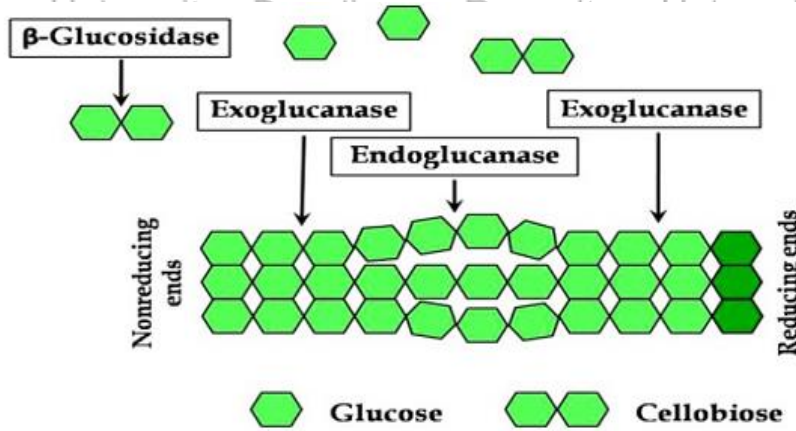
2.6 Organisasi Gen Penyandi Selulase

Ada tiga jenis enzim selulase yaitu enzim ekso- β -1,4-glukanase (CBH atau 1,4- β -D-glucan celobiohidrolase, EC 3.2.1.91), endo- β -1,4-glukanase (EG atau endo-1,4- β -D-glucan 4- glukanohidrolase, EC 3.2.14) dan β -glukosidase (BG-EC 3.2.1.21) (Sukumaran *et al.*, 2005). Pada jamur dan bakteri aerobik, enzim selulase sebagian besar disekresikan keluar (ekstraselular) untuk menghidrolisis substrat, sehingga mampu untuk mencapai dan menembus substrat selulosa.

Enzim selulase memiliki mekanisme hidrolisis yang terdiri dari endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase pada substrat selulosa (Gambar 3). Enzim endoglukanase menghidrolisis bagian amorf serat selulosa, dan memudahkan kerja enzim eksoglukanase untuk menghidrolisis struktur kristal selulosa baik pada ujung reduksi atau non reduksi. Setelah itu, kedua enzim bekerjasama saling melepaskan serat selobiosa dari selulosa. Baik enzim endoglukanase maupun eksoglukanase tidak dapat memecah selobiosa sehingga



diperlukan enzim lain, yaitu β -glukosidase yang menghidrolisis selobiosa menjadi molekul glukosa (Vardhini & Selvakumar, 2009).



Sumber : Aro *et al.* (2005)

Gambar 3. Skema sederhana hidrolisis selulosa amorf dan mikrokristal oleh sistem selulase

Enzim eksoglukanase (CBH) merupakan komponen kunci dalam kompleks multienzim selulase. Jamur selulolitik pada umumnya menghasilkan dua CBHs berbeda, CBHI dan CBHII. Keduanya dibedakan berdasarkan urutan/sekuen asam amino penyusunnya, sisi aktif dan kemampuan menghasilkan selobiosa secara lengkap meskipun lambat tanpa bantuan endoglukanase (Terry, 1997). Bagian CBH jamur terdiri dari domain katalitik, domain pengikat selulosa (CBD/*Cellulose Binding Domain*) dan peptida fleksibel yang menghubungkan antara kedua domain (Gilkes *et al.*, 1991).

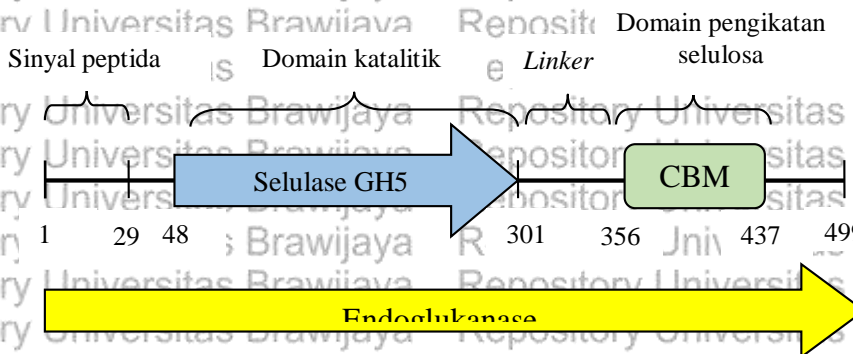
2.6.1 Gen endoglukanase

Endoglukanase (EC 3.2.1.4) adalah enzim yang berperan untuk menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik secara acak sehingga menyebabkan panjang polimer selulosa akan berkurang dan konsentrasi gula pereduksi bertambah (Pham *et al.*, 2011). Gen penyandi selulase pada bakteri maupun jamur terletak pada kromosomnya. Gen pengode endoglukanase terdiri atas dua bagian yaitu bagian struktural dan non-struktural. Bagian struktural berupa daerah yang berisi urutan nukleotida yang akan diterjemahkan menjadi



protein atau disebut dengan ORF. Daerah ini terdapat *start codon*, ATG, dan *stop codon*, TGA/TAG/TAA (Han *et al.*, 1995). *Start* dan *stop codon* berfungsi sebagai penanda dimulai dan dihentikannya proses translasi. *Open reading frame* (ORF) endoglukanase pada strain *Bacillus* umumnya terdiri dari 1500 pasang basa (pb) atau dikode oleh 500 asam amino (Nurachman *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2014).

Domain pada endoglukanase meliputi sinyal peptida, katalitik domain (CD), dan domain pengikatan selulosa (CBD). Sinyal peptida berfungsi sebagai penanda untuk mengekspresikan protein keluar sel. Katalitik domain/CD dari keluarga glikosida hidrolase 5 (GH5) memiliki asam amino berjumlah 254. Domain pengikatan selulosa/CBD dari *Cellulose Binding Module 3* (CBM3) tersusun atas 57 residu asam amino (356-437). Antara domain katalitik dan pengikatan selulosa dihubungkan oleh penghubung (*linker*) dengan panjang asam amino 54 (302-355) (Nurachman *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2014).



Sumber : Nurachman *et al.* (2010); Pandey *et al.* (2014)

Gambar 4. Diagram domain endoglukanase

Gen endoglukanase terdiri dari dua domain yaitu domain pengikatan selulosa (CBM/*Cellulose binding domain*) dan domain katalitik. Domain katalitik selulase (warna biru) terdiri dari 254 residu asam amino yang berada pada rentang 48-301 (Gambar 4).

Karakterisasi gen penyandi endo-1,4- β glukukanase kompleks multienzim *Bacillus circulans* F-



2) mempunyai berat molekul 82 kDa pada SDS PAGE dengan nilai pI 5,4 dan urutan asam amino N-terminal adalah ASNIGGWVGGNESGFEFG (Kim, 1995).

2.6.2 Gen eksoglukanase

Enzim eksoglukanase atau selobiohidrolase (CBH) berfungsi menghidrolisis struktur kristal selulosa baik pada ujung reduksi atau non reduksi. Beberapa gen eksoglukanase yang ada di data uniprot menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* memiliki gen *cbhB* dengan nama proteinnya exoglucanase B dengan aktivitas selulosa 1,4-beta selobiosidase. Panjang protein yang dimiliki sebesar 207 dan berat molekul 22,538 Da. Pada daerah protein 21-124 dan 125-207 merupakan domain Fibronectin type-III. Gen *cbhB* juga dimiliki oleh *Paenibacillus* sp. *PIXP2*, mempunyai sinyal peptida pada daerah protein 1-32 dan domain Fibronectin type-III pada daerah 228-313. *Streptomyces scabiei* mengkode eksoglukanase yaitu *cbhA_3*, dengan ukuran panjang protein sebesar 46 dan berat molekul 4,901 Da. *Paenibacillus macerans* (*Bacillus macerans*) mengkode gen *cely* dengan nama proteinnya exoglucanase-2 dengan panjang protein 1016 dan berat molekul 112,727 Da. Sinyal peptida pada daerah protein 1-31, domain Fibronectin type-III pada daerah 771-861 dan domain CBM3 pada protein 864-1016 (<http://www.uniprot.org>).

2.6.3. Gen β -1,4-glukosidase

Paenibacillus polymyxa mengkode 2 homolog β -glukosidase yaitu BglA dan BglB, yang menunjukkan perbedaan struktur quartener dan spesifitas substrat (Isorna *et al.*, 2007). Enzim BglA dan BglB merupakan kelompok GH-1 (*Glicoside hydrolase*) yang mempunyai kemampuan menghidrolisis ikatan β -glikosida dari disakarida, oligosakarida atau konjugat sakarida (Coutinho & Henrissat, 1999). Struktur kuartener BglA dan BglB, namun monomer dari kelompok enzim GH-1 terdiri dari domain tunggal $(\beta/\alpha)_8$ dengan berat molekul 50 kDa.

Pada bakteri terdapat kelompok organisasi gen yang disebut operon yang merupakan gen struktural yang ekspresinya diatur oleh promotor yang sama. Bagian struktural tersebut mengkode protein yang berbeda tetapi protein-protein tersebut diperlukan untuk rangkaian metabolisme yang sama prosesnya (Yuwono, 2005). Sebuah operon mengkode empat protein yang dibutuhkan untuk biosintesis selulosa bakterial (bcs) pada *Acetobacter xylinum* yang



diisolasi dari strain rendah selulase. Analisis urutan nukleotida menunjukkan bahwa operon selulosa sintase adalah 9217 pasangan basa dan terdiri dari empat gen. Keempat gen *bcsA*, *bcsB*, *bcsC*, dan *bcsD* digabungkan dan ditulis sebagai mRNA polisistronik dengan situs inisiasi 97 basa hulu dari daerah pengkode gen pertama (*bcsA*) dalam operon. Empat gen dalam operon diperlukan untuk sintesis maksimal enzim selulase *Acetobacter xylinum*. Massa molekul protein yang disandikan oleh *bcsA*, *bcsB*, *bcsC* dan *bcsD* adalah 84,4, 85,3, 141,0, dan 17,3 kDa. Gen kedua dalam operon (*bcsB*) mengkode subunit katalitik selulase (Wong *et al.*, 1990).

Eksresi genetik dari makhluk hidup termasuk prokariot penting sekali dikendalikan. Sel akan kehilangan banyak energi tanpa sistem pengendalian yang efisien sehingga merugikan jasad hidup (Yuwono, 2005). Zhang & Hutcheson (2011) melaporkan tentang pemahaman regulasi sistem selulolitik dari bakteri laut *Degradans saccharophagus*. Empat glukonase dari sistem selulolitik terjadi ekspresi basal selama pertumbuhan pada glukosa. Ada tiga gen dalam sistem selulolitik yang diprediksi diinduksi kuat selama pertumbuhan pada avicel, dengan pengamatan tiga pola ekspresinya. Satu kelompok menunjukkan peningkatan ekspresi (hingga enam kali lipat) dalam waktu 4 jam dari pergantian nutrisi dan ekspresi relatif tetap konstan selama 22 jam berikutnya. Kelompok gen kedua diinduksi antara 4 sampai 10 jam setelah transfer nutrisi kemudian ekspresi relatif menurun setelahnya. Kelompok gen ketiga perlahan-lahan diinduksi dan diekspresikan secara maksimal setelah 24 jam. Selodekstrin dan selobiosa, produk yang diprediksi diekspresikan oleh endoglukanase untuk merangsang ekspresi gen selulase.

2.7 Sumber-Sumber Enzim Selulase

Jamur memiliki potensi yang baik dalam produksi selulase tetapi bakteri menunjukkan tingkat pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan jamur (Amore *et al.*, 2012). Bischoff *et al.* (2006) juga menyatakan bahwa sebagian besar kajian produksi selulase telah difokuskan pada jamur dengan relatif penekanan yang lebih rendah pada sumber bakteri untuk produksi selulase namun bakteri mempunyai keanekaragaman alam sangat tinggi, menghasilkan sistem enzim yang stabil dan berpotensi sebagai enzim yang penting di



industri. Salah satu enzim selulase adalah *Bacillus* sp. merupakan bakteri selulolitik yang hidup bebas dan telah dipelajari dalam sistem degradasi selulosa (Bajaj *et al.*, 2009).

Dalam dunia industri, enzim selulolitik termofil dapat diaplikasikan pada industri makanan dan pemanis yang membutuhkan proses bersuhu tinggi, seperti pasteurisasi (Jang & Chang, 2005). Bakteri termofilik dari sumber air panas *Anoxybacillus flavithermus* EH P2 mempunyai aktivitas selulase pada masing-masing substrat CMC, Avicel, Selobiosa dan xylan adalah 65,56 U/mL, 25,30 U/mL, 30,12 U/mL dan 11,5 U/mL (Ibrahim and El-diwany, 2007). Singh *et al.* (2012) melaporkan tentang biosintesis selulase (CMCase) dari bakteri *Bacillus spaericus* JSI yang diisolasi dari media limbah hasil penggilingan kapas menunjukkan aktivitas maksimum pada pH 7, diinokulasi 12 jam dengan konsentrasi inokulum 6 %, aerasi 150 rev/menit dan suhu inkubasi 40 °C. Nilai K_M dan V_{max} adalah 1,9 mg/mL dan 10 μ M/menit/mL. CMCase dari *Bacillus* ini tahan terhadap pH alkali dan suhu tinggi.

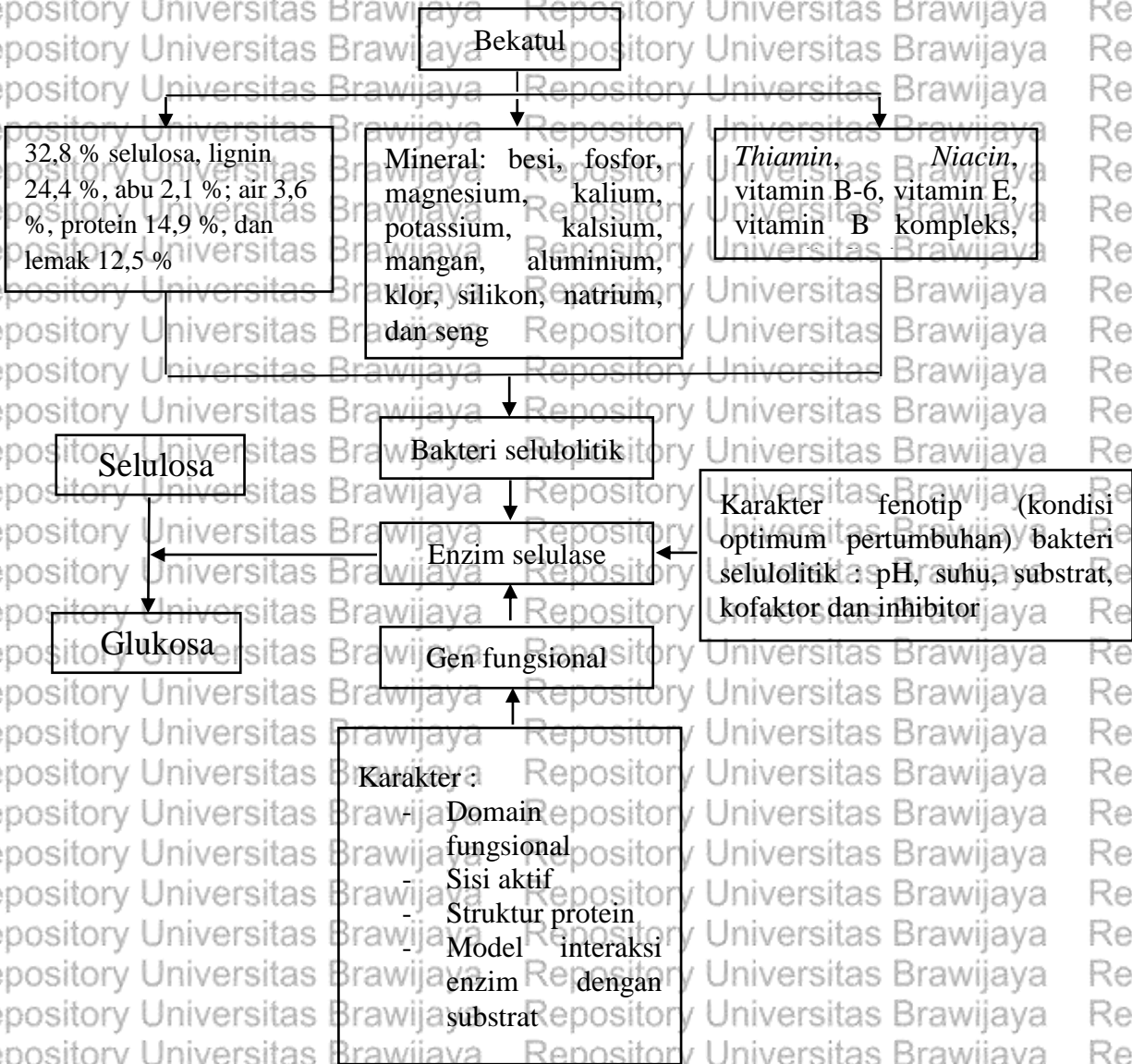
Beberapa peneliti telah melakukan isolasi bakteri selulolitik dari berbagai media yang kaya selulosa seperti tanah. Empat isolat bakteri selulolitik telah diisolasi dari tanah komposit dan telah dikarakterisasi. Satu isolat mempunyai aktivitas aviselase dan tiga isolat mempunyai aktivitas endoglukanase (Meryandini *et al.*, 2009). Aktivitas selulase (CMCase) dari *Paenibacillus* strain E yang diisolasi dari tanah yang bebas nitrogen adalah 4 U/mL (Emtiazi *et al.*, 2007).

Selain isolasi bakteri selulolitik dari media tanah, beberapa peneliti memanfaatkan bekatul sebagai media isolasi maupun media pertumbuhannya. Nirmala and Sindhu (2011) menyatakan bahwa *Bacillus circulans* yang diisolasi dari substrat bekatul mampu menghasilkan selulase khususnya endoglukanase dengan aktivitas maksimum 6,6 U/mL pada kondisi optimum (pH 9, suhu 45 °C selama 72 jam). *Bacillus* strain M-9 dari bekatul yang terdekomposisi menghasilkan endoglukanase dengan aktivitas maksimum 2,93 U/mL (pH 5, suhu 60 °C, 72 jam). Endoglukanase tahan terhadap suhu tinggi dan kondisi ekstrim baik asam maupun basa dengan berat molekul 54 kDa (Bajaj *et al.*, 2009). Selulase (endo-1,4-glukanase) dari *Bacillus subtilis* YJ1 yang ditumbuhkan pada media yang mengandung bekatul menghasilkan aktivitas optimum pada pH 6, suhu 50 °C (Yin *et al.*, 2010).



2.8 Kerangka Konsep Penelitian

Kerangka konsep yang mendasari dalam penelitian ini adalah untuk mempelajari gen penyandi enzim selulase dan aktivitasnya (Gambar 5).



Gambar 5. Kerangka konsep penelitian



Bekatul mengandung selulosa 32,8 %, lignin 24,4 %, abu 2,1 %; air 3,6 %, protein 14,9 %, dan lemak 12,5 %. Bekatul juga mengandung vitamin (seperti *Thiamin*, *Niacin*, vitamin B-6, vitamin E, vitamin B kompleks, dan *Riboflavin*), mineral (besi, fosfor, magnesium, kalium, potassium, kalsium, mangan, aluminium, klor, silikon, natrium, dan seng) dan lain-lain. Kandungan selulosa yang cukup tinggi dan nutrisi lainnya (vitamin dan mineral) pada bekatul berpotensi sebagai media tumbuh bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik merupakan penghasil enzim selulase dapat diperoleh dari biomassa yang kaya selulosa seperti bekatul.

Produksi enzim selulase dikendalikan oleh jenis mikroorganisme. Bakteri memiliki tingkat pertumbuhan yang tinggi dibandingkan dengan jamur, meskipun jamur memiliki potensi yang baik dalam produksi selulase. Faktor-faktor yang memengaruhi produksi enzim pada mikroorganisme adalah faktor internal yaitu genetik dan faktor eksternal seperti pH, suhu, jenis & konsentrasi substrat, enzim, kofaktor dan inhibitor. Apabila faktor eksternal terlalu ekstrim maka pertumbuhan mikroorganisme akan terhambat sehingga proses sintesis dan aktivitas enzim selulase tidak maksimal. Enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroorganisme dikendalikan gen-gen yang berbeda, baik dalam hal jumlah pasangan basa maupun urutan nukleotidanya. Ekspresi gen penyandi enzim selulase dipengaruhi oleh ketersediaan bahan selulosa dalam media pertumbuhannya karena enzim ini bersifat *inducible*.

Enzim selulase merupakan sistem multienzim yang terdiri dari enzim endo- β -1,4-glukanase, ekso- β -1,4-glukanase dan β -1,4-glukosidase, bekerja secara sinergi untuk mendegradasi substrat selulosa menjadi glukosa. Enzim selulase merupakan suatu protein fungsional yang dikode oleh gen fungsional. Gen pengkode protein atau gen fungsional digambarkan dari karakter-karakter pada suatu sekuen gen, diantaranya domain fungsional, sisi aktif, motif protein, struktur protein, konstruksi pohon filogenetik dan sebagainya melalui penggunaan perangkat bioinformatika (*in Silico*). Fenotip organisme sangat ditentukan oleh hasil interaksi protein-protein dalam sel. Ekspresi gen dapat digunakan sebagai dasar untuk meningkatkan aktivitas dan produksi enzim khususnya enzim selulase.

Mikroorganisme dalam memproduksi enzim selulase mempunyai karakteristik yang berbeda-beda. Mikroorganisme yang sama atau sekerabat belum tentu mempunyai kesamaan



secara fisiologi. Hal ini dikarenakan karakter fenotip merupakan kombinasi dari pengaruh lingkungan dan ekspresi genetik. Faktor lingkungan seperti tempat enzim bekerja, pH lingkungan, suhu, serta ketersediaan substrat yang akan diuraikan. Semua enzim dari tiap jenis mikroorganisme bekerja dalam rentang suhu tertentu. Peningkatan suhu eksternal secara umum akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia enzim, tetapi kenaikan suhu yang terlalu ekstrim akan menyebabkan denaturasi enzim terutama kerusakan pada ikatan hidrogen dan ikatan ioniknya sehingga menurunkan kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim tersebut.

Selain itu pH lingkungan juga memengaruhi pengikatan enzim pada substrat. Perubahan pH dapat menghambat aktivitas enzim akibat perubahan konformasi enzim dan sifat katalitiknya.



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dimulai Bulan Mei 2014 sampai April 2018. Sampel bekatul diperoleh dari penggilingan padi di wilayah Kabupaten Malang. Penelitian dan analisis mikrobiologi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi dan Laboratorium Biokimia jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Penelitian dan analisis biologi molekular dilakukan di laboratorium Genetika Jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Kerangka Operasional

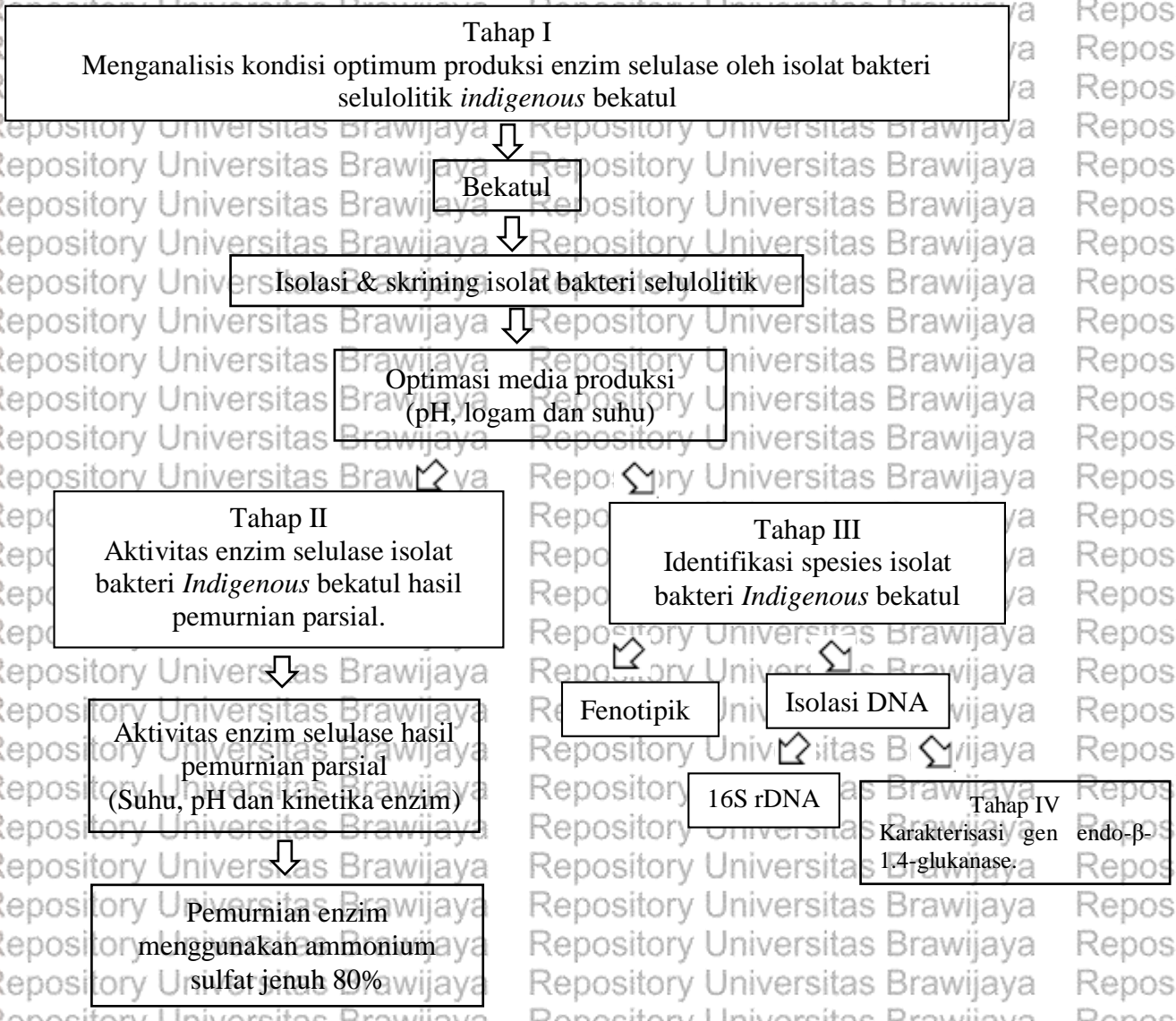
Penelitian ini dibagi dalam empat tahapan untuk mencapai tujuan penelitian. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari tentang penyandi enzim endoglukanase dan aktivitasnya bakteri selulolitik *indigenus* bekatul. Tujuan tersebut dicapai melalui empat tahapan penelitian yang disajikan pada kerangka operasional (Gambar 6).

Tahap pertama pada penelitian ini menganalisis kondisi optimum produksi enzim selulase oleh isolat bakteri selulolitik *indigenus* bekatul. Bakteri selulolitik diisolasi dari bekatul, dibuat kurva pertumbuhan isolat bakteri selulolitik terpilih, uji aktivitas enzim secara kuantitatif dan optimasi produksi enzim selulase pada variasi pH, logam dan suhu.

Tahap kedua mengevaluasi aktivitas enzim selulase isolat bakteri *indigenus* bekatul hasil pemurnian parsial, meliputi pemurnian enzim selulase secara parsial menggunakan ammonium sulfat jenuh 80 %, proses dialisis, karakterisasi aktivitas enzim hasil pemurnian parsial pada variasi suhu, pH dan konsentrasi substrat serta menentukan kinetika enzim.

Tahap ketiga mengidentifikasi nama spesies isolat bakteri *indigenus* bekatul yang mempunyai kemampuan selulolitik paling tinggi, meliputi identifikasi secara fenotip dan molekular berdasarkan 16S rDNA.

Tahap keempat membuktikan karakter gen endo- β -1,4-glukanase dari isolat bakteri selulolitik terpilih secara *In silico*. Karakter gen antara lain domain fungsional, sisi aktif, motif protein, struktur protein, konstruksi pohon filogenetik.



Gambar 6. Kerangka Operasional Penelitian

3.3 Isolasi dan Skrining Bakteri Selulolitik dari Bekatul

Sampel bekatul ditimbang sebanyak 25 gram dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 225 ml larutan 0,85 % NaCl dan diinkubasi pada suhu ruang ($\pm 30^\circ\text{C}$) selama dua minggu. Sampel sebanyak 1 mL dilarutkan dalam 0,85 % NaCl steril 9 mL (pengenceran 10^{-1}) dan dibuat seri pengenceran bertingkat sampai 10^{-6} . Sampel pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-6} diambil 1 mL dan diinokulasikan ke dalam Cawan Petri yang berisi media CYPE-agar secara *pour plate*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam (setiap hari



diamati). Media CYPE-agar terdiri dari 1 % CMC, 0,5 % pepton, 0,5 % ekstrak khamir, 0,1 % K_2HPO_4 , 0,02 % $MgSO_4$, 0,5 % NaCl dan 2 % agar pada pH 7 (Nirmala & Shindu, 2011).

Masing-masing koloni diamati morfologinya dan dimurnikan dengan cara mengambil satu ose isolat bakteri ditumbuhkan pada media CYPE-agar dengan metode *streak kuadran* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Isolat murni bakteri selulolitik diuji kemampuannya untuk memproduksi enzim selulase menggunakan metode pewarnaan *Congo red*. Pada uji *Congo red* menggunakan kepadatan sel (OD) sebesar 0,4 atau jumlah koloni $1,2 \times 10^7$ cfu/mL. Koloni isolat murni digenangi 0,1 % *Congo red* selama 15 menit kemudian dicuci tiga kali menggunakan 1 M NaCl. Pengukuran dilakukan terhadap diameter koloni dan zona bening. Aktivitas selulase ditentukan dari nilai indeks selulolitik yang merupakan nisbah antara diameter zona bening dengan diameter koloni (Gupta *et al.* 2012). Isolat dengan kemampuan indeks selulase besar dipilih dan digunakan untuk perlakuan selanjutnya. Data aktivitas indeks selulolitik dianalisis ragam dengan alfa 5 % menggunakan program SPSS 16.

3.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Selulolitik

Isolat bakteri selulolitik terpilih sebanyak 2 ose diinokulasikan dalam 25 mL media CYPE (1 % CMC; 0,5 % pepton; 0,5 % ekstrak khamir; 0,1 % K_2HPO_4 ; 0,02 % $MgSO_4$ dan 0,5 % NaCl; pH 7) (Nirmala & Shindu, 2011) diinkubasi pada suhu 30 °C dengan penggojogan pada kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Inokulum sebanyak 5 mL (OD= 0,4) dalam 500 mL medium kultur CYPE dan diinkubasi pada suhu 30 °C dengan kecepatan penggojogan 120 rpm. Sampel diambil setiap 4 jam sekali selama 72 jam dan diukur densitas optiknya pada panjang gelombang 600 nm dengan menggunakan spektrofotometer *uv-vis*. Bakteri yang berada dalam fase pertumbuhan eksponensial dengan densitas 10^7 sel/ml digunakan sebagai starter dalam uji aktivitas selulolitik (Seo *et al.*, 2013) dan dihitung laju pertumbuhan bakteri.



$$\mu = \frac{\log N_t - \log N_0}{0,301 \times t} \quad (1)$$

Keterangan :

μ = laju pertumbuhan (generasi/jam)

N_t = jumlah sel pada fase akhir eksponensial

N_0 = jumlah sel fase awal eksponensial

t = lama fase eksponensial (jam)

3.5 Pembuatan Starter

Isolat bakteri selulolitik ditumbuhkan pada 100 mL media CYPE (1 % CMC; 0,5 % pepton; 0,5 % ekstrak khamir; 0,02% $MgSO_4$; 0,1 % K_2HPO_4 ; dan 0,5 % NaCl, pH 7) (Nirmala & Shindu, 2011), selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang, penggojogan pada kecepatan 120 rpm. Waktu produksi enzim selulase disesuaikan dengan waktu fase pertumbuhan akhir logaritmik pada kurva pertumbuhan. Bakteri yang berada dalam fase pertumbuhan logaritmik dengan densitas 10^7 sel/ml digunakan sebagai starter dalam uji aktivitas enzim.

3.6 Uji Aktivitas Enzim Selulase Kasar Menggunakan Metode DNS

3.6.1 Pembuatan kurva standar glukosa menggunakan metode DNS

Untuk membuat 100 mL reagen DNS, maka dibuat dengan menyampurkan 50 mL reagen A dan 50 mL reagen B. Reagen A terdiri dari campuran 1 g NaOH dan 1 g DNS yang dilarutkan dengan akuades sampai volume 50 mL. Reagen B merupakan campuran 20 g KNa-Tatrat, 0,2 g fenol dan 0,05 g sodium metabisulfit kemudian dilarutkan dalam 50 mL akuades (Van Dyk, 2009).

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan cara larutan glukosa dengan konsentrasi 25 μ g/mL sebanyak 2 mL dalam pelarut 20 mM buffer fosfat pH 7 ditambahkan 2 mL reagen DNS. Campuran tersebut dididihkan dalam *water bath* selama lima menit untuk mengakhiri reaksi. Sampel didinginkan sampai suhu ruang dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 -560 nm dengan nilai interval 5 menggunakan *spectrofotometer UV-Vis*.



Kurva standar glukosa ditentukan dengan cara glukosa dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25 dan 30 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 2 mL dalam pelarut 20 mM buffer fosfat pH 7 ditambahkan 2 mL reagen DNS. Campuran tersebut dididihkan dalam *water bath* selama 5 menit untuk mengakhiri reaksi. Sampel didinginkan sampai suhu ruang dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Grafik regresi linier dibuat antara konsentrasi glukosa (sumbu x) dan absorbansi (sumbu y) (Pokhrel *et al.*, 2014).

3.6.2 Uji aktivitas endo- β -1,4-glukanase

Aktivitas endo- β -1,4-glukanase ditentukan dengan menginkubasi campuran 1% CMC dalam 1800 μL 20 mM buffer fosfat (pH 7,0) dengan 200 μL ekstrak kasar enzim selulase dari isolat terpilih pada suhu 50 $^{\circ}\text{C}$. Setelah 30 menit reaksi, 2 mL asam dinitrosalisilat (DNS) ditambahkan dan dididihkan dalam *water bath* selama 5 menit untuk mengakhiri reaksi. Sampel didinginkan sampai suhu ruang dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Satu unit aktivitas endo- β -1,4-glukanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghidrolisis CMC dan melepaskan 1 μg glukosa per 1 menit reaksi pada suhu 50 $^{\circ}\text{C}$ (Yin *et al.*, 2010).

$$\text{Aktivitas} = \frac{C}{t} \times \frac{V_{E+S}}{V_E} \quad (2)$$

Keterangan : C = konsentrasi glukosa ($\mu\text{g/mL}$)

V = volume (mL)

t = waktu reaksi (min)

E = enzim

S = substrat

Data hasil aktivitas enzim tersebut dianalisis ragam dengan alfa 5 % menggunakan program SPSS 16.

3.6.3 Uji aktivitas ekso- β -1,4-glukanase

Aktivitas ekso- β -1,4-glukanase ditentukan dengan menginkubasi 1% avisel dalam 1800 μL 20 mM buffer fosfat (pH 7,0) dengan 200 μL ekstrak kasar enzim selulase dari isolat terpilih pada suhu 50 $^{\circ}\text{C}$. Setelah 60 menit reaksi, aktivitasnya diukur menurut metode DNS. Satu unit dari aktivitas ekso- β -1,4-glukanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat



menghidrolisis avisel dan melepaskan 1 μg glukosa per 1 menit reaksi pada suhu 50 °C (Yin *et al.*, 2010). Data aktivitas enzim dianalisis ragam dengan alfa 5 % menggunakan program SPSS 16.

3.6.4 Uji aktivitas β -glukosidase

Aktivitas β -glukosidase ditentukan dengan menghidrolisis 1 % selobiosa dalam 1800 μL 20 mM *buffer phosphat* (pH 7,0) dengan 200 μL ekstrak kasar enzim selulase dari isolat terpilih pada suhu 50 °C selama 30 menit reaksi dan aktivitasnya diukur menurut metode DNS. Satu unit aktivitas beta glukosidase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghidrolisis selobiosa dan melepaskan 1 μg glukosa per 1 menit reaksi pada suhu 50 °C (Yin *et al.*, 2010). Data aktivitas enzim dianalisis ragam dengan alfa 5 % menggunakan program SPSS 16.

3.7 Optimasi Produksi Enzim Selulase oleh Bakteri Selulolitik *Indigenous* Bekatul

Optimasi produksi enzim selulase menggunakan isolat bakteri terpilih dengan aktivitas enzim tertinggi dari perlakuan 3.6. Data aktivitas enzim yang diperoleh dianalisis ragam dengan alfa 5 % menggunakan program SPSS 16.

3.7.1 Optimasi produksi selulase dengan variasi pH

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua faktor yaitu jenis isolat dan pH. Inokulum sebanyak 10 % (umur 24 jam, OD=0,4) diinokulasikan pada 50 mL media CYPE (1 % CMC; 0,5 % pepton; 0,5 % ekstrak khamir; 0,1 % K_2HPO_4 ; 0,02 % MgSO_4 dan 0,5 % NaCl) (Nirmala & Shindu, 2011) dengan variasi pH awal 5, 6, 7 dan 8, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang dengan penggojogan pada kecepatan 120 rpm. Waktu produksi enzim selulase disesuaikan dengan waktu fase pertumbuhan logaritmik pada kurva pertumbuhan. Kultur bakteri disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm, suhu 4 °C, selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan selanjutnya diuji aktivitas enzimnya menggunakan metode DNS.



3.7.2 Optimasi produksi selulase dengan variasi logam

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua faktor yaitu jenis isolat dan jenis logam. Inokulum sebanyak 10% (umur 24 jam, OD=0,4) diinokulasikan pada 50 mL media yang terdiri dari 1 % CMC; 0,5 % pepton; 0,5 % ekstrak khamir; 0,1 % K_2HPO_4 ; dan 0,5 % NaCl) dan penambahan logam dengan variasi 0,02 % $MgSO_4$, $MnSO_4$, $CoCl_2$, Na_2CO_3 dan $CaCO_3$ (Yin *et al.*, 2010). Kultur diinkubasi pada suhu ruang dan pada pH optimum dengan penggojogan pada kecepatan 120 rpm. Waktu produksi enzim selulase disesuaikan dengan waktu fase pertumbuhan logaritmik pada kurva pertumbuhan. Kultur yang sudah diperoleh selanjutnya disentrifus untuk mendapatkan supernatan yang selanjutnya diuji aktivitas enzimnya menggunakan metode DNS.

3.7.3 Optimasi produksi selulase dengan variasi suhu

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua faktor yaitu jenis isolat dan suhu. Inokulum sebanyak 10 % (umur 24 jam, OD=0,4) diinokulasikan pada 50 mL media CYPE (1 % CMC; 0,5 % pepton; 0,5 % ekstrak khamir; 0,1% K_2HPO_4 ; dan 0,5 % NaCl) dengan penambahan 0,02 % logam yang optimum dan pH optimum. Kultur diinkubasi pada variasi suhu 30, 37, 45 dan 50 °C dengan penggojogan pada kecepatan 120 rpm (Yin *et al.*, 2010). Waktu produksi enzim selulase disesuaikan dengan waktu fase pertumbuhan logaritmik pada kurva pertumbuhan. Kultur yang sudah diperoleh selanjutnya disentrifus dan supernatan yang diperoleh diuji aktivitas enzimnya menggunakan metode DNS.

3.8 Produksi Enzim Selulase pada Kondisi Optimum

Inokulum sebanyak 10 % (umur 24 jam, OD=0,4) diinokulasikan pada 1000 mL media CYPE (1 % CMC; 0,5 % pepton; 0,5 % ekstrak khamir; 0,1 % K_2HPO_4 ; dan 0,5 % NaCl) dengan penambahan 0,02 % logam yang optimum, selanjutnya diinkubasi pada variasi suhu dan pH optimum dengan penggojogan pada kecepatan 120 rpm. Waktu produksi enzim selulase disesuaikan dengan waktu fase pertumbuhan logaritmik hasil dari kurva pertumbuhan. Kultur yang sudah diperoleh selanjutnya disentrifus pada suhu 4 °C kecepatan



10000 rpm selama 10 menit. Supernatan merupakan ekstrak enzim selulase kasar dimurnikan secara parsial menggunakan ammonium sulfat jenuh.

Ekstrak kasar enzim selulase dimurnikan dengan cara pengendapan menggunakan garam ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jenuh menggunakan fraksi kejenuhan 80 %. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ larut kemudian didiamkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Endapan dipisahkan dengan sentrifugasi dan dimurnikan lebih lanjut dengan dialisis (Pokhrel *et al.*, 2014).

3.9 Dialisis Ekstrak Enzim

Ekstrak enzim didialisis menggunakan kantung selofan. Kantung selofan dengan ukuran 14 kDa dipotong sesuai kebutuhan (± 10 cm) kemudian direbus menggunakan larutan 2 % NaHCO_3 dalam EDTA 1 mM selama 10 menit. Setelah dididihkan selama 10 menit, larutan tersebut dibuang dan kantung dialisis direbus kembali dengan air bebas ion selama 10 menit sebanyak 2 kali (Pokhrel *et al.*, 2014).

Masing-masing endapan dilarutkan dalam 5 mL larutan buffer fosfat 0,2 M pH 7 dan dimasukkan ke dalam kantung selofan. Kedua ujung kantung diikat dengan benang, kemudian didialisis dengan merendam kantong selofan dalam 500 mL larutan 0,05 M buffer fosfat pH 7. Proses dialisis ini menggunakan pengaduk magnetik dengan kecepatan 100 rpm pada suhu dingin, selama 12 jam. Setiap 3 jam larutan buffer perendam diganti. Enzim murni yang diperoleh diukur aktivitas selulase dan kadar proteinnya menggunakan nanodrop spektrofotometer uv-vis (Bajaj *et al.*, 2009).

3.10 Optimasi Aktivitas Enzim Selulase Hasil Pemurnian Parsial

3.10.1 Optimasi aktivitas dan kestabilan enzim selulase pada variasi pH

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua faktor yaitu jenis isolat dan pH. Substrat 1 % CMC dalam 1800 μL 20 mM buffer fosfat (pH: 6,7,8 dan 9) ditambah dengan 200 μL enzim selulase diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit (Yin *et al.*, 2010). Aktivitas enzim selulase dianalisis menggunakan metode DNS. Data aktivitas enzim dianalisis ragam dengan alfa 5 % menggunakan program SPSS 16. Kestabilan pH dapat dinyatakan dengan aktivitas relatif (%) yang merupakan perbandingan antara aktivitas



enzim terukur dengan aktivitas enzim optimum dikalikan 100 % (Wang *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2016).

$$\text{Aktivitas relatif (\%)} = \frac{\text{aktivitas enzim terukur}}{\text{aktivitas enzim optimum}} \times 100 \% \quad (3)$$

3.10.2 Optimasi aktivitas dan kestabilan enzim selulase pada variasi suhu

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua faktor yaitu jenis isolat dan suhu. Substrat 1 % CMC dalam 1800 μL 20 mM buffer fosfat (pH optimum) ditambah dengan 200 μL enzim selulase dan diinkubasi pada variasi suhu 40, 50, 60 dan 70 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit (Yin *et al.*, 2010). Aktivitas enzim selulase dianalisis menggunakan metode DNS. Data aktivitas enzim dianalisis ragam dengan alfa 5 % menggunakan program SPSS 16. Kestabilan suhu dapat dinyatakan dengan aktivitas relatif (%) yang merupakan perbandingan antara aktivitas enzim terukur dengan aktivitas enzim optimum dikalikan 100 % (Wang *et al.*, 2012).

3.10.3 Penentuan V_{\max} dan K_M enzim selulase hasil pemurnian parsial

Penentuan nilai V_{\max} dan K_M dengan cara analisis aktivitas selulase dengan variasi konsentrasi substrat CMC : 1 %; 2 %; 3 %; 4 % dan 5 % (b/v) dan dianalisis pada suhu dan pH optimum selama 30 menit. Substrat 1 % CMC dalam 1800 μL 20 mM buffer fosfat (pada pH optimum) ditambah dengan 200 μL enzim selulase dan dilakukan inkubasi selama 30 menit pada suhu optimum. Analisis aktivitas enzim menggunakan metode DNS. Perlakuan ini diulang untuk konsentrasi substrat CMC 2 %; 3 %; 4 % dan 5 % (b/v). Nilai V_{\max} dan K_M ditentukan dengan mentransformasikan persamaan Michaelis-Menten ke dalam persamaan 2 menurut Lineweaver-Burk (Aruwajoye, 2014).

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (4)$$

diperoleh nilai intersep = $\frac{1}{V_{\max}}$, slope = $\frac{K_M}{V_{\max}}$, $y = \frac{1}{v}$, dan $x = \frac{1}{[S]}$



3.11 Identifikasi Bakteri Selulolitik

3.11.1 Identifikasi bakteri selulolitik secara fenotip menggunakan *Microbact 12E*

Bakteri diinkubasi selama 24 jam kemudian disuspensikan ke dalam 3-6 mL garam fisiologis pada tabung reaksi steril. Suspensi bakteri sebanyak 100 UI (4 tetes) diteteskan kedalam sumur *Microbact*, untuk sumur Ornitin, lysin, dan H₂S ditambah 1-2 tetes *mineral oil* dan dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Oxoid, 2004).

Microbact yang telah diinkubasi ditambahkan reagent *Indol Kovacs* sebanyak 2 tetes pada sumur nomor 8, satu tetes pada sumur nomor 10 dengan larutan VP I dan VP II, dan satu tetes TDA pada sumur 12. Pada masing-masing sumur *microbact* diamati positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel dan hasil yang diperoleh dicatat pada formulir *Patient Record*. Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*). Identifikasi bakteri berdasarkan angka *oktal* yang diperoleh (Oxoid, 2004). Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dibandingkan dengan literatur pendukung menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994), untuk menentukan similaritas di antara isolat-isolat menggunakan MVSP dengan *Simple Matching Coefisient* (SSM). Pengelompokan dilakukan dengan menggunakan algoritma UPGMA dan hasilnya disajikan dalam bentuk dendrogram (Wheeler & Kececioğlu, 2007).

3.11.2 Identifikasi bakteri secara filogenetik menggunakan 16S rDNA

Beberapa tahapan untuk identifikasi filogenetik meliputi a) isolasi DNA kromosomal, b) verifikasi dengan elektroforesis gel agarosa, c) amplifikasi 16S rDNA dengan PCR, d) Purifikasi ampikon 16S rDNA e) Sekuensing dan Analisis sekuen 16S rDNA.

Kromosomal DNA diisolasi menurut metode Ausubel *et al.* (2002). Kultur bakteri (umur 24 jam, OD=0,4) diambil sebanyak 1000 µL dalam tabung Eppendorf 1500 µL disentrifus pada kecepatan 10000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet sel diresuspensi dengan menambahkan buffer TE sebanyak 500 µL. Suspensi sel dihomogenkan menggunakan vortex dan disentrifus dengan kecepatan dan waktu yang sama. Endapan yang diperoleh diresuspensi dengan buffer TE sebanyak 500 µL dan 100 µL SDS 10 %. Suspensi sel dihomogenkan kemudian ditambahkan 10 µL enzim proteinase-K dan



diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi, ke dalam tabung eppendorf ditambahkan 500 µL larutan PCI, selanjutnya disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm pada suhu 4 °C. Supernatan sebanyak 400 µL dipindahkan ke tabung dalam *Eppendorf* steril. Pada larutan yang dipindahkan ditambahkan etanol absolut dingin sebanyak 800 µL, dan didinginkan pada suhu dingin (4 °C) selama tiga puluh menit kemudian disentrifus kembali selama 10 menit. Endapan disuspensi kembali dengan 70 % etanol sebanyak 500 µL, kemudian disentrifus lagi selama 10 menit. Endapan berupa pelet DNA dikeringkan menggunakan evaporator. Endapan diresuspensi dengan menambahkan ddH₂O 50 µL.

Sampel DNA dianalisis menggunakan gel elektroforosis agarosa, sebanyak 0.4 gram agarosa dilarutkan dalam buffer TE sampai 40 mL. Larutan agarosa didiamkan hingga hangat. Larutan agarosa dituangkan ke dalam alat pencetak gel agarosa dan ditunggu sampai membeku. Gel agarosa dimasukkan ke dalam loyang elektroforosis dan ditambahkan buffer TE hingga gel terendam (Fatchiyah *et al.* 2011).

Larutan *Loading dye* 3 µL diletakkan pada lembaran parafilm. Sampel DNA sebanyak 7 µL ditambahkan ke *Loading dye* dan dihomogenkan (ada perubahan warna menjadi biru tua). Sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa. Sampel DNA *Ladder* ukuran 1 kb dimasukkan ke dalam lubang sumur paling ujung. Sampel DNA dielektroforosis dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Gel agarosa diambil dari loyang dan untuk proses pewarnaan direndam menggunakan larutan EtBr selama 10 menit. Gel agarosa direndam dalam air selama 1 menit, selanjutnya pita DNA pada gel agarosa diamati menggunakan lampu UV transiluminator. Kemurnian dan konsentrasi DNA ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-VIS Nanodrop.

Sampel DNA dengan konsentrasi 150 ng/µL dimasukkan ke dalam tabung PCR sebanyak 2 µL, ditambah 10 µL reagen mastermix PCR, 6 µL ddH₂O, 10 pmol/µL primer *forward* 28f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') sebanyak 5 µL, 10 pmol/µL primer tengah 651f (5'-AAT TAC TGG GCG TAA AG-3') sebanyak 5 µL dan 10 pmol/µL primer reverse 1495r (5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG A-3') sebanyak 5 µL. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan pengaturan suhu pradenaturasi 94 °C selama 4 menit, denaturasi 95 °C selama 30 detik, penempelan primer 58 °C selama 4 menit



dan perpanjangan 72 °C selama 2 menit dengan siklus 35 kali. Setelah amplifikasi, dilakukan analisis gel elektroforesis dengan konsentrasi 1 % (Yang *et al.*, 2014).

Amplikon 16S rDNA diambil sebanyak 30 µL dan dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* 1000 µL, selanjutnya ditambahkan 70 µL ddH₂O dan 500 µL *binding buffer* dan dibolak-balik secara perlahan. Seluruh campuran dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm, pada suhu 4 °C selama satu menit. Supernatan dibuang, pellet DNA ditambahkan 500 µL *wash buffer* ke dalam tabung reaksi dan disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm pada suhu 4 °C selama 1 menit. Endapan dicuci dengan *wash buffer* dua kali. Sampel dimasukkan filter tube ke dalam tabung *Eppendorf*, ditambahkan 25 µL ddH₂O dan disentrifus pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang diperoleh pada dasar *Eppendorf* merupakan hasil purifikasi. Hasil purifikasi diverifikasi dengan elektroforesis gel agarosa konsentrasi 1 %.

Amplikon 16S rDNA disekuensing untuk memprediksi urutan basa menggunakan metode *dye terminator dideoxy* Sanger di Singapura. Sekuen 16S rDNA disejajarkan dengan data di GenBank menggunakan program Blast-N dari situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) melalui (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk menganalisis kemiripan spesies isolat yang diuji. Pohon filogeni dikonstruksi dengan *Software* MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Pohon filogeni dibuat dengan metode Maksimum Likelihood melibatkan algoritma Tamura-Nei model dengan *Bootstrap* sebanyak 1000 kali (Tamura *et al.*, 2013).

3.12 Identifikasi Gen Penyandi Endoglukanase

3.12.1 Desain primer

Primer untuk mengidentifikasi gen sistem selulase menggunakan urutan nukleotida gen endo-β-1,4-glukanase dari spesies bakteri selulolitik. Urutan nukleotida yang digunakan diunduh dari situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, selanjutnya disejajarkan (*di-alignment*) menggunakan program Bioedit. Daerah yang lestrai (*Conserv*) digunakan sebagai dasar untuk mendesain primer menggunakan software Primer di situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Ashe *et al.*, 2014). Susunan primer gen endoglukanase yaitu : *forward* (5'-TTCGCAGCAAGTGTAACGGA-3') dan *revers* (5'-CTCGCCGTACATCGCATAGT-3').



3.12.2 Amplifikasi gen penyandi endoglukanase menggunakan PCR

Sampel DNA dengan konsentrasi 150 ng/μL dimasukkan ke dalam tabung PCR sebanyak 2 μL, ditambah 10 μL reagen mastermix PCR, 6 μL ddH₂O, 10 pmol/μL primer *forward* (5'-TTCGCAGCAAGTGTAAACGGA-3') sebanyak 5 μL dan 10 pmol/μL primer *reverse* (5'-CTCGCCGTACATCGCATAGT-3') sebanyak 5 μL. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan pengaturan suhu pradenaturasi 94 °C selama 4 menit, denaturasi 94 °C, tigh puluh (30) detik, penempelan primer 54 °C selama 30 detik dan perpanjangan 72 °C selama 1 menit dan perpanjangan akhir 72 °C; 2 menit dengan siklus 35 kali. Setelah amplifikasi, dilakukan verifikasi menggunakan analisis gel elektroforesis dengan konsentrasi 1 % (Yang *et al.*, 2014).

3.12.3 Sekuensing dan analisis gen endoglukanase

Amplikon gen penyandi enzim selulase disekuensing menggunakan metode *dye terminator dideoxy* Sanger di Singapura dan hasil sekuen dianalisis untuk menentukan pohon filogeni gen endoglukanase, posisi *Open Reading Frame* (ORF), domain fungsional, struktur protein dan sisi aktif.

a. Penentuan pohon filogeni gen endoglukanase

Sekuen gen endoglukanase disejajarkan dengan data di *Gen Bank* menggunakan program Blast-X dari situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) melalui (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk menganalisis kemiripan gen endoglukanase dari spesies isolat yang diuji. Pohon filogeni dikonstruksi dengan *Software* MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Pohon filogeni dibuat dengan metode Maksimum Likelihood melibatkan algoritma Tamura-Nei model dengan *Bootstrap* sebanyak 1000 kali (Tamura *et al.*, 2013).

b. Penentuan *Open Reading Frame* (ORF)

Sekuen gen endoglukanase disejajarkan dengan sekuen gen endoglukanase dari isolat yang sama yang ada data di *Gen Bank* dari situs NCBI. Daerah ORF terdiri dari *start codon*, yang mengandung basa ATG, dan *stop codon*, mengandung TGA/TAG/TAA (Ozaki *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1995).



c. Penentuan domain fungsional

Sekuen gen endoglukanase dianalisis menggunakan BLAST-X dari situs NCBI untuk menentukan domain dan tingkat kesamaannya dengan nukleotida penyandi endoglukanase dari bakteri lain. Hasil BLAST-X dapat diketahui posisi domain katalitik, jenis gen endoglukanase dan kelompok glikosil hydrolase.

d. Penentuan struktur protein

Sekuen gen endoglukanase digunakan untuk memprediksi urutan dan struktur selulase menggunakan menggunakan *Software* “swissmodel” dan hasilnya diunduh dalam bentuk *file PDB* dan dianalisis strukturnya.

d. Penentuan sisi aktif menggunakan software *Prositate expasy*.

Sekuen protein gen endoglukanase dimasukkan dalam software *Prositate expasy* dan dilakukan *Scan prositate*. Hasil *Scan* akan menunjukkan posisi sisi aktif enzim.

e. Penentuan sisi aktif menggunakan metode *Docking*

Struktur protein endoglukanase isolat bakteri *indigenus* bekatul dalam bentuk *file PDB* diinteraksikan dengan ligan selobiosa (sebagai substrat) pada daerah sisi aktif (hasil analisis *Prositate expasy*). Interaksi ligan enzim, penentuan konformasi molekul dan sisi aktif dilakukan dengan *software* AutoDockTools4. Hasil *Docking* diamati konformasi interaksi yang terbaik yang ditandai dengan energi afinitas terendah (kcal/mol). Hasil konformasi terbaik diamati konfigurasi ikatan ligan pada sisi aktif enzim antara lain interaksi ikatan hidrofilik dan hidrofobik yang menandakan aktivitas katalitik.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kondisi Optimum Produksi Enzim Selulase Oleh Isolat Bakteri Selulolitik *Indigenous* Bekatul

4.1.1 Bakteri selulolitik *indigenous* bekatul

Bekatul yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil penggilingan padi beras putih jenis Ciherang asal Malang Indonesia. Bekatul yang digunakan untuk isolasi bakteri selulolitik mempunyai kadar selulosa 22,20 % dengan ukuran ≥ 60 mesh (Tabel 2). Adanya selulosa dalam bekatul memungkinkan diperoleh bakteri yang bersifat selulolitik.

Tabel 2. Komposisi kimia bekatul

No.	Senyawa Kimia	Komposisi (%)
1.	NDF (<i>Neutral detergent fiber</i>)	50,10
2.	ADF (<i>Acid detergent fiber</i>)	44,48
3.	Hemiselulosa	5,62
4.	Silikat	11,80
5.	Lignin	10,45
6.	Selulosa	22,20

Pada tahap isolasi bakteri selulolitik *indigenous* bekatul diperoleh 22 isolat bakteri. Pada skrining awal isolat bakteri selulolitik ditandai adanya zona bening pada saat uji menggunakan metode *Congo red*. Zona bening menunjukkan adanya glukosa hasil hidrolisis selulosa oleh enzim selulase, hal ini dikarenakan glukosa tidak bereaksi dengan pewarna *Congo red*. Isolat bakteri selulolitik yang mempunyai aktivitas tertinggi ditandai dengan nilai indeks selulolitik yang tinggi (lampiran 1).

Pada penelitian ini, nilai indeks selulolitik dari isolat bakteri selulolitik kurang dari 2, paling tinggi isolat BE 5 yaitu 1,8. Ada 14 isolat mempunyai indeks selulolitik rendah ($< 0,4$), dua isolat mempunyai indeks selulolitik 0,4 yaitu BE 1 dan BT 3. Ada lima isolat yang mempunyai indeks selulolitik 0,5 – 1 yaitu BE 8, BE 14, B3, B5 dan BT 2 (Gambar 7). Menurut Choi *et al.* (2005) bahwa ada empat kategori/klasifikasi reaksi enzim ekstraselular yang ditunjukkan dari nilai rasio diameter zona bening terhadap diameter koloni, pada enzim selulase disebut dengan nilai indeks selulolitik (Tabel 3).

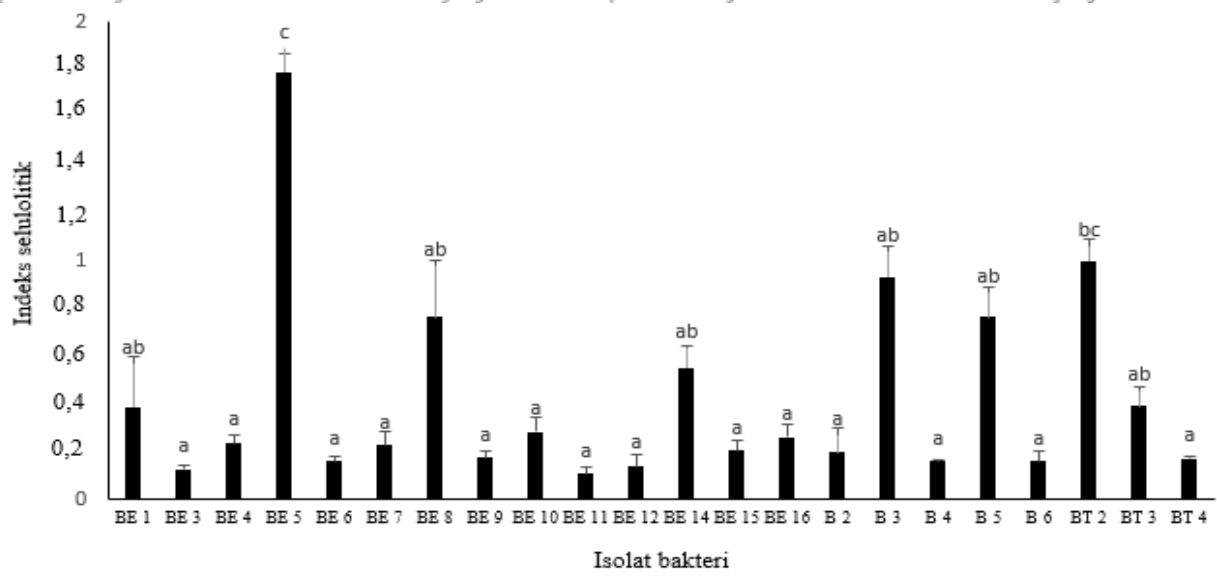


Tabel 3. Klasifikasi reaksi enzim ekstraselular

Rasio Enzim Ekstraselular	Reaksi
≥ 2	Tinggi
1-2	Sedang
≤ 1	Rendah
Tidak ada zona bening	Negatif

Sumber: Choi *et al.* (2005)

Nilai indeks selulolitik dari isolat bakteri *indigenous* bekatul memiliki kategori rendah sampai sedang. Hanya satu isolat yang masuk kategori sedang yaitu isolat BE 5, sedangkan isolat yang lain mempunyai kemampuan selulolitik yang rendah. Hal ini disebabkan isolat bakteri berasal dari bekatul yang mempunyai kadar selulosa yang tidak begitu tinggi (22,20 %) dan sebagian besar indeks selulolitik dari bakteri selulolitik berkisar 0,5 – 2. Reddy *et al.* (2018) memperoleh isolat bakteri selulolitik dari serbuk kayu dan kertas yang terkontaminasi tanah rata-rata mempunyai nilai indeks selulolitik 0,75 – 2,5. Ferbiyanto *et al.* (2015) mengisolasi bakteri selulolitik dari usus rayap mempunyai nilai indeks selulolitik 0,75 – 2,5.



Gambar 7. Potensi bakteri selulolitik *indigenous* bekatul notasi yang sama menunjukkan antar perlakuan tidak berbeda nyata; error bar menunjukkan standar deviasi



Pada skrining awal dipilih isolat bakteri selulolitik yang mempunyai indeks selulolitik $\geq 0,5$ yang dimiliki oleh isolat BE 5, BE 8, BE 14, B3, B5 dan BT 2. Isolat yang terpilih tersebut diuji lebih lanjut aktivitas selulolitiknya secara kuantitatif menggunakan metode DNS untuk mendapatkan bakteri selulolitik dengan aktivitas enzim selulase yang terbaik.

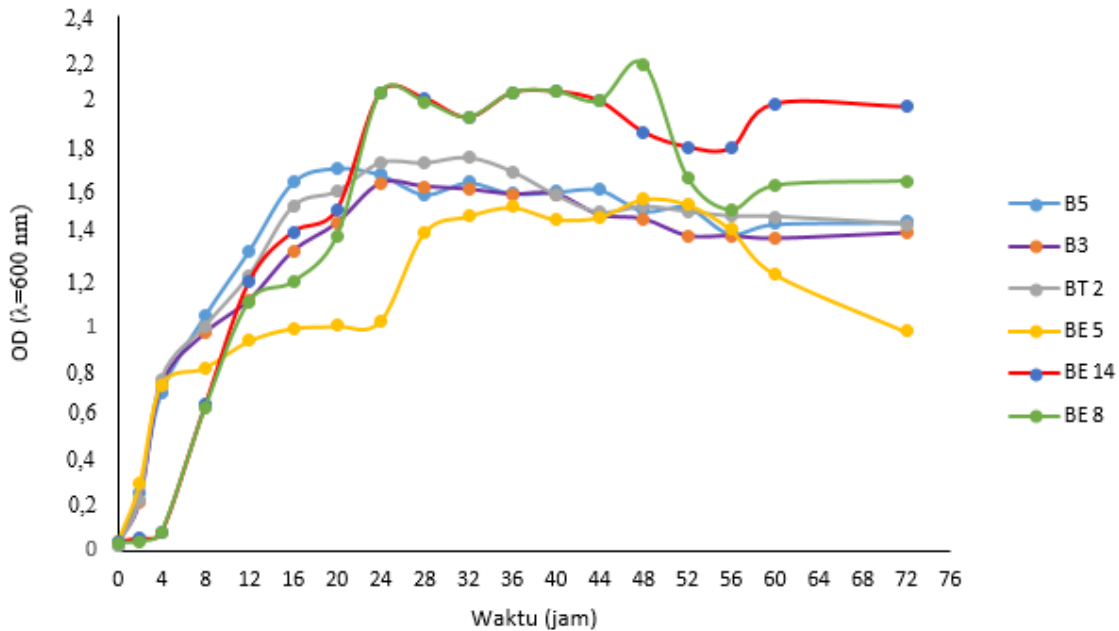
4.1.2 Kurva pertumbuhan isolat bakteri selulolitik terpilih

Pertumbuhan bakteri merupakan proses bertambahnya koloni bakteri baik massa atau ukuran atau subtansinya, atau bertambahnya jumlah sel bakteri. Pertumbuhan mikroorganisme bergantung pada ketersediaan air, nutrisi dan lingkungan yang mendukung untuk membentuk bahan sel dan memperoleh energi. Menurut Shahriarinnour *et al.* (2011a) bahwa biomassa sel meningkat dengan adanya komposisi medium yang diperkaya dengan nutrisi seperti penambahan sumber nitrogen, karbon maupun kalsium. Kurva pertumbuhan memberikan gambaran bahwa dalam siklus kehidupan bakteri memiliki 4 fase, yakni fase adaptasi, fase logaritmik, fase stasioner, dan fase kematian (Pelczar, 2008). Kurva pertumbuhan digunakan untuk mengetahui waktu inkubasi yang tepat dalam memproduksi enzim selulase secara maksimal dari bakteri selulolitik. Setiap mikroorganisme memiliki karakteristik pertumbuhan yang berbeda-beda. Pada penelitian ini kurva pertumbuhan dari isolat bakteri terpilih diamati mulai jam ke-0 sampai 72 (Gambar 8).

Fase adaptasi terjadi pada jam ke-0 sampai 4 untuk isolat BE 8 dan BE 14, fase adaptasi isolat BE 5, B 3 dan B 5 pada jam ke 0-2 jam. Fase eksponensial mulai 4-24 jam untuk isolat B 3, BE 8 dan BE 14, fase eksponensial mulai jam ke 4-20 untuk isolat B5; 4-32 pada isolat BT 2 dan 4-36 untuk isolat BE 5. Fase stasioner dimulai jam 24-48 jam (isolat BE 8), 24-44 jam (isolat BE14), 24-72 jam (BT 2), 24-56 jam (BE 5, B 3 & B5). Panjang pendeknya fase pertumbuhan tersebut dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi dalam media pertumbuhannya seperti sumber karbon, nitrogen, oksigen, hidrogen, fosfor dan logam lainnya dalam jumlah kecil. Enzim selulase yang diproduksi oleh bakteri selulolitik bersifat inducibel, artinya enzim selulase dapat diproduksi ketika ada substrat yang sesuai yaitu selulosa atau CMC (*Carboxymethyl cellulose*). Faktor lingkungan seperti suhu, pH, tekanan osmosis, kadar air, kadar oksigen juga memengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Pada kondisi lingkungan yang cocok mikroorganisme dapat mempertahankan kelangsungan



hidupnya, melakukan proses biokimiawi berkelanjutan sehingga mikroorganisme dapat tumbuh lebih cepat.



Gambar 8. Kurva pertumbuhan isolat bakteri selulolitik terpilih

Kurva pertumbuhan mempunyai pola normal apabila periode fase adaptasi tidak terlalu lama, fase eksponensial cukup tinggi, fase stasioner tidak terlalu pendek untuk menuju fase kematian. Isolat BE 14 memiliki pola pertumbuhan optimum tertinggi dan mempunyai fase stasionernya panjang belum mencapai fase kematian pada jam ke-72. Isolat BE 8 memiliki pola pertumbuhan optimum yang sama dengan isolat BE 14, namun fase stasionernya lebih pendek dan mulai jam ke-48 sudah memasuki fase kematian. Isolat BE 5 mempunyai pola pertumbuhan optimum yang paling rendah dan fase kematian paling cepat, ini menandakan bahwa populasi sel dari isolat BE 5 lebih rendah dibandingkan kelima isolat yang lain.

Beberapa penelitian kurva pertumbuhan bakteri selulolitik dari *Genus Bacillus* antara lain Seo *et al.* (2013) melaporkan bahwa fase eksponensial pertumbuhan *Bacillus licheniformis* dimulai jam ke-4 sampai 16, sedangkan Yang *et al.* (2014) melaporkan fase eksponensial pertumbuhan isolat BY-2 *Bacillus subtilis* adalah 0-20 jam, fase stasioner 20-39 jam, dan fermentasi untuk produksi enzim selulase dilakukan selama 24 jam. Meng *et al.*



(2014) melakukan produksi enzim selulase selama 24 jam. Seo *et al.* (2013) menyatakan bahwa fase eksponensial *Bacillus licheniformis* JK7 pada inkubasi 6 sampai 16 jam.

Tabel 4. Laju pertumbuhan isolat bakteri selulolitik pada fase eksponensial

Isolat	Jumlah sel (N) ($\times 10^7$)		t (jam)	Laju pertumbuhan (generasi/jam)
	No	Nt		
B 3	0,5448	1,1953	22	0,2505
B 5	0,5639	1,1982	14	0,3969
BT 2	0,5501	1,1479	14	0,3988
BE 5	0,7855	1,1982	24	0,2515
BE 8	0,4846	1,3806	20	0,2567
BE 14	0,4837	1,3805	20	0,2566

Pada kurva pertumbuhan dapat diukur laju pertumbuhan sel dari meningkatnya jumlah sel per satuan waktu. Bakteri mampu memperbanyak diri dengan pembelahan biner, yaitu satu sel membelah menjadi dua sel baru. Waktu yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk membelah diri dari satu sel menjadi dua sel sempurna per satuan waktu disebut waktu generasi. Setiap jenis mikroorganisme memiliki waktu generasi yang berbeda-beda. Populasi mikroorganisme mengalami pembelahan paling tinggi dan konstan pada fase eksponensial. Laju pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi yang cukup, faktor lingkungan yang optimum seperti pH, suhu, ion anorganik dan faktor genetik (Prescott, 1999).

Pada kondisi nutrisi dan lingkungan yang optimum, bakteri akan lebih cepat tumbuh. Pada kurva pertumbuhan ini semua isolat ditumbuhkan pada media yang sama yaitu media CYPE, pH 7 dan suhu 30 °C selama 72 jam. Laju pertumbuhan isolat B 5 dan BT 2 memiliki laju pertumbuhan paling cepat, hal ini dikarenakan waktu pertumbuhan eksponensial yang pendek yaitu 14 jam (Tabel 4). Semakin pendek waktu eksponensial maka laju pertumbuhan bakteri semakin cepat. Pada fase eksponensial kondisi fisiologis bakteri untuk tumbuh dan metabolisme paling aktif, hal ini dikarenakan jumlah nutrisi yang cukup untuk mendukung pertumbuhan sel.

Isolat B 3, BE 5, BE 8 dan BE 14 memiliki laju pertumbuhan yang lebih rendah dikarenakan waktu pertumbuhan eksponensialnya lebih panjang. Pada fase akhir



eksponensial produksi enzim selulase paling tinggi dan pada fase stasioner terjadi penurunan produksi enzim selulase yang disebabkan adanya represi metabolit oleh molekul yang dilepaskan setelah hidrolisis selulosa seperti selobiosa atau glukosa (Seratale & Oh, 2011).

Pada penelitian ini enzim selulase untuk keenam isolat diproduksi sampai akhir fase eksponensial.

4.1.3 Aktivitas enzim selulase secara kuantitatif

Aktivitas enzim selulase diukur secara kuantitatif menggunakan metode DNS (*Dinitrosalicylic Acid*) dengan prinsip reaksi oksidasi reduksi. Glukosa sebagai hasil hidrolisis enzim selulase terhadap substrat selulosa akan mengalami oksidasi pada gugus aldehidnya menjadi gugus karboksil. DNS mengalami reduksi menjadi 3-amino dan 5-nitrosalisilat yang mampu menyerap gelombang magnetik pada panjang gelombang 500-550 nm. Metode DNS ini secara umum menggunakan substrat yang mengandung selulosa seperti CMC atau disebut dengan aktivitas endoglukanase. Satu unit aktivitas endoglukanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghidrolisis substrat CMC dan melepaskan 1 μg glukosa pada suhu 50 °C selama 1 menit reaksi (Yin *et al.*, 2010).

Metode DNS ini merupakan metode analisis secara spektrofotometri, sehingga membutuhkan data panjang gelombang maksimum untuk mengetahui absorbansi/ serapan yang paling optimal dan kurva standar glukosa sebagai acuan konsentrasi glukosa sampel. Pada penelitian ini diperoleh serapan yang paling tinggi terjadi pada panjang gelombang 530 nm. Pada gelombang tersebut selanjutnya digunakan untuk pengukuran absorbansi pada pembuatan kurva standar dan sampel untuk uji aktivitas enzim selulase menggunakan metode DNS (lampiran 5). Berdasarkan kurva standar tersebut diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,057x - 0,2128$ dengan nilai $R^2 = 0,9967$. Regresi linier digunakan untuk menghitung konsentrasi glukosa, yang selanjutnya digunakan untuk menghitung aktivitas enzim. Nilai R menunjukkan linieritas dari hasil analisis apabila nilai R semakin mendekati 1 maka semakin baik dan akurat hasilnya.

Aktivitas enzim dari isolat terpilih diuji secara kuantitatif berdasarkan kemampuannya memproduksi enzim selulase β -1,4-endoglukanase, eksoglukanase dan β -1,4-glukosidase (Tabel 5). Tujuan uji aktivitas secara kuantitatif ini untuk memilih isolat



yang paling tinggi aktivitas selulasaanya. Kemampuan isolat dalam menghidrolisis substrat CMC atau disebut aktivitas β -1,4-endoglukanase (CMCase) tertinggi 2,1622 U/mL untuk isolat BE 8 dan 1,3142 U/mL untuk isolat BE 14 (Tabel 5). Aktivitas endoglukanase isolat BE 5, B 3, B 5, dan BT 2 sekitar $\pm 0,7$ U/mL, tidak berbeda nyata ($p \geq 0,05$). Aktivitas selulase/endoglukanase secara kualitatif, isolat BE 5 mempunyai indeks selulolitik tertinggi dibandingkan isolat lain, sedangkan secara kuantitatif aktivitasnya rendah. Hal ini dikarenakan saat pengujian ada perbedaan kondisi lingkungan mikro yang berbeda antara medium padat dengan kultur cair atau medium cair sehingga memengaruhi produksi enzim (Purwadaria *et al.*, 2003). Pada pengukuran aktivitas enzim secara kuantitatif merupakan akumulasi aktivitas enzim yang diproduksi, semakin lama fase eksponensial maka semakin tinggi populasi dan produksi enzimnya. Pola pertumbuhan optimum isolat BE 5 paling rendah, yang menyebabkan rendahnya populasi sel dan produksi enzim selulase meskipun mempunyai waktu eksponensial yang lebih panjang.

Tabel 5. Aktivitas enzim β -1,4-endoglukanase (CMCase), eksoglukanase (avicelase) dan glukosidase (Selobiase) 6 isolat terpilih

Kode Isolat	Aktivitas (U/mL)		
	β -1,4-endoglukanase	β -1,4-eksoglukanase	β -1,4-glukosidase
BE 5	0,7138 \pm 0,003 ^a	0,6117 \pm 0,03 ^a	164,1520 \pm 11,60 ^c
BE 8	2,1622 \pm 0,14 ^c	0,6357 \pm 0,02 ^a	163,6647 \pm 8,81 ^c
BE 14	1,3142 \pm 0,14 ^b	0,6182 \pm 0,03 ^a	164,6394 \pm 15,01 ^c
B 3	0,7294 \pm 0,01 ^a	0,6123 \pm 0,03 ^a	134,2788 \pm 6,88 ^a
B 5	0,7294 \pm 0,03 ^a	0,6377 \pm 0,002 ^a	129,4055 \pm 8,57 ^a
BT 2	0,7236 \pm 0,02 ^a	0,6052 \pm 0,04 ^a	139,7368 \pm 7,58 ^b

Keterangan : notasi yang sama dalam kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata antar isolat ($p \geq 0,05$)

Pada kemampuan menghidrolisis avicel atau aktivitas avicelase, semua isolat mempunyai kemampuan yang sama ($p \geq 0,05$) rata-rata 0,6 U/ mL. Aktivitas avicelase relatif tertinggi dimiliki isolat B 5 diikuti isolat BE 8 dan BE 14. Vijayaraghavan dan Vincent (2012) melaporkan bahwa enzim kasar *Bacillus* sp. memiliki aktivitas tinggi CMCase (16,5 U/mg) dibandingkan avicelase. Yin *et al.* (2010) menunjukkan bahwa enzim murni *Bacillus subtilis* YJ1 memiliki aktivitas CMCase yang tinggi (100 %) dibandingkan avicelase (34 %). Yan *et*



al. (2011) menyatakan bahwa enzim murni *Bacillus cereus* memiliki aktivitas CMCase tinggi (4,38 IU/mL) dibandingkan avicelase (0 IU/mL).

Aktivitas glukosidase dalam penelitian ini mempunyai nilai yang tinggi dibandingkan aktivitas CMCase dan avicelase, karena enzim glukosidase lebih mudah dalam menghidrolisis substrat selobiosa menjadi glukosa. Substrat selobiosa mempunyai susunan molekul yang terdiri dari 2 monomer glukosa, sedangkan avicel dan CMC merupakan polimer panjang dari glukosa. Avicel lebih kristalin dibandingkan CMC sehingga enzim selulase lebih sulit menghidrolisis avicel dibandingkan CMC, ini dapat dilihat dari aktivitas avicelase lebih rendah dibandingkan CMCase. Banyak faktor yang memengaruhi laju hidrolisis enzimatik, yaitu kristalinitas selulosa dianggap salah satu yang paling penting.

Gundllapalli *et al.* (2007) menyatakan bahwa pada penurunan kristalinitas, selulosa menjadi lebih mudah untuk dihidrolisis secara enzimatik. Struktur kristalin dalam substrat selulosa karena adanya ikatan hidrogen inter dan antar molekuler sehingga sangat sulit dihidrolisis. Isolat BE 14 mempunyai aktivitas glukosidase tertinggi diikuti isolat BE 5 dan BE 8. Untuk menentukan isolat bakteri selulolitik potensial didasarkan pada aktivitas endoglukanase tertinggi yaitu BE 8 dan BE 14.

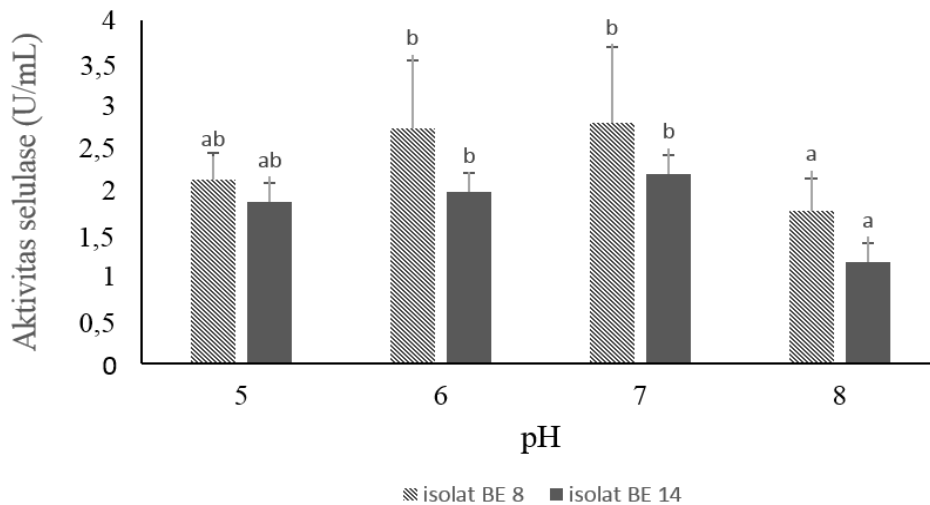
Berdasarkan uji aktivitas secara kuantitatif (Tabel 5) bahwa isolat bakteri selulolitik *indigenous* bekatul mempunyai sistem selulase yang lengkap yaitu adanya aktivitas endoglukanase, avicelase/eksoglukanase dan β -glukosidase. Hal ini berbeda dengan pernyataan Ming (2012) bahwa mekanisme hidrolisis selulosa antara jamur dan bakteri berbeda. Jamur menghidrolisis selulosa menggunakan endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase, sedangkan bakteri hanya menggunakan endoglukanase dan β -glukosidase serta tidak menghasilkan eksoglukanase. Hasil tersebut juga berbeda dengan hasil penelitian Yin *et al.* (2010) bahwa isolat *Bacillus subtilis* YJ1 mempunyai aktivitas endoglukanase dan eksoglukanase, sedangkan aktivitas β -glukosidase tidak ada. Kim *et al.* (2008) melaporkan bahwa enzim selulase dari *Cynenococcus* sp. memiliki aktivitas endoglukanase dan eksoglukanase.



4.1.4 Produksi optimum enzim selulase bakteri selulolitik *indigenus* bekatul

Aktivitas enzim secara optimum membutuhkan kondisi lingkungan dan komposisi media yang optimum juga. Kondisi tersebut sangat bervariasi bergantung jenis bakteri atau mikroorganismenya.

Pengaruh pH awal media pada produksi enzim selulase. pH awal media memengaruhi pertumbuhan sel bakteri, produksi dan aktivitas enzim selulase. Pada pH optimum, seluruh enzim yang mengikat substrat akan aktif dan mengubah substrat menjadi produk dengan kecepatan yang tinggi. Sisi-sisi aktif yang dimiliki enzim berperan sebagai katalis dalam pembentukan kompleks enzim-substrat. Aktivitas enzim akan berpengaruh ketika terjadi perubahan pH melalui perubahan struktur atau muatan residu asam amino, perubahan konformasi enzim dan menyebabkan terganggunya ikatan ionik dan terputusnya folding maksimum. Kondisi tersebut bisa menurunkan aktivitas enzim atau bahkan enzim menjadi tidak aktif.



Gambar 9. Aktivitas selulase pada variasi pH media produksi waktu inkubasi 24 jam notasi yang sama menunjukkan aktivitas enzim tidak berbeda antar perlakuan ($p > 0,05$); error bar menunjukkan standar deviasi

Pada variasi pH awal media, aktivitas selulase relatif paling tinggi pada pH 7 baik untuk isolat BE 8 maupun BE 14 dengan aktivitas selulase masing-masing 2,80 U/mL dan 2,21 U/mL (Gambar 9). Variasi pH ini berpengaruh terhadap aktivitas selulase ($p < 0,05$), sedangkan jenis isolat tidak memengaruhi aktivitas selulase artinya bahwa isolat BE 8 dan



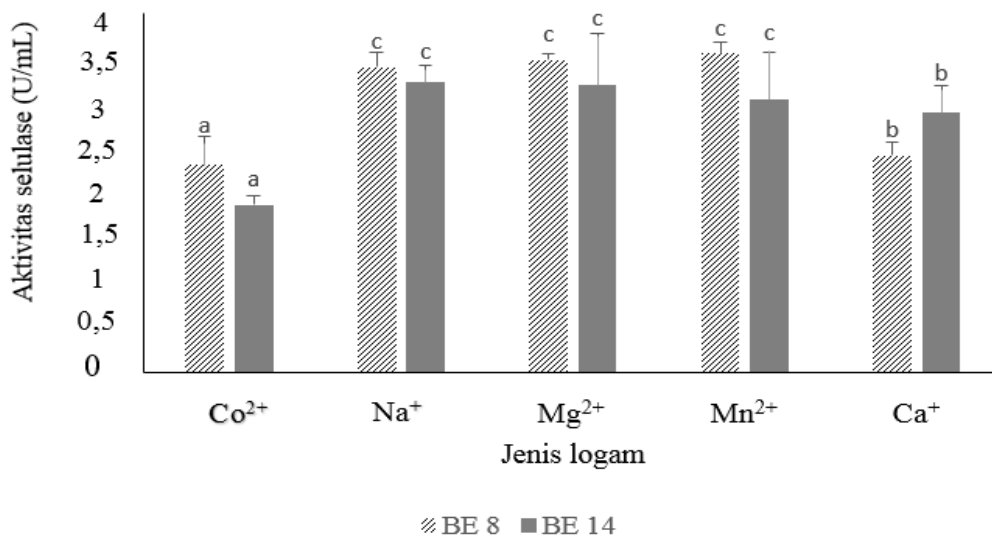
isolat BE 14 mempunyai kemampuan yang sama dalam memproduksi enzim selulase. Beberapa penelitian menunjukkan pH optimum untuk produksi enzim selulase terjadi pada kisaran pH netral (Immanuel *et al.*, 2006). Ladeira *et al.* (2015) melaporkan bahwa *Bacillus* sp. SMIA-2 optimum tumbuh pada pH 8 dengan aktivitas CMCase sebesar 0,29 U/mL. Sethi *et al.* (2013) menunjukkan produksi enzim selulase oleh kelompok *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens* dan *E.coli* optimum pada pH 7 dengan aktivitas selulase masing-masing 0,9; 0,9; 0,4 dan 0,8 U/mL. *Bacillus subtilis* memproduksi enzim selulase optimum pada pH 7,2 dan aktivitas selulase 0,43 U/mL (Deka *et al.*, 2013). Nilai aktivitas selulase yang dimiliki isolat *indigenous* bekatul lebih tinggi dibandingkan isolat referensi, ini dikarenakan ada perbedaan strain bakteri, asal isolat dan kondisi lingkungan.

Pengaruh logam pada media terhadap produksi enzim selulase. Penambahan logam pada media produksi dapat meningkatkan atau menurunkan pertumbuhan sel bakteri dan produksi enzim/aktivitas enzim (Shahriarinnour *et al.*, 2011). Logam kation diduga bertanggung jawab atas beberapa perubahan permeabilitas dinding sel yang menghasilkan ekskresi lebih cepat dari enzim, yang dapat meningkatkan sintesis selulase (Chen dan Wayman, 1992). Pada perlakuan ini media produksi ditambahkan logam kation Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} dan Na^{+} diatur pada pH 7, suhu ruang (30 °C) selama 24 jam. Menurut Mandel & Reese (1999) bahwa kation logam seperti Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} dan Co^{2+} dan Zn^{2+} diperlukan untuk sintesis selulase oleh *Trichoderma viride* QM6a. Pada konsentrasi tertentu magnesium diperlukan untuk produksi selulase, tetapi pada konsentrasi tinggi akan menghambat, namun hal ini bisa diatasi oleh logam kalsium.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan logam Mn^{2+} pada media produksi isolat BE 8 dapat meningkatkan produksi selulase/aktivitas enzim dibandingkan kontrol (media produksi dengan tambahan logam 0,02 % Mg^{2+}) yaitu dari aktivitas 3,48 U/mL menjadi 3,55 U/mL tetapi peningkatannya yang tidak signifikan ($p > 0,05$) sebesar 2 % (Gambar 10). Pada media produksi isolat BE 14, penambahan logam Na^{+} meningkatkan aktivitas enzim dibandingkan kontrol yaitu dari aktivitas 3,20 U/mL menjadi 3,23 U/mL, terjadi peningkatan aktivitas tidak signifikan ($p > 0,05$) sebesar 1 %.



Pengaruh logam Co^{2+} dan Ca^{2+} pada media menurunkan aktivitas enzim atau berperan sebagai inhibitor untuk isolat BE 8 dan isolat BE 14. Penambahan logam Co^{2+} dan Ca^{2+} pada media pertumbuhan isolat BE 8 menghasilkan aktivitas masing-masing 2,32 dan 2,42 U/mL dibandingkan kontrol 3,48 U/mL. Aktivitas tersebut masing-masing mengalami penurunan sebesar 33,33 % dan 30,46 %. Pengaruh logam Co^{2+} dan Ca^{2+} pada media pertumbuhan isolat BE 14 diperoleh aktivitas masing-masing 1,87 dan 2,9 U/mL. Aktivitas tersebut menurun dibandingkan kontrol (3,2 U/mL).



Gambar 10. Aktivitas selulase pada variasi logam media produksi notasi yang sama menunjukkan aktivitas enzim tidak berbeda antar perlakuan ($p > 0,05$); error bar menunjukkan standard deviasi

Pengaruh penambahan logam Na^{+} , Mg^{2+} dan Mn^{2+} pada aktivitas enzim selulase baik untuk isolat BE 8 dan BE 14 menunjukkan tidak berbeda nyata ($P \geq 0,05$). Pada perlakuan berikutnya untuk produksi enzim selulase digunakan logam Mg^{2+} dan pH 7. Kotchoni *et al.* (2003) dan Shankar & Isaiarasu (2011) melaporkan bahwa *Bacillus pumilus* optimum memproduksi selulase dengan penambahan 0,02 % Ca^{2+} , mengalami peningkatan sebesar 23 %. Pada produksi selulase oleh *Aspergillus terreus* optimum dengan penambahan logam Mg^{2+} pada konsentrasi 5 mM dengan peningkatan aktivitas 100 % dibanding kontrol (Shahriarinnour *et al.*, 2011b). Produksi selulase oleh *Aspergillus melleus* UPAG01 dihambat oleh Cu^{2+} pada konsentrasi 0,1 M dan meningkat karena adanya ion Ca^{2+} (Danmek *et al.*,



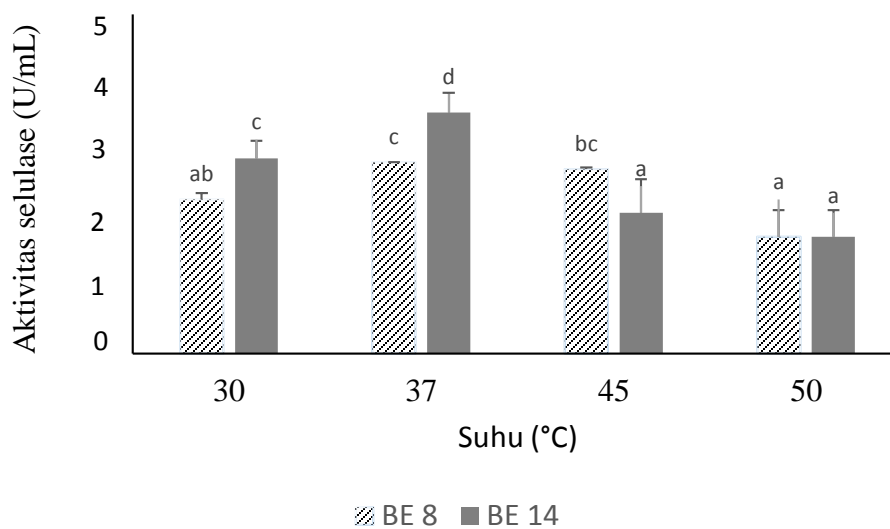
2014). Kalsium (Ca^{2+}) pada konsentrasi rendah akan menjadi aktivator untuk enzim selulase, pada konsentrasi tinggi akan menjadi inhibitor (Vyas *et al.*, 2005). Konsentrasi Ca^{2+} lebih dari 1 mmol/L akan menghambat aktivitas enzim selulase (Wang *et al.*, 2012). Ion logam K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} dan Fe^{3+} pada konsentrasi 1 mmol/L sedikit mempengaruhi aktivitas enzim selulase, sebaliknya Co^{2+} akan meningkatkan aktivitas selulase (Mawadza *et al.*, 2000). Pada penelitian ini konsentrasi ion logam yang digunakan sebesar 0,02 % atau 5 mmol/L untuk Ca^{2+} dan 3,4 mmol/L, sehingga penambahan logam Ca^{2+} dan Co^{2+} menjadi inhibitor karena besarnya konsentrasi yang digunakan (>1 mmol/L). Namun untuk penambahan 0,02 % logam Na^+ , Mg^{2+} , dan Mn^{2+} pada konsentrasi masing-masing 8,7 mmol/L, 8,3 mmol/L dan 3,6 mmol/L ini dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase isolat BE 8 dan BE 14.

Pengaruh suhu media pada produksi enzim selulase. Pada reaksi enzimatik, untuk mengubah substrat menjadi produk maka enzim harus bereaksi dengan sisi aktif substrat. Meningkatkan suhu media fermentasi meningkatkan aktivitas enzim per satuan waktu. Peningkatan suhu fermentasi meningkatkan energi internal molekul dalam sistem meliputi energi translasi, energi vibrasi dan energi rotasi molekul, energi yang terlibat dalam ikatan kimia dari molekul serta energi yang terlibat dalam interaksi nonbonding. Beberapa panas dapat diubah menjadi energi potensial kimia. Jika energi potensial ini meningkat maka beberapa ikatan lemah yang menentukan bentuk tiga dimensi protein aktif banyak yang rusak. Hal ini dapat menyebabkan denaturasi termal protein dan dengan demikian menonaktifkan protein. Terlalu banyak panas dapat menyebabkan laju reaksi yang dikatalisis mengalami penurunan karena enzim atau substrat menjadi terdenaturasi dan tidak aktif (Nishiura, 1999). Pada produksi enzim selulase ini digunakan variasi suhu 30, 37, 45 dan 50 °C.

Pada penelitian ini aktivitas enzim selulase optimum pada suhu 37 °C baik untuk isolat BE 8 dan BE 14 secara berurutan masing-masing 2,82 U/mL dan 3,55 U/mL (Gambar 11). Pada variasi suhu, isolat BE 14 mempunyai aktivitas relatif lebih tinggi dibandingkan isolat BE 8. Hal ini tampak berbeda dibandingkan perlakuan sebelumnya bahwa isolat BE 8 selalu mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan isolat BE 14. Isolat BE 14



memiliki kemampuan produksi selulase yang baik pada suhu 37 °C dan turun drastis pada suhu 45 °C dan 50 °C. Isolat BE 8 mampu memproduksi selulase dengan baik pada suhu 37 °C, menurun sedikit pada suhu 45 °C, dan turun drastis pada suhu 50 °C.



Gambar 11. Aktivitas selulase pada variasi suhu media produksi notasi yang sama menunjukkan aktivitas enzim tidak berbeda antar perlakuan ($p>0,05$); error bar menunjukkan standar deviasi

Beberapa penelitian melaporkan bahwa produksi enzim selulase *Bacillus subtilis* optimum pada suhu 40 °C dengan aktivitas selulase 0,6 U/mL (Sethi *et al.*, 2013), *Bacillus subtilis* Subsp. *Inaquosorum* optimum memproduksi selulase pada suhu 37 °C dengan aktivitas selulase 71,15 U/mL (Gautam and Sharma, 2014). Produksi selulase oleh jamur optimum pada suhu lebih rendah, seperti yang dilaporkan oleh Shahriarinnour *et al.* (2011b) bahwa *Apergillus terreus* optimum memproduksi selulase pada suhu 28 °C selama 8 hari dengan aktivitas 8,5 U/mL, sedangkan *Aspergillus niger* optimum memproduksi selulase pada suhu 26 °C selama 10 hari dengan aktivitas 3,05 U/mL (Shahriarinnour *et al.*, 2011a).

4.2 Aktivitas Enzim Selulase Hasil Pemurnian Parsial Isolat Bakteri Terpilih

Enzim selulase dimurnikan secara parsial menggunakan ammonium sulfat dan dialisis. Karakter enzim diamati aktivitas enzim pada variasi suhu, pH, dan substrat. Enzim selulase



yang dikarakterisasi merupakan hasil purifikasi secara parsial menggunakan ammonium sulfat dengan konsentrasi kejenuhan 80 % dan dilanjutkan dengan dialisis. Hasil pemurnian enzim selulase menunjukkan peningkatan aktivitas selulase spesifik sebesar 5,8 kali untuk isolat BE 8 dan 3,2 kali untuk isolat BE 14. Peningkatan aktivitas enzim isolat BE 8 lebih tinggi dibandingkan isolat BE 14, dikarenakan perbedaan spesies dan aktivitas selulase kasar isolat BE 8 lebih tinggi dari isolat BE 14. Isolat BE 8 merupakan spesies *Bacillus subtilis* dan BE 14 adalah *Bacillus cereus*.

Tabel 6. Aktivitas selulase sebelum dan setelah pemurnian secara parsial isolat BE 8 dan isolat BE 14.

Sampel	Aktivitas Selulase (U/mL)	Protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik	Faktor kemurnian
Enzim kasar isolat BE 8	2,53	7,64	0,33	1 kali
Fraksi Ammonium sulfat jenuh 80 %	1,76	0,91	1,93	5,8 kali
Enzim kasar isolat BE 14	3,74	7,08	0,53	1 kali
Fraksi Ammonium sulfat jenuh 80 %	1,72	1,03	1,67	3,2 kali

Sebagian besar pemurnian enzim selulase secara parsial menggunakan ammonium sulfat jenuh 80-90 %. Yan *et al.* (2011) melaporkan bahwa pemurnian selulase *Bacillus cereus* menggunakan 90 % ammonium sulfat jenuh menghasilkan peningkatan aktivitas sebesar 2,48 kali. Selulase *Bacillus subtilis* dimurnikan dengan 80 % ammonium sulfat jenuh menghasilkan peningkatan aktivitas sebesar 1,49 kali (Gautam & Sharma, 2014). Pemurnian selulase *Bacillus sp.* menggunakan 40-80 % ammonium sulfat meningkat aktivitasnya 1,8 kali (Vijayaraghavan & Vincent, 2012). Terjadinya peningkatan aktivitas selulase spesifik murni dibandingkan ekstrak kasar dikarenakan terpisahnya protein selain enzim selulase pada saat pemurnian sehingga jumlah protein lebih sedikit sebagai pembagi dalam penghitungan aktivitas spesifik enzim selulase. Nilai aktivitas selulase hasil pemurnian parsial secara keseluruhan menurun dibandingkan aktivitas selulase sebelum dimurnikan. Hal ini dikarenakan hilangnya sebagian protein akibat pemurnian dan menggambarkan nilai sesungguhnya aktivitas selulase.

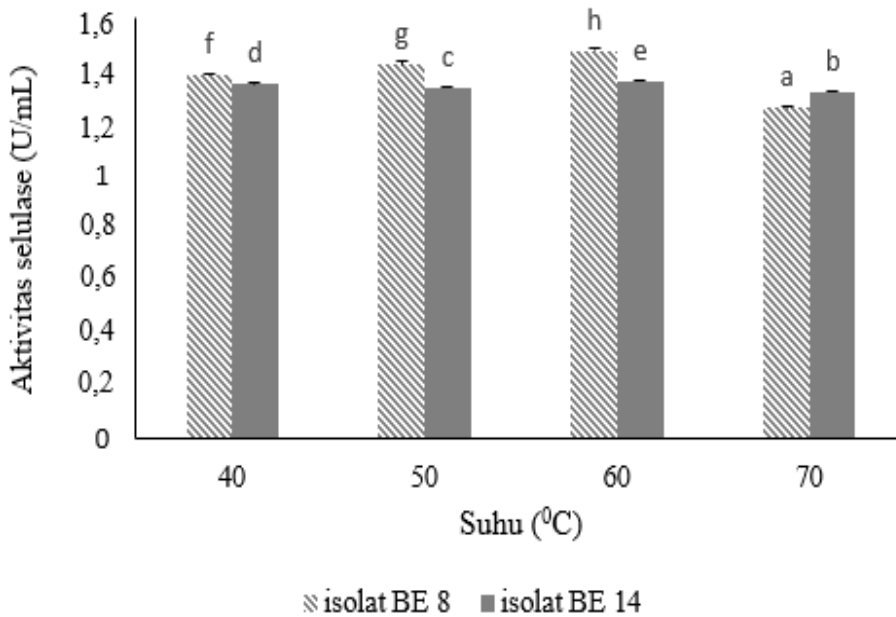


4.2.1 Pengaruh suhu pada aktivitas enzim selulase hasil pemurnian parsial

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim sangat kompleks, bahwa kenaikan suhu hingga suhu optimum, maka kecepatan reaksi enzim naik karena energi kinetik bertambah sehingga akan mempercepat gerak vibrasi, translasi, dan rotasi baik enzim maupun substrat.

Hal ini memperbesar peluang enzim bereaksi dengan substrat. Ketika suhu lebih tinggi dari suhu optimum, protein berubah konformasi (denaturasi) sehingga gugus aktif terhambat.

Selain itu substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga tidak dapat masuk ke dalam sisi aktif enzim.

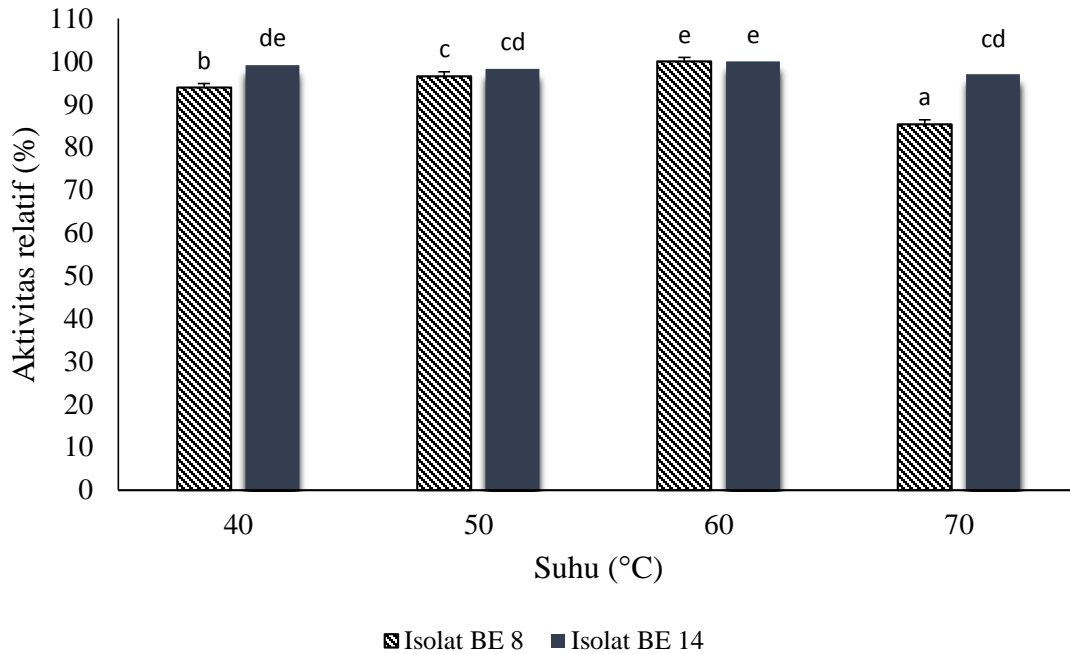


Gambar 12. Aktivitas enzim isolat BE 8 dan BE 14 pada variasi suhu

Aktivitas selulase tertinggi untuk isolat BE 8 dan BE 14 terjadi pada suhu 60 °C dengan aktivitas selulase masing-masing 1,48 U/mL dan 1,36 U/mL (Gambar 12 & 13). Aktivitas selulase hasil pemurnian parsial isolat BE 8 stabil pada suhu 40 - 60 °C, sedangkan isolat BE 14 stabil pada suhu 40 - 70 °C. Penurunan aktivitas enzim BE 8 terjadi pada suhu 70 °C yaitu 1,26 U/mL dan BE 14 menjadi 1,32 U/mL. Penurunan aktivitas tersebut tidak begitu besar, namun secara statistika ($p \geq 0,05$) perlakuan suhu, jenis isolat serta interaksi suhu dan jenis



isolat berpengaruh terhadap aktivitas enzim selulase (Lampiran 13). Semakin tinggi suhu pada reaksi enzimatik maka akan menurunkan aktivitas enzim, dikarenakan protein enzim mengalami denaturasi sehingga enzim menjadi inaktif.



Gambar 13. Stabilitas suhu enzim isolat BE 8 dan BE 14

Keterangan : notasi yang sama menunjukkan aktivitas enzim tidak berbeda antar perlakuan ($p \geq 0,05$); error bar menunjukkan standar deviasi

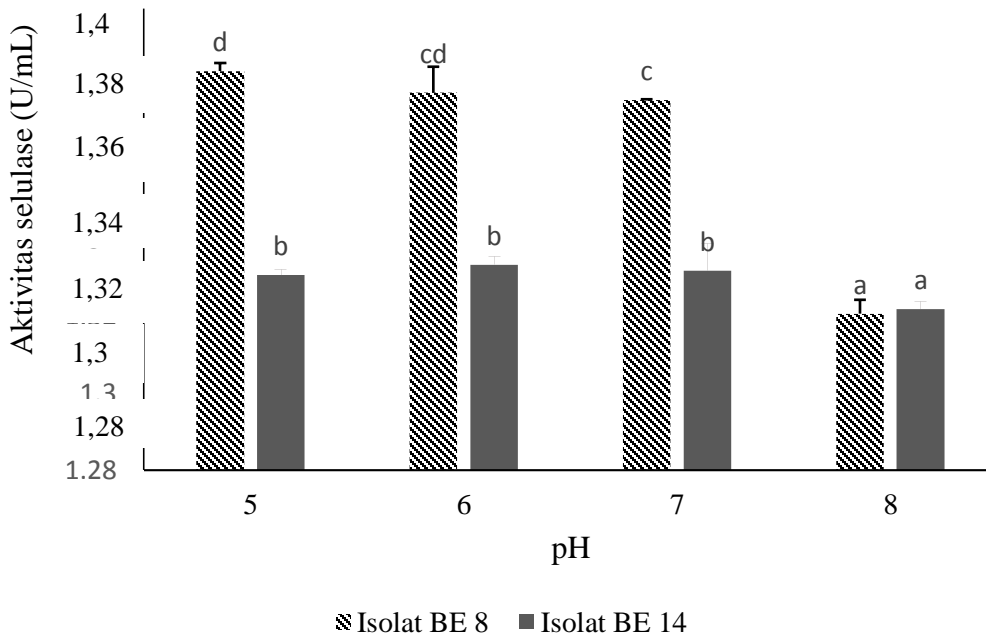
Berdasarkan penelitian (Yan *et al.*, 2011) *Bacillus cereus* optimum pada suhu 55°C dan stabil pada suhu 35 – 55 °C kemudian mengalami penurunan sangat drastis dan inaktif pada suhu 80 °C, *Bacillus subtilis* optimum pada suhu 60 °C dengan aktivitas selulase 0,9 U/mL, menurun aktivitasnya pada suhu 80 °C menjadi 0,3 U/mL (Pokhrel *et al.*, 2014). *Bacillus subtilis* YJ1 optimum pada suhu 60 °C dengan aktivitas relatif sebesar 100 % kemudian mengalami penurunan sangat drastis pada suhu 80 °C menjadi 3 % dan aktivitas enzim stabil pada suhu kurang dari 60°C (Yin *et al.*, 2010). Enzim selulase *Bacillus pumilus* aktif sampai pada suhu kurang dari 70°C, optimum pada suhu 60 °C dengan aktivitas selulase 0,65 U/mL, menurun aktivitasnya pada suhu 80 °C menjadi 0,1 U/mL (Ariffin *et al.*, 2006).



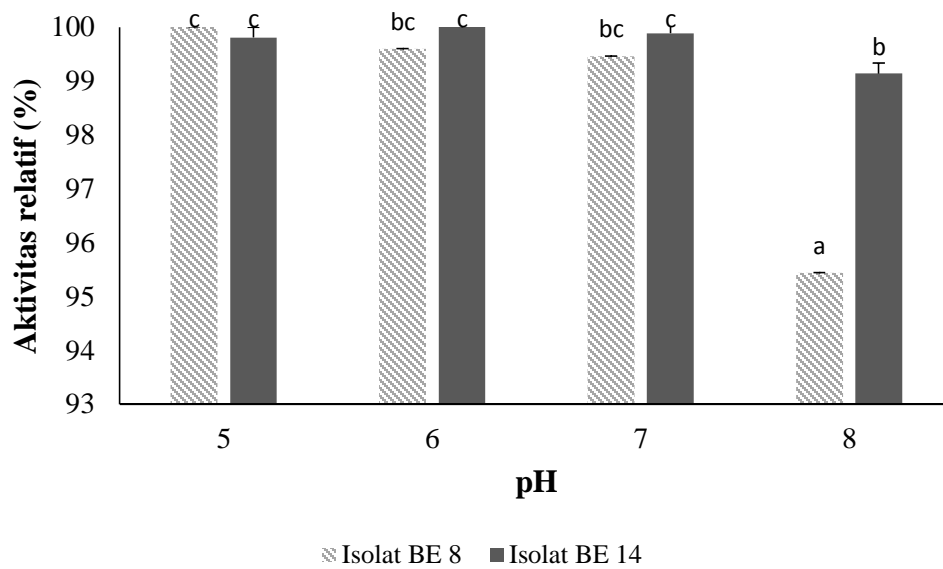
4.2.2 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim selulase hasil pemurnian parsial

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH, karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Perubahan pH akan menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim berubah dan menyebabkan denaturasi enzim serta mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim atau substrat tidak terikat pada sisi aktif enzim sehingga tidak mengalami katalisis (Campbell, 1999).

Kondisi pH optimum menunjukkan gugus pemberi dan penerima proton pada sisi aktif enzim terjadi pengikatan substrat. Pada kondisi ini enzim dan substrat berada pada tingkat ionisasi paling tinggi. Perubahan pH memengaruhi proses ionisasi gugus-gugus tersebut yang mengakibatkan terjadinya perubahan konformasi enzim yang merupakan penataan ruang atom-atom dalam sebuah molekul dan perubahan pada sifat katalitik enzim (Montgomery *et al.*, 1993). Enzim memiliki sisi aktif yang spesifik sehingga memiliki kekhasan dalam mengenali dan mengikat substrat. Enzim selulase mengandung gugus aktif karboksil (-COOH) pada asam amino glutamat dan aspartat (Whither & Aebersold, 1995). Kedua gugus aktif ini bekerja secara sinergi dalam memutus ikatan glikosida pada selulosa.



Gambar 14. Aktivitas enzim isolat BE 8 dan BE 14 pada variasi pH



Gambar 15. Stabilitas pH enzim isolat BE 8 dan BE 14

Keterangan : notasi yang sama menunjukkan aktivitas enzim tidak berbeda antar perlakuan ($p \geq 0,05$); error bar menunjukkan standar deviasi

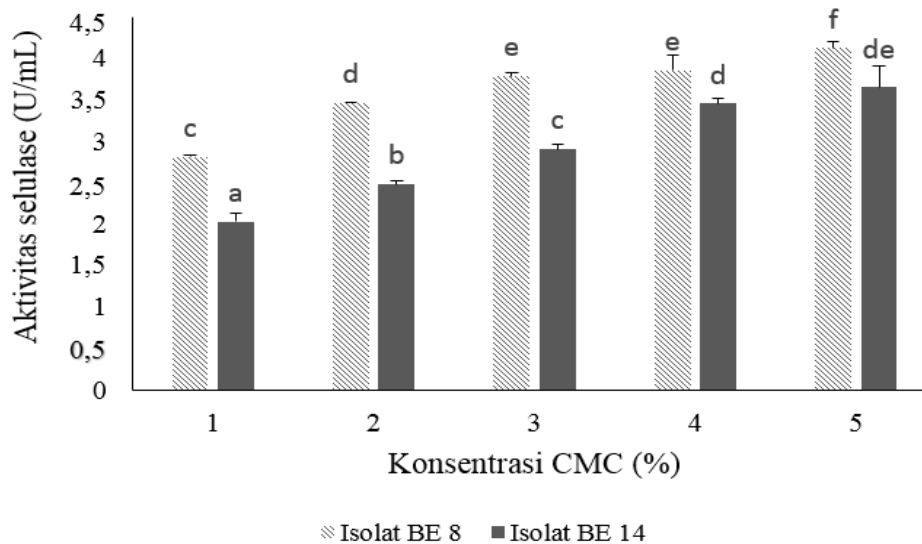
Aktivitas selulase isolat BE 8 tertinggi pada pH 5 dan isolat BE 14 pada pH 6, dengan aktivitas selulase tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) pada pH 5-7 (Gambar 14 & 15). Pada perlakuan berikutnya aktivitas selulase menggunakan buffer pH 6 baik untuk isolat BE 8 maupun BE 14. Penggunaan enzim selulase lebih menguntungkan pada kisaran pH netral, untuk mengurangi penggunaan asam yang tidak ramah terhadap lingkungan. Stabilitas pH isolat BE 8 pada pH 5 sampai 7 dan isolat BE 14 pada pH 5 sampai 8. Menurut Yin *et al.* (2010) dan Pokhrel *et al.* (2014) *Bacillus subtilis* mempunyai aktivitas selulase optimum pada pH 6. *Bacillus pumilus* mempunyai aktivitas selulase optimum pada pH 6 suhu 60 °C dengan aktivitas selulase 0,65 U/mL (Ariffin *et al.*, 2006). Enzim selulase *Bacillus pumilus* ini bekerja secara aktif/stabil pada kisaran pH 5-9, namun aktivitas selulase yang dihasilkan *Bacillus pumilus* lebih rendah dibandingkan isolat BE 8 maupun BE 14 hal ini dikarenakan jenis mikroorganisme dan sistem pemurnian yang berbeda. Enzim selulase *Bacillus pumilus* dimurnikan menurut AKTA FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), sedangkan enzim selulase isolat BE dimurnikan secara parsial menggunakan ammonium sulfat. Secara umum pemurnian menggunakan kolom kromatografi menghasilkan enzim yang lebih murni dengan



ditandai aktivitas enzim yang menurun dibandingkan dalam bentuk enzim kasar. Hal ini dikarenakan protein selain enzim selulase telah hilang, aktivitas yang terukur menunjukkan aktivitas enzim yang sesungguhnya.

4.2.3 Kinetika enzim selulase

Kecepatan reaksi meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi terus meningkat hingga mencapai titik batas ketika enzim semakin jenuh dengan substrat dan tidak berfungsi dengan cepat. Titik batas itu disebut kecepatan maksimum. Nilai V_{max} menunjukkan tingkat kejenuhan enzim oleh substrat, sedangkan K_M menunjukkan efisiensi katalis dari enzim yang didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat kecepatan katalitik enzim mencapai setengah kecepatan maksimumnya (Gultom, 2001). Nilai V_{max} dan K_M ditentukan dengan cara mengukur aktivitas selulase pada berbagai konsentrasi substrat 1 %; 2 %; 3 %; 4 % dan 5 % diinkubasi pada kondisi optimumnya (pH 6, suhu 60 °C, selama 30 menit).



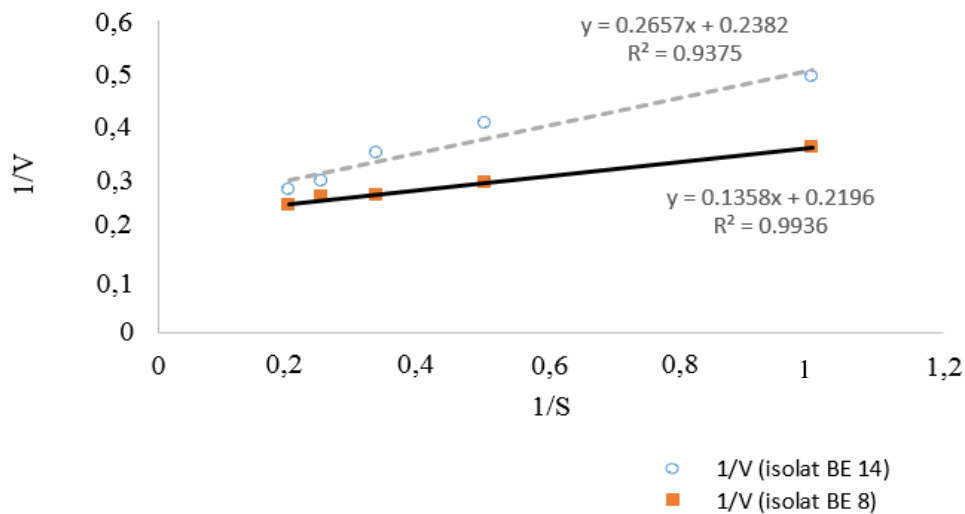
Gambar 16. Aktivitas enzim selulase isolat BE 8 dan BE 14 pada berbagai konsentrasi substrat CMC

Keterangan : notasi yang sama menunjukkan aktivitas enzim tidak berbeda antar perlakuan ($p \geq 0,05$); error bar menunjukkan standar deviasi.

Semakin tinggi konsentrasi substrat maka semakin tinggi pula energi dan frekuensi benturan antar molekul sehingga semakin banyak enzim selulase yang dapat mengikat



selulosa untuk membentuk kompleks enzim-glikosil yang selanjutnya akan membentuk produk berupa glukosa (Gultom, 2001). Pada penelitian ini, semakin besar konsentrasi substrat CMC maka semakin meningkat aktivitas enzim yang dihasilkan (Gambar 16). Meskipun demikian, peningkatan aktivitas enzim berhenti ketika enzim sudah jenuh dengan substrat karena jumlah molar substrat sudah melampaui jumlah molar enzim setelah titik batas maksimum (V_{max}) dari reaksi enzimatik.



Gambar 17. Hubungan $1/V$ dengan $1/S$ berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk isolat BE 8 dan BE 14

Keterangan : notasi yang sama menunjukkan aktivitas enzim tidak berbeda antar perlakuan ($p \geq 0,05$) ; error bar menunjukkan standar deviasi

Isolat BE 8 diperoleh persamaan linier $y = 0,1358x + 0,2196$, sehingga nilai V_{max} sebesar 4,5537 Unit/mL dan K_M sebesar 0,6184 % (6,184 mg/mL) (Gambar 17). Isolat BE 14 mempunyai persamaan linier $y = 0,2657x + 0,2382$, sehingga nilai V_{max} sebesar 4,1981 U/mL dan K_M sebesar 1,1156 % (11,156 mg/mL). Nilai V_{max} isolat BE 8 lebih besar dari V_{max} Isolat BE 14, hal ini menunjukkan bahwa enzim selulase isolat BE 14 lebih cepat jenuh oleh substrat dibandingkan isolat BE 8.

Nilai K_M isolat BE 14 lebih besar dibandingkan isolat BE 8. Nilai K_M berfungsi sebagai ukuran konstanta disosiasi (K_d) suatu enzim, yaitu kompleks enzim-substrat, nilai



Kd ini berbanding terbalik dengan afinitas enzim terhadap substratnya (Sadikin, 2002). Semakin kecil kecenderungan substrat dan enzim berdisosiasi maka semakin besar afinitas enzim terhadap substrat. Menurut Aruwajoye (2014) kinetika enzim selulase *Bacillus circulans* menunjukkan nilai K_M dan V_{max} masing-masing sebesar 1,061 mg/mL dan 13,75 U/mL. Nilai K_M *Bacillus subtilis* LFS3 sebesar 2,2 mg/mL (Rawat & Tewari, 2012). *Bacillus subtilis* yang menghasilkan enzim selulase alkali mempunyai K_M 0,13 mg/ml dan V_{max} 3,38 U/mg (Deka *et al.*, 2013). Nilai K_M isolat BE lebih besar dibandingkan K_M *Bacillus circulans* dan *Bacillus subtilis*, ini menandakan afinitas yang dimiliki isolat BE lebih rendah atau kekuatan ikatan antara substrat-enzim lebih besar. Nilai V_{max} isolat BE lebih besar dibandingkan V_{max} *Bacillus subtilis* LFS3, namun lebih kecil dari *Bacillus circulans*, ini menunjukkan enzim selulase *Bacillus circulans* lebih cepat jenuh oleh substrat selulosa dibandingkan isolat BE maupun *Bacillus subtilis* LFS3.

4.3 Spesies Bakteri Selulolitik *Indigenous* Bekatul

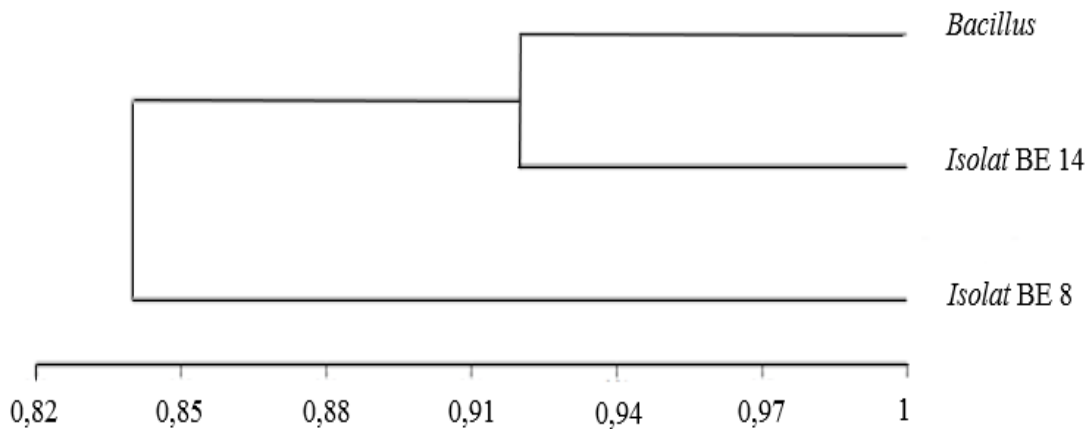
Isolat bakteri hasil isolasi dari bekatul yang diidentifikasi yang mempunyai aktivitas terbaik, yaitu isolat BE 8 dan BE 14. Bakteri diidentifikasi secara fenotip baik secara makroskopik maupun mikroskopik (morfologinya) dilanjutkan uji biokimiawi. Pada identifikasi ini dapat diketahui genus atau bahkan spesies suatu bakteri berdasarkan *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Namun ada kelemahan pada identifikasi secara fenotip yaitu kesulitan membedakan bakteri pada tingkat spesies. Untuk identifikasi spesies yang lebih spesifik dari setiap bakteri, perlu diadakan uji lanjutan secara molekular atau juga disebut sebagai identifikasi secara genotip.

4.3.1 Karakteristik fenotip bakteri selulolitik

Identifikasi isolat diawali dengan menentukan takson genus bagi tiap isolat (*Generic assignment*) dengan menentukan sifat-sifat fenotip seperti morfologi sel, biokimiawi, fisiologi. Karakterisasi fenotipik yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Tabel 7) melalui analisis *Profile matching* (Holt *et al.*, 1994).



Sel semua isolat berbentuk batang, mempunyai endospora, dan Gram positif. Kedua isolat bersifat katalase positif, sehingga dapat diprediksi bahwa isolat tersebut merupakan golongan Genus *Bacillus* (Gambar 18). Menurut Bergey's *manual of Systematic Bacteriology* bahwa ciri-ciri *Bacillus* sp. antara lain Gram positif, sel berbentuk batang atau bulat, membentuk endospora, membutuhkan oksigen, motil, katalase positif (Holt *et al.*, 1994). Isolat BE 8 dan isolat BE 14 mempunyai similaritas masing-masing 92 % dan 84 % dengan Genus *Bacillus*. Kemiripan isolat BE 14 dengan Genus *Bacillus* lebih tinggi dibandingkan isolat BE 8. Beberapa hal yang membedakan sifat fenotip antara isolat BE 8 dengan Genus *Bacillus* yaitu isolat BE 8 tidak mampu memfermentasi laktosa dan sukrosa, dapat memfermentasi maltosa, tidak dapat menghidrolisis pati, tidak dapat tumbuh di NaCl 7 %, penicilin, reduksi nitrat. Perbedaan isolat BE 14 dengan Genus *Bacillus* antara lain tidak dapat menghidrolisis pati, tidak mampu memfermentasi sukrosa, dapat memfermentasi maltosa, tidak dapat tumbuh di suhu 55 °C, dan Voges-Proskauer negatif. Berdasarkan hasil pengujian pada Tabel 7, selanjutnya dibandingkan dengan beberapa spesies anggota Genus *Bacillus* yang mempunyai kemiripan sifat dengan isolat tersebut.



Gambar 18. Dendrogram yang menunjukkan similaritas isolat BE dengan Genus *Bacillus*

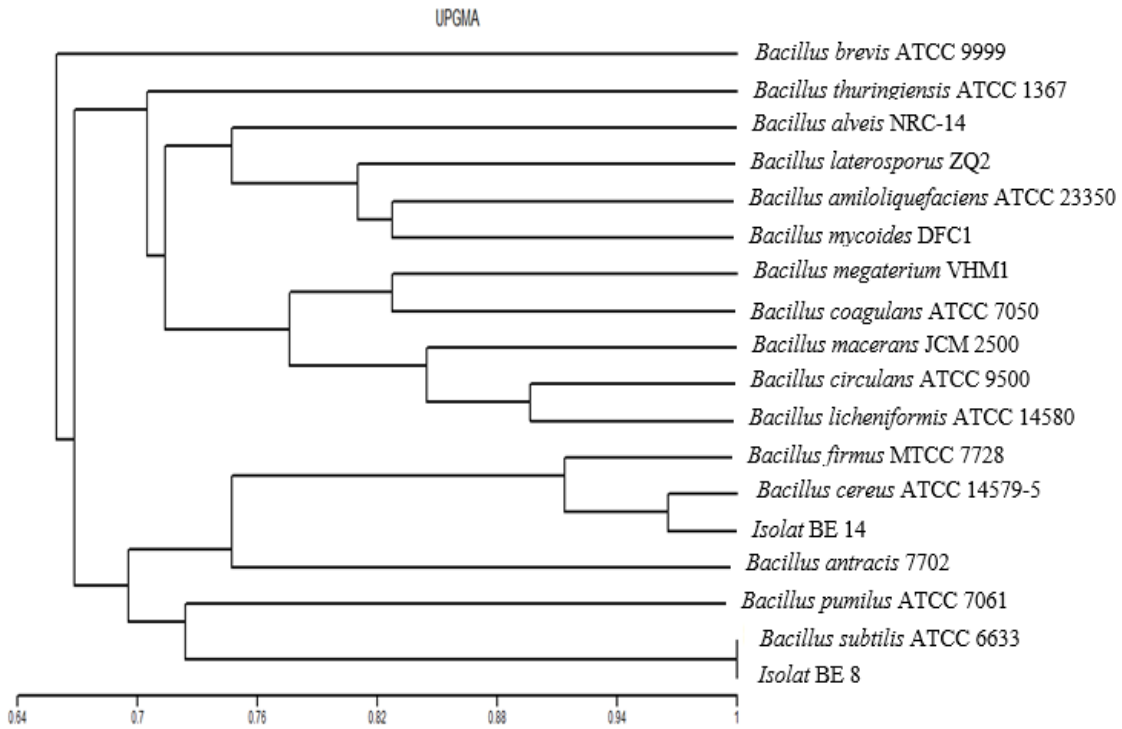
Tabel 7. Karakteristik fenotip bakteri selulolitik isolat BE 8, BE 14 dan *Bacillus acuan*

Karakter	Isolat BE 8	Isolat BE14	Genus <i>Bacillus</i>
Bentuk sel batang	+	+	+
Pewarnaan Gram (+)	+	+	+
Motilitas	+	+	+
Endospora	+	+	+
Katalase	+	+	+
Hidrolisis pati	-	+	+
Hidrolisis kasein	+	+	+
Oksidase	+	-	-
Fermentasi karbohidrat :			
Glukosa	+	+	+
Xylosa	-	-	-
Mannitol	-	-	-
Laktosa	+	+	+
Sukrosa	-	+	+
Arabinosa	-	-	-
Suhu pertumbuhan (°C)			
25	+	+	+
37	+	+	+
40	+	+	+
55	+	-	+
NaCl 7%	-	+	+
Nutrient broth	+	+	+
SDA	+	+	+
TSI	+	+	+
Citrat	-	-	-
Indol	-	-	-
Voges Proskauer	+	-	+
Penicillin	-	+	+
Beta-hemolisa	+	+	+
Reduksi nitrat	-	+	+

Keterangan : + = bereaksi

- = tidak bereaksi

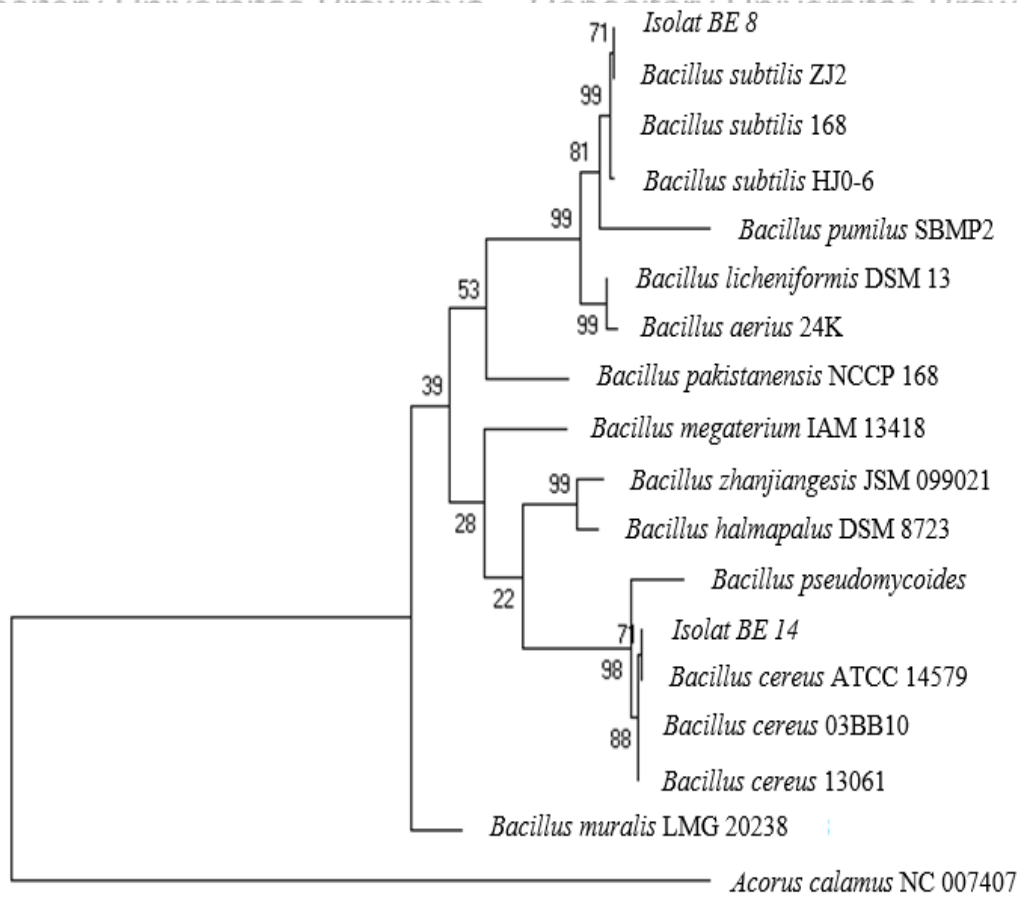
Isolat BE 8 mempunyai kemiripan paling tinggi dengan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dengan similaritas 100 % artinya secara fenotip sifat antara isolat BE 8 dengan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 adalah sama (Gambar 19). Isolat BE 14 mirip dengan *Bacillus cereus* ATCC 14579-5 dengan similaritas 96,6 %. Perbedaan isolat BE 14 dengan *Bacillus cereus* ATCC 14579-5 hanya pada satu sifat yaitu isolat BE 14 tidak mampu menghidrolisis pati atau isolat BE 14 tidak memiliki kemampuan amilolitik (Lampiran 10).



Gambar 19. Dendrogram yang menunjukkan similaritas fenotip antar strain isolat BE 8, BE 14 dengan Genus *Bacillus* acuan

4.3.2. Spesies bakteri selulolitik berdasarkan sekuen 16S rDNA

Identifikasi bakteri berdasarkan sekuen 16S rDNA merupakan identifikasi secara molekular untuk melengkapi hasil identifikasi secara fenotip. Sekuen 16S rDNA lebih stabil dan bersifat ubikuitas pada bakteri sehingga tepat untuk analisis identifikasi (Singh *et al.*, 2012). Karakter fenotip bakteri bersifat tidak tetap, morfologi dan fisiologi beberapa bakteri memiliki kesamaan sehingga sulit untuk konfirmasi spesies (Ochman *et al.*, 2005).



0.02

Gambar 20. Pohon filogeni yang menunjukkan kekerabatan antar isolat-isolat bakteri selulolitik dengan bakteri acuan berdasarkan sekuen 16S rDNA dengan algoritma Likelihood

Hasil identifikasi secara molekular menunjukkan bahwa isolat BE 8 mempunyai similaritas 99,9 % dengan *Bacillus subtilis* 168, mempunyai kemiripan 99,8 % terhadap *Bacillus subtilis* HJ0-6 dan kesamaan 100 % terhadap *Bacillus subtilis* ZJ2. Isolat BE 14 mempunyai kesamaan sebesar 99,9 % dengan *Bacillus cereus* 03BB102 dan *Bacillus cereus* 13061, kesamaan 100 % dengan *Bacillus cereus* ATCC 14759. Hasil identifikasi isolat-isolat *Indigenous* bekatul berdasarkan sekuen 16S rDNA memberikan prediksi yang sama dengan hasil fenotipik, yaitu isolat BE 8 merupakan *Bacillus subtilis* dan isolat BE 14 /merupakan *Bacillus cereus* (Gambar 20).



Hasil ini juga sama dengan beberapa penelitian bakteri hasil isolasi dari bekatul yaitu termasuk dalam Genus *Bacillus* (Bajaj *et al.*, 2009; Nirmala & Shindu, 2011). Genus *Bacillus* sebagian besar memiliki kemampuan memproduksi enzim selulase, yaitu *Bacillus subtilis* dengan aktivitas 0,9 U/mL (Kim *et al.*, 2012), *Bacillus licheniformis*, aktivitas selulase 9 U/mL (Sivakumar *et al.*, 2016), *Bacillus circulans* dari *Larvae Cossus Cossus* dengan aktivitas selulase 0,044 U/mL (Baharudin *et al.*, 2016), *Bacillus cereus* mempunyai aktivitas selulase 4,38 U/mL (Yan *et al.*, 2011), *Bacillus brevis* mempunyai aktivitas selulase 179,66 U/ml (Fatema & Manchur, 2015). Menurut Rastogi *et al.* (2010) Genus *Bacillus* saat ini paling banyak digunakan untuk aplikasi industri karena kemudahan produksi dan menghasilkan enzim ekstraselular yang lebih stabil.

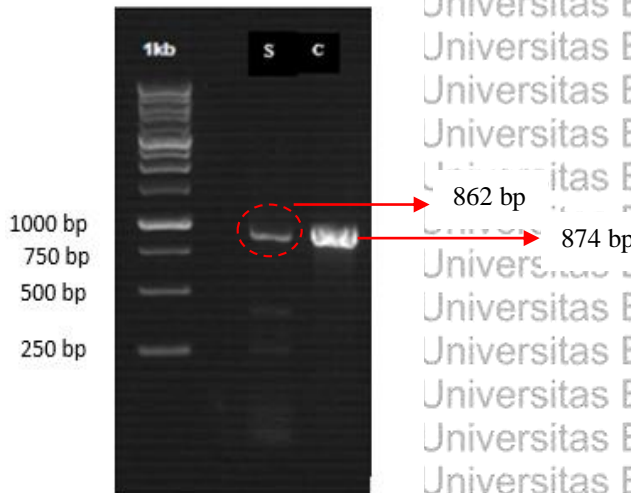
4.4 Karakteristik Gen Pengkode Enzim Selulase

Struktur organisasi enzim selulase pada umumnya terdiri dari dua domain utama, yaitu domain katalitik dan *Carbohydrate binding moduls* (CBM). Kedua domain ini biasanya dihubungkan oleh suatu penghubung yang pendek dan fleksibel (linker). Domain katalitik merupakan bagian terbesar dari enzim dan merupakan tempat hidrolisis selulosa. Enzim selulase sedikitnya mempunyai satu domain katalitik dan ukurannya bervariasi tiap organisme, dari yang berukuran pendek seperti CelS *Erwinia corotovor*a (232 AA) sampai yang berukuran panjang seperti CelBb *Caldochellum saccharolyticum* (1011 AA) (Gilkes *et al.*, 1991). *Carbohydrate binding modul* (CBM) sebelumnya dikenal dengan *Cellulose binding domain*. Saat ini CBM diklasifikasikan menjadi 45 famili berdasarkan database CAZy (Hashimoto, 2006). Domain CBM merupakan daerah yang miskin asam amino bermuatan, mempunyai kandungan asam hidroksiamino yang tinggi dan mengandung residu-residu Trp, Tyr dan Gly yang terkonservasi (Gilkes *et al.*, 1991). Fungsi utama domain CBM adalah meningkatkan efisiensi katalitik enzim terhadap substrat dengan membawa modul katalitik pada substrat (Hashimoto, 2006).

Enzim selulase berperan dalam hidrolisis selulosa dengan memecah ikatan β -1,4-glikosidik untuk menghasilkan oligosakarida maupun glukosa. Enzim selulase dapat diklasifikasikan berdasarkan spesifisitas terhadap substrat, mekanisme reaksi atau kemiripan strukturnya. Berdasarkan struktur proteinnya, enzim selulase termasuk ke dalam famili

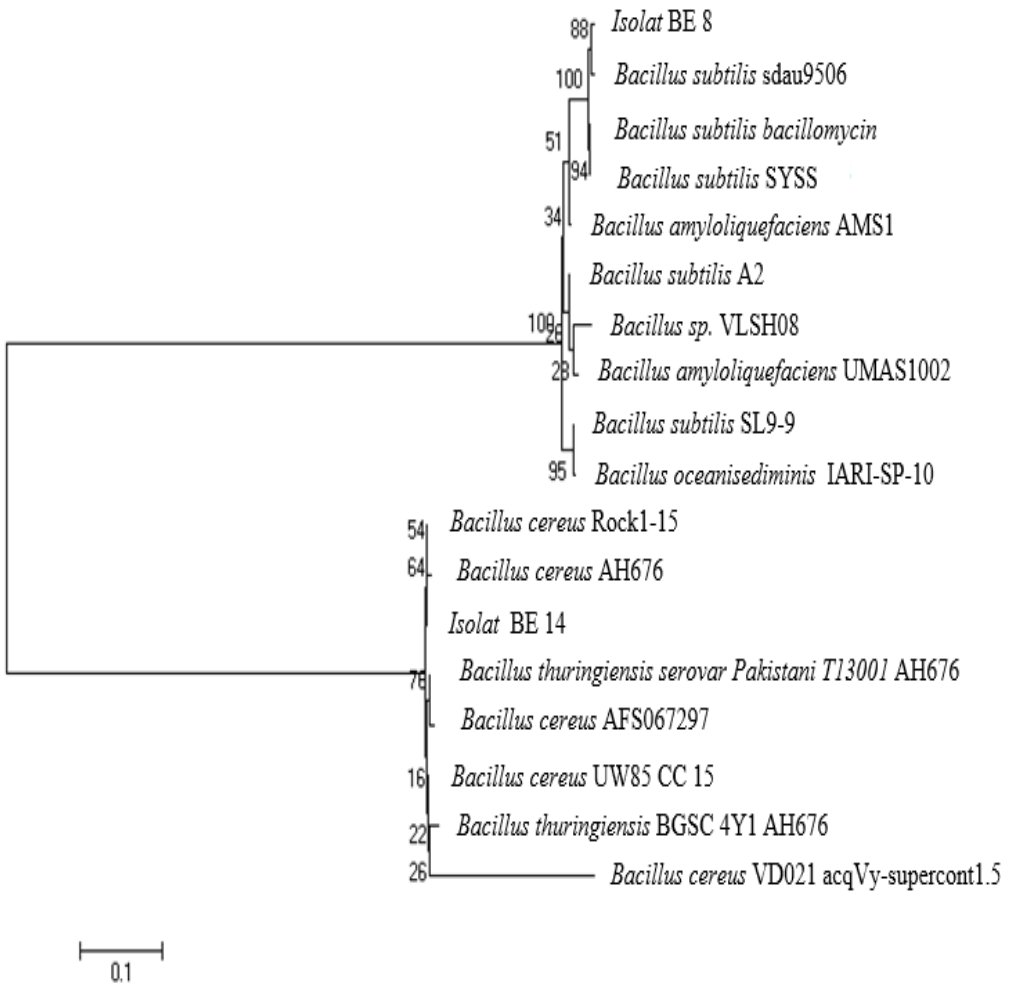


glikosida hidrolase (GH). Famili glikosida hidrolase merupakan kelompok enzim yang mempunyai aktivitas memotong ikatan glikosidik antara dua atau lebih karbohidrat. Famili glikosida hidrolase diklasifikasikan berdasarkan similaritas urutan dan struktur asam aminonya (Henrissat & Bairoch 1996). Saat ini terdapat 113 famili GH yang dilaporkan secara *Online* di *Website* (<http://www.cazy.org>) (Cantarel *et al.*, 2009). Untuk selulase, saat ini tersebar sedikitnya ke dalam 11 famili GH, yaitu famili 5-9, 12, 26, 44, 45, 48 dan 61.



Gambar 21. Pita gen pengkode endoglukanase isolat bakteri selulolitik *indigenous* bekatul
Keterangan : S = isolat BE 8, C= isolat BE 14

Gen pengkode enzim selulase antara lain mengkode enzim endoglukanase, eksoglukanase dan beta glukosidase. Analisis gen meliputi domain fungsional, sisi aktif, motif protein, analisis homologi, konstruksi pohon filogenetik dan sebagainya melalui penggunaan perangkat bioinformatika (*in Silico*). Pita gen pengkode isolat BE 8 dengan ukuran 862 bp dan isolat BE 14 dengan ukuran gen 874 bp (Gambar 21).



Gambar 22. Pohon filogeni berdasarkan sekuen gen endoglukanase isolat BE 8 dan BE 14 dengan isolat acuan menggunakan algoritma Tamura-Nei Bootstrap 1000

Berdasarkan hasil pohon filogeni (Gambar 22) bahwa isolat BE 8 mempunyai sekuen gen pengkode endoglukanase dengan similaritas tertinggi 99,26 % dengan *Bacillus subtilis* sdau9506, *Bacillus subtilis* bacillomycin, dan *Bacillus subtilis* SYSS. Sekuen gen pengkode endoglukanase isolat BE 14 mempunyai similaritas tertinggi 99,71 % dengan *Bacillus cereus* Rock1-15 (Tabel 8). Hal ini membuktikan bahwa isolat bakteri hasil isolasi dari bekatul berdasarkan sekuen gen endoglukanase sesuai hasil identifikasi 16S rDNA, isolat BE 8 merupakan *Bacillus subtilis* dan isolat BE 14 merupakan *Bacillus cereus*.



Tabel 8. Nilai similaritas gen pengkode endoglukanase isolat BE dibandingkan dengan gen endoglukanase dari isolat acuan

Isolat BE 8		Isolat BE 14	
Gen pengkode endoglukanase dari isolat acuan	Similaritas (%)	Gen pengkode endoglukanase dari isolat acuan	Similaritas (%)
<i>Bacillus subtilis</i> sdau9506	99,26	<i>Bacillus cereus</i> RockI-15	99,71
<i>Bacillus subtilis</i> SYYS	99,26	<i>Bacillus cereus</i> UW85	99,41
<i>Bacillus subtilis bacillomycin</i>	99,26	CC 15	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AMS1	96,70	<i>Bacillus cereus</i> AH676	99,26
<i>Bacillus subtilis</i> SL9-9	94,99	<i>Bacillus cereus</i> AFS067297	98,67
<i>Bacillus subtilis</i> A2	96,39	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar pakistani TI3001	99,12
<i>Bacillus oceanisediminis</i> IARI-SP-10	94,68	<i>Bacillus thuringiensis</i> BGSC 4Y1	98,07
<i>Bacillus sp.</i> VLSH08	95,47	<i>Bacillus cereus</i> VD021 acqVy-supercont1.5	79,63

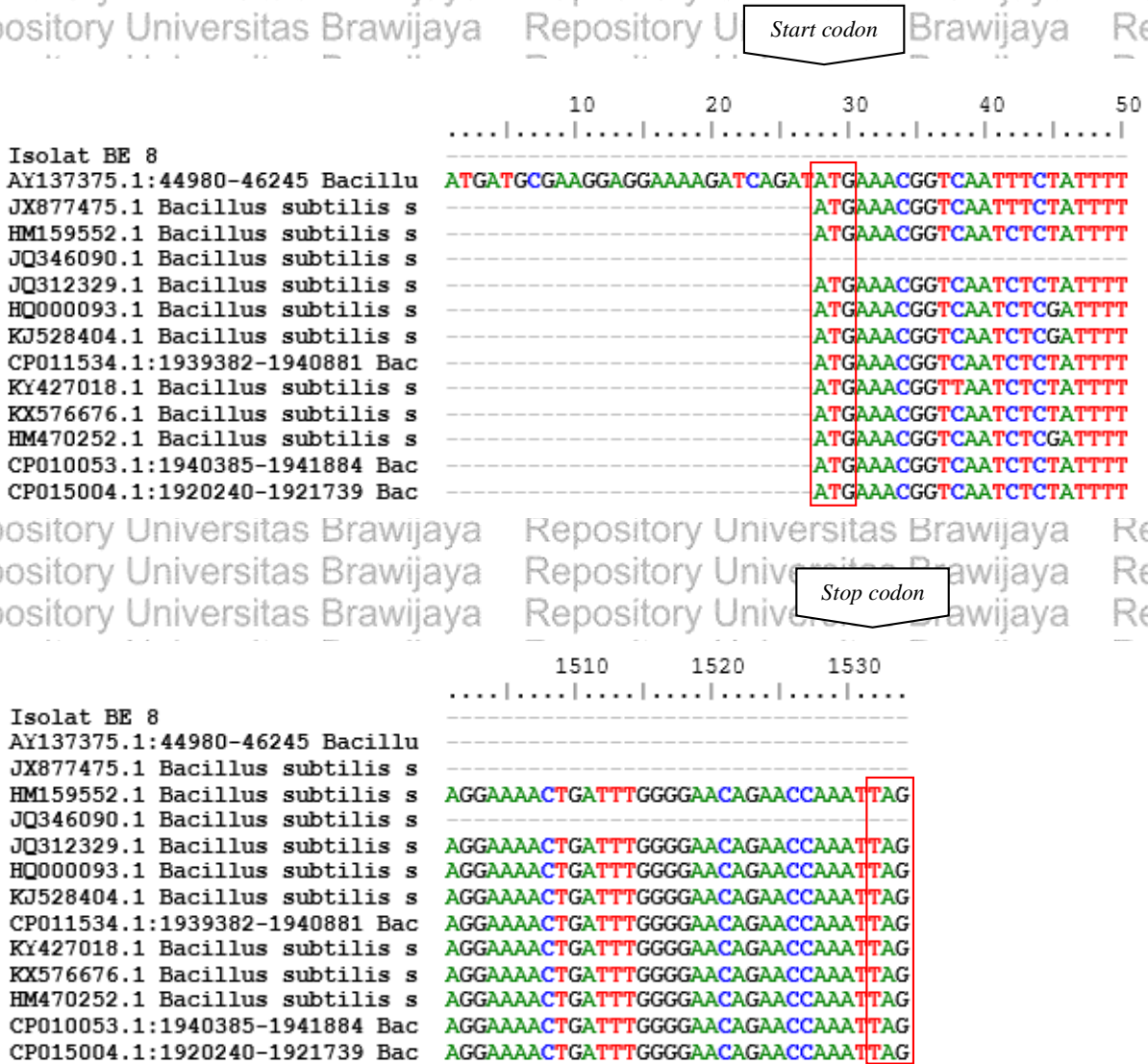
4.4.1 Gen pengkode endoglukanase isolat BE 8

Letak suatu gen khususnya gen endoglukanase dalam sekuen genom dapat diketahui menggunakan metode ORF (*Open reading frame*). *Open reading frame* merupakan bagian struktural berupa daerah yang berisi urutan nukleotida yang diterjemahkan menjadi protein untuk mengetahui letak penanda dimulai dan dihentikannya proses translasi. Daerah ini mengandung *start codon*, ATG, dan *stop codon*, TGA/TAG/TAA (Ozaki *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1995).

Start codon *Bacillus subtilis* muncul pada urutan basa 28-30 dan *stop codon* pada urutan basa 1532-1534 (Gambar 23). Pada isolat BE 8 tidak terlihat *start* dan *stop codon* tersebut. Hal ini dikarenakan gen endoglukanase isolat BE 8 terlalu pendek yaitu hanya 862 bp dan dari hasil pensejajaran terletak pada urutan 302 – 1170. Letak *start* dan *stop codon* isolat BE 8 dapat diasumsikan sama dengan *Bacillus subtilis* sdau9506 (HM159552.1) yang mempunyai similaritas/kesamaan tertinggi 99,26 %. Ada beberapa perbedaan antara sekuen isolat BE 8 dengan *Bacillus subtilis* sdau9506 antara lain pada basa 374 isolat BE 8 ada basa



G sedangkan pada *Bacillus subtilis* sdau9506 tidak ada, urutan basa ke 532 pada *Bacillus subtilis* sdau9506 ada basa T sedangkan isolat BE 8 muncul basa C, pada urutan basa 1135 isolat BE 8 muncul basa T sedangkan *Bacillus subtilis* sdau9506 ada basa C dan urutan basa ke 1153 isolat BE 8 mengalami defesi (kehilangan satu basa) dan pada *Bacillus subtilis* sdau9506 ada basa T (Lampiran 12).

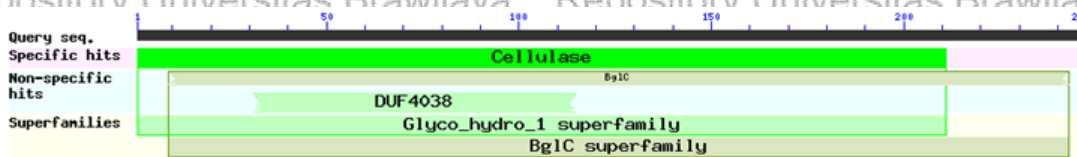


Gambar 23. Start dan stop codon hasil pensejajaran nukleotida gen pengkode endoglukanase isolat BE 8 terhadap gen endoglukanase dari berbagai strain *Bacillus subtilis*



Adanya penggantian salah satu basa nitrogen biasanya tidak berdampak pada sifat fungsional dari protein, karena asam amino dapat dikode oleh beberapa beberapa kodon. Pada kondisi delesi dan insersi ini biasanya membawa pengaruh lebih besar dibandingkan apabila terjadi penggantian basa nitrogen. Peristiwa delesi dan insersi, gen mengalami mutasi karena terjadi perubahan susunan basa nitrogen yang mengakibatkan perubahan sifat protein bahkan terkadang menghasilkan protein yang rusak atau tidak berguna. Namun pada pensejajaran sekuen DNA antara isolat BE 8 dan *Bacillus subtilis* sdau9506 meskipun terjadi delesi namun tidak menggeser urutan basa nitrogen sehingga fungsi protein khususnya endoglukanase masih tetap ada.

Analisis domain fungsional isolat BE 8. Domain fungsional merupakan sekuen lestari yang mencirikan suatu kelompok gen-gen tertentu yang memiliki karakteristik khas secara struktural. Sebagian besar selulase diorganisasikan dalam dua domain independen yaitu sebuah modul inti katalitik dan modul pengikat selulosa (CBM). Kedua domain ini biasanya saling berhubungan melalui *Linker* fleksibel pendek (Sandgren, 2003). Domain fungsional merupakan bagian terbesar dari enzim.



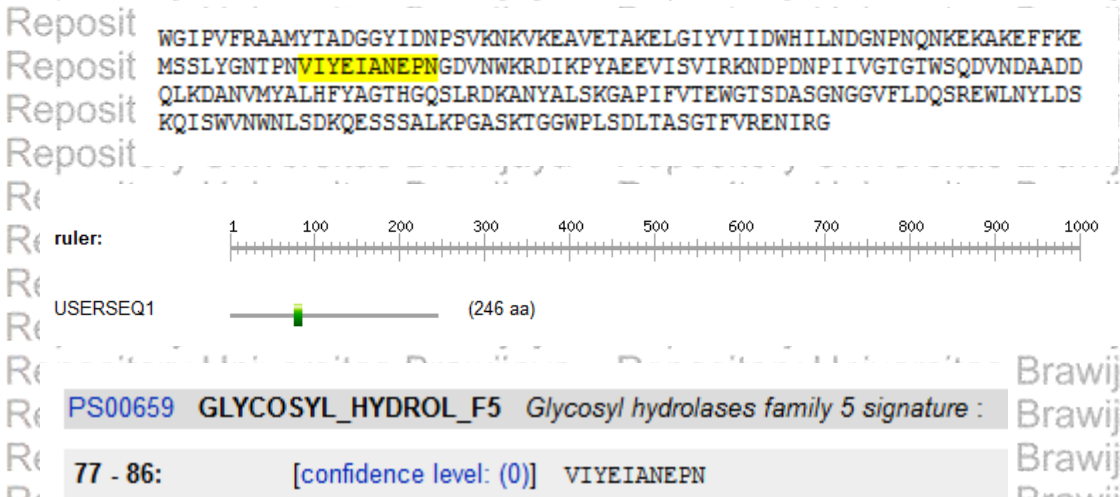
Gambar 24. Domain fungsional gen pengkode endoglukanase Isolat BE 8

Pada sekuen gen endoglukanase isolat BE 8 (*Bacillus subtilis*) ditemukan domain katalitik selulase pada urutan protein 1-211. Superfamilinya menunjukkan karakter khas selulase dalam kelompok glikosil hidrolase 5 (GH5). Gen *BglC* dalam superfamili GH 1 ditemukan pada daerah/residu 9–243 (Gambar 24). Menurut Zeng *et al.* (2006) secara umum rata-rata domain mempunyai panjang 100 residu atau berkisar 40-700 residu. Karakter khas gen pengkode endoglukanase dari bakteri adalah mempunyai multi domain *BglC* (Xia *et al.*, 2016). Endoglukanase dari *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str.168 merupakan gen *eglS* yang termasuk dalam superfamili enzim Glikohidrolase 5 (GH5) pada residu 50 – 296 dan gen *BglC* pada daerah/ residu 9 – 445 dan mempunyai daerah CBM 3



yang merupakan daerah pengikatan enzim substrat pada residu 356 – 436 (www.uniprot.org). Pada operon bakteri selulolitik *Actinomycete Thermobifida fusca* terdapat gen *BglABC*. Gen *BglC* mengandung 1455 bp (nukleotida 2549-4003), *start* kodon dikode basa GTG, sekuen protein termasuk kelompok GH1 dengan sisi aktif LYITENGAA (asam aminon 384-392). Enzim ini bekerja optimum pada pH 7, suhu 50 °C, stabil pada suhu 60 °C, dihambat oleh ion Ca²⁺, Mg²⁺ dan EDTA (Spiridonov & Wilson, 2001).

Sisi aktif endoglukanase isolat BE 8. Sisi aktif enzim merupakan daerah yang berkaitan dengan enzim yang berkaitan dengan aktivitas enzim secara fungsional. Menurut Kawaminami *et al.* (1999) menyatakan bahwa aktivitas enzim ditandai dengan adanya residu E (glutamat) dan D (aspartat). Nauli (2014) juga menyatakan bahwa hidrolisis selulosa secara enzimatis terhadap ikatan glikosidik terjadi melalui katalisis asam/basa, yang membutuhkan donor proton (HA) dan nukleofil/basa (B). Aktivitas katalitik ini diperkirakan disiapkan oleh residu asam amino yang bermuatan negatif yaitu aspartat atau residu glutamat.

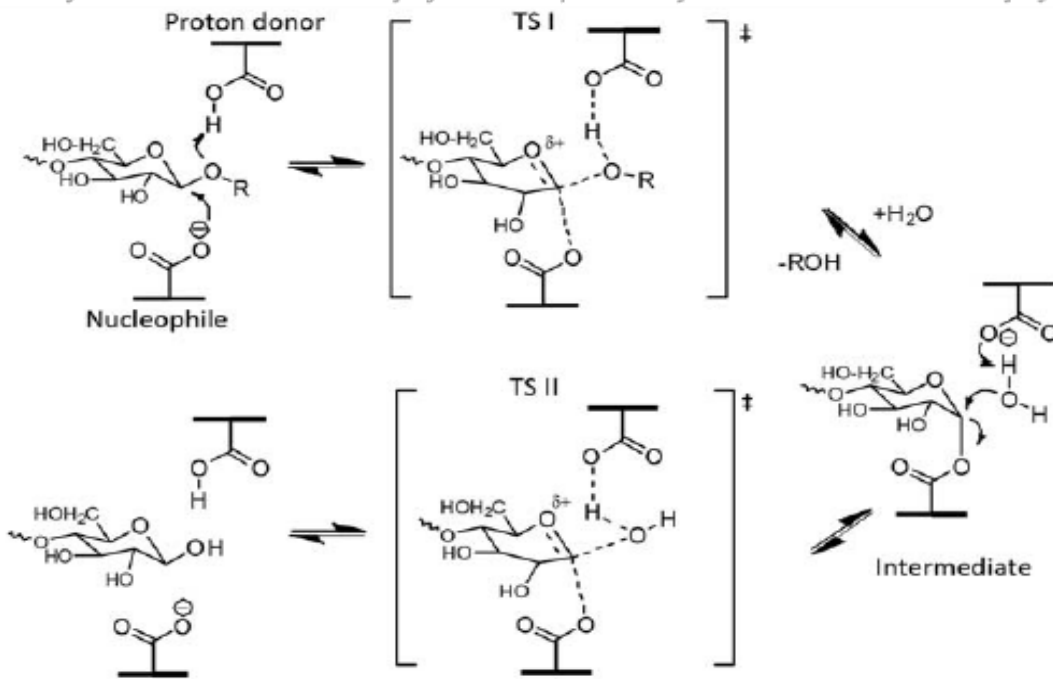


Gambar 25. Daerah sisi aktif gen endoglukanase *Bacillus subtilis* (sumber : <http://prosite.expasy.org>)

Sisi aktif gen pengkode endoglukanase isolat BE 8 (*Bacillus subtilis*) ditunjukkan pada urutan asam amino 77-86 yaitu **VIYEIANEPN** (Gambar 25). Keberadaan sisi aktif tersebut menunjukkan karakter sisi aktif enzim kelompok Glycosyl Hidrolase 5. Ada 2 residu asam glutamat (Glu/ E) sebagai penanda sisi aktif endoglukanase isolat BE 8 yaitu Glu80 dan Glu84.



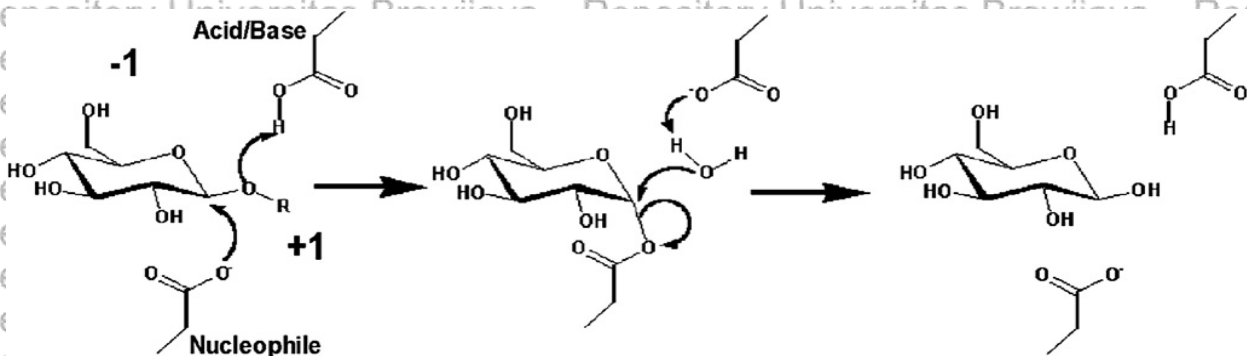
Mekanisme reaksi enzimatik kelompok Glikosil Hidrolase (GHs) melibatkan reaksi *Double displacement* merupakan reaksi/mekanisme pertukaran ganda antara dua residu yang bermuatan negatif (donor proton dan nukleofil) (Gambar 26). Pada reaksi hidrolisis selulosa diawali dengan adanya serangan nukleofil tunggal pada saat keadaan transisi. Asam amino yang berperan sebagai nukleofil antara lain residu aspartat (Asp) atau glutamat (Glu), dan donor proton oleh Asp atau Glu yang terprotonasi (Badieyan *et al.*, 2012). Aktivitas katalitik endoglukanase GH5 dari *Aspergillus niger* terletak pada residu Asp99, Glu116 dan Glu204 (Nauli, 2014). Endoglukanase GH5 dari *Clostridium cellulolyticum* menunjukkan adanya donor proton pada Glu70 dan nukleofil Glu307 (Ducros *et al.*, 1995).



Sumber: Badieyan *et al.* (2012)

Gambar 26. Mekanisme reaksi hidrolisis selulosa oleh enzim Glikosil Hidrolase (GHs) melalui reaksi *Double displacement* yang melibatkan reaksi antara donor proton dan nukleofil terhadap substrat

Berdasarkan analisis domain menunjukkan bahwa endoglukanase isolat BE 8 juga mempunyai gen *bgIC* yang termasuk dalam kelompok enzim GH1. Kelompok GH1 mempunyai aktivitas β -glikosidase yang menghidrolisis ikatan β -glikosida untuk melepaskan residu glikosil pada ujung non reduksi menghasilkan glukosa (Yang *et al.*, 2015).



Sumber : Isorna *et al.* (2007)

Gambar 27. Mekanisme katalitik dari kelompok enzim GH1 dalam menghidrolisis ikatan β -glikosidik

Mekanisme katalitik dari kelompok enzim GH-1 dalam menghidrolisis ikatan β -glikosidik dengan cara mempertahankan konformasi karbon anomerik, dua residu glutamat bertindak sebagai donor nukleofil dan proton (Gambar 27) (Isorna *et al.*, 2007). Pada endoglukanase isolat BE 8 terdapat residu Glu80 dan Glu84 menunjukkan adanya donor nukleofil dan proton.

Model protein endoglukanase isolat BE 8. Penggambaran model protein endoglukanase bertujuan mengetahui struktur protein tiga dimensi dari enzim tersebut. Protein enzim biasanya tersusun atas struktur sekunder yang terdiri dari struktur α -heliks, β -sheet dan loop.

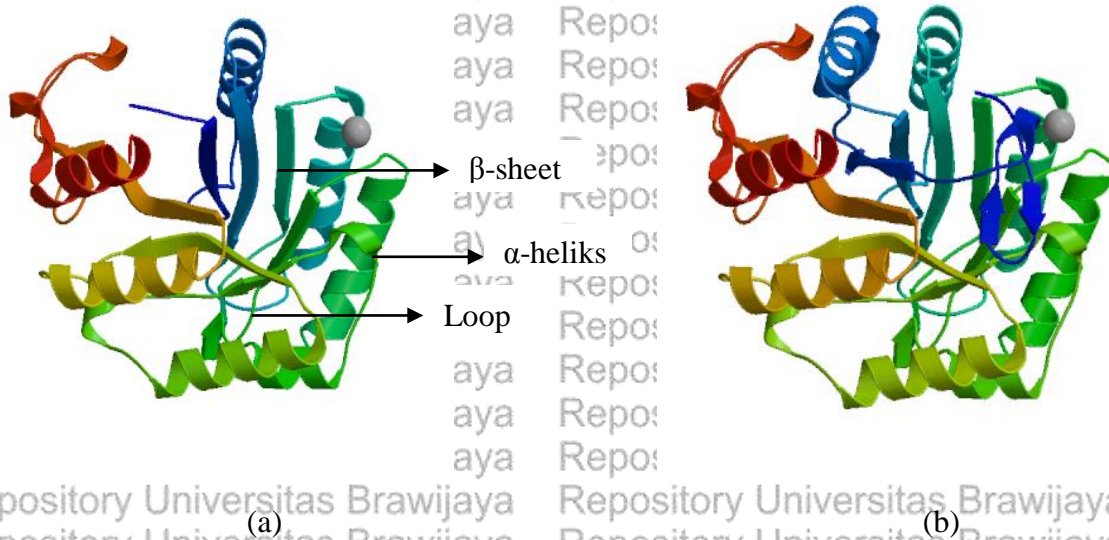
Struktur α -heliks merupakan bentuk yang mendominasi dalam struktur protein yang distabilkan oleh ikatan hidrogen. Struktur α -heliks ditunjukkan dengan struktur *coiled*. β -sheet digambarkan dengan anak panah. Ada dua jenis β -sheet yaitu paralel dan anti paralel (β -strand) yang digambarkan dengan anak panah berlawanan (Fodje & Al-Karadaghi, 2002).

Loop merupakan adalah struktur sekunder yang tidak teratur dalam protein, yang terdiri dari belokan, gulungan acak, dan untaian yang menghubungkan struktur sekunder utama (α -heliks dan β -sheet). Loop ini berada di permukaan protein dan berperan dalam interaksi antara protein dan molekul lain dalam hal ini substrat (Campbell *et al.*, 2008).

Struktur protein isolat BE 8 mempunyai kesamaan dengan struktur protein *Bacillus subtilis* sdau9506 yang secara filogeni mempunyai kemiripan 99,26%. Kedua struktur



memiliki α -heliks, β -sheet dan loop, namun berbeda jumlahnya. Pada struktur protein isolat BE 8 mempunyai α -heliks 7, β -sheet 5 dan loop 12, sedangkan *Bacillus subtilis* sdau9506 terdiri dari α -heliks 9, β -sheet 9 dan loop 20 (Gambar 28). Perbedaan ini sangat erat hubungannya dengan panjang pendeknya sekuen dna yang diperoleh pada saat isolasi gen endoglukanase. Gen endoglukanase isolat BE 8 mempunyai panjang sekuen 862 bp atau 246 aa, sedangkan *Bacillus subtilis* sdau9506 memiliki ukuran sekuen 1500 bp atau 500 aa. Semakin panjang ukuran proteinnnya maka semakin banyak penyusun struktur proteinnnya dalam hal ini komposisi α -heliks, β -sheet dan loop.



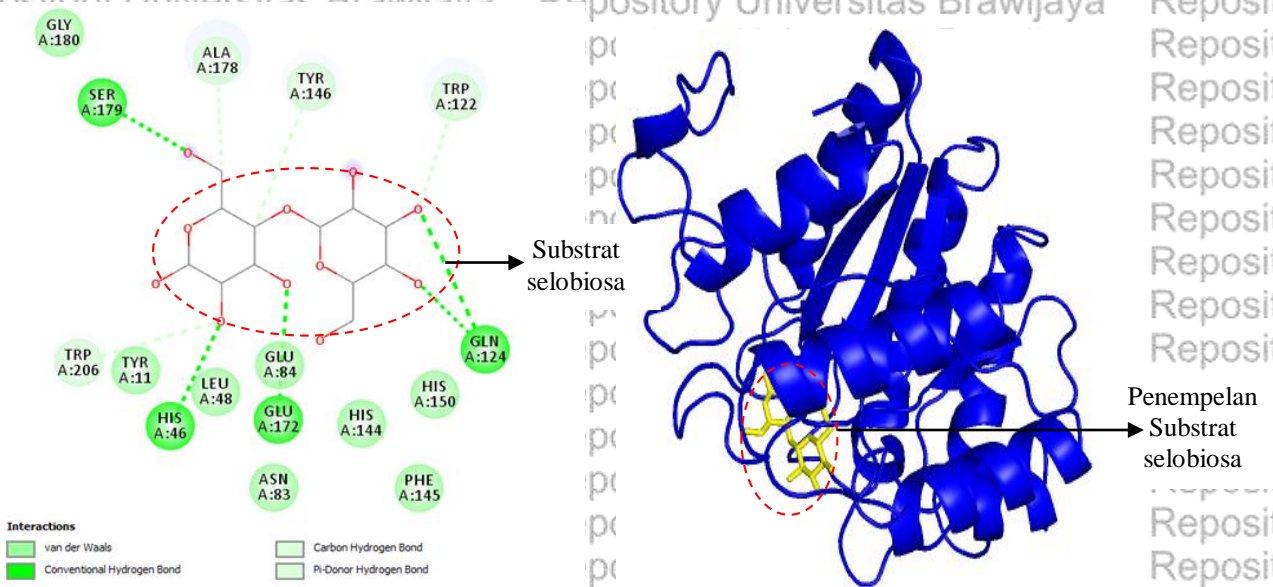
Gambar 28. Struktur protein isolat BE 8 (*Bacillus subtilis*), (b) *Bacillus subtilis* sdau9506 (www.swissmodel.expasy.org).

Interaksi endoglukanase dengan substrat menggunakan metode Docking. Interaksi protein endoglukanase dengan substrat selulosa dapat diilustrasikan dengan menggunakan metode *Docking*. Metode *Docking* dapat memprediksi interaksi antar molekul terutama protein enzim terhadap substrat, sehingga diperoleh posisi sisi aktif dari suatu protein (Schneider & Baringhaus, 2008). Protein enzim endoglukanase berinteraksi dengan substrat selulosa pada sisi aktif enzim. Posisi interaksi substrat dengan sisi aktif enzim didasarkan hasil posisi aktif dari analisis *prosite*. Pada proses *Docking* ini digunakan substrat selobiosa sebagai model ligan/substrat untuk mempermudah dalam proses *Docking* dibandingkan



menggunakan substrat selulosa yang mempunyai rantai panjang. Selobiosa ini merupakan senyawa antara yang selalu terbentuk/ada pada hidrolisis selulosa (Nauli, 2014).

Beberapa asam amino endoglukanase isolat BE 8 yang berinteraksi dengan substrat selobiosa dengan membentuk ikatan hidrogen (garis putus2 warna hijau) antara lain His46, Asp44, Trp206, Gln124. Ikatan hidrofobik pada interaksi endoglukanase dengan selobiosa yaitu pada Ser179, Ala178, Glu84, Trp122, His144, Tyr146, His150, Glu172. Interaksi endoglukanase dengan selobiosa mempunyai *Binding affinity* sebesar -30,16 kkal/mol (Gambar 29).



Gambar 29. Interaksi protein endoglukanase protein isolat BE 8 dengan substrat selobiosa

Endoglukanase *Bacillus subtilis* 168 ketika berinteraksi dengan substrat selulosa terjadi pada sisi aktif asam amino glisin pada urutan 46, 250 dan 218, valin pada asam amino 224, aspartat pada asam amino 221 dan leusin pada asam amino 219. Interaksi ini mempunyai *Binding affinity* sebesar 5,9 kkal/mol. Semakin kecil nilai *Binding affinity* dari suatu interaksi antara substrat dengan enzim maka semakin kuat ikatan antara keduanya. Mertz *et al.* (2007)

melaporkan *Autodocking* endoglukanase *Thermobifida fusca* terhadap substrat selulosa mempunyai *Binding affinity* 7 kkal/mol. Penelitian sisi aktif dengan metode *Docking* juga dilaporkan Nauli (2014) bahwa sisi aktif selulase *Aspergillus niger* terikat melalui interaksi



hidrofilik dengan residu asam amino asparagin (Asn20), serin (Ser111) dan glutamin (Gln158), sedangkan interaksi hidrofobik terjadi pada asam amino aspartat (Asp99) dan glutamat (Glu116 dan Glu204). Sisi aktif selulase ini merupakan gabungan dari domain katalitik dan domain pengikat substrat. Endoglukanase *Clostridium cellulolyticum* yang merupakan kelompok GH5 memiliki sisi aktif Glu170 sebagai donor proton dan Glu307 sebagai nukleofil (Ducros *et al.*, 1995).

Nilai *Binding affinity* endoglukanase isolat BE 8 terhadap selobiosa lebih rendah 36,06 kkal/mol dibandingkan *Bacillus subtilis* 168 dan 37,16 kkal/mol terhadap *Thermobifida fusca*. Hal tersebut menunjukkan bahwa kekuatan ikatan endoglukanase isolat BE 8 terhadap substrat selulosa khususnya selobiosa lebih besar dibandingkan endoglukanase *Bacillus subtilis* 168 dan *Thermobifida fusca*. Semakin besar kekuatan ikatan antara enzim dengan substrat maka semakin banyak produk hasil hidrolisis tersebut yang ditandai dengan meningkatnya aktivitas enzim.

Motif protein isolat BE 8. Motif adalah suatu pola sekuen lestari yang berukuran pendek yang menunjukkan perbedaan yang berkaitan dengan fungsi protein tertentu. Motif protein dari *Bacillus subtilis* mempunyai daerah CBM (*Cellulose binding module*) yang merupakan daerah pengikatan enzim dengan substrat pada residu 228-246 yaitu PLSDLTASGTFVRENIRG dan Glikosil Hidrolase 5 pada residu 77-86 yaitu VIYEIANEPN. Motif-motif pendek juga ditemukan di sepanjang sekuen protein antara lain ASN_Glycosilation : SDK ; CK2_Phospho site : TAKE, LRDK, SVK, TAK, LRD dan QIS ; Myristyl : NTPNVI, TSDASG dan GASKTG; PKC_Glycosilation: SVK, TAK, SLR dan SDK (Lampiran 12).

Motif ASN_GLYCOSYLATION disebut reaksi glikosilasi merupakan daerah modifikasi setelah proses translasi yaitu proses penambahan glikan pada daerah residu asparagin (Asn), berukuran 3 asam amino (Medzihradzsky, 2008) yaitu SDK (Serin, asam aspartat & lisin). Motif CK2_PHOSPHO_SITE merupakan tempat terjadinya fosforilasi kasein kinase II, pada sekuen gen ini ditemukan dalam urutan TAKE, LRDK, SVK, TAK, LRD dan QIS. Menurut Gao & Wang (2006) CK2_PHOSPHO_SITE umumnya mengandung sekuen gen STKD, TTVD, dan TYLE. Motif MYRISTYL merupakan proses

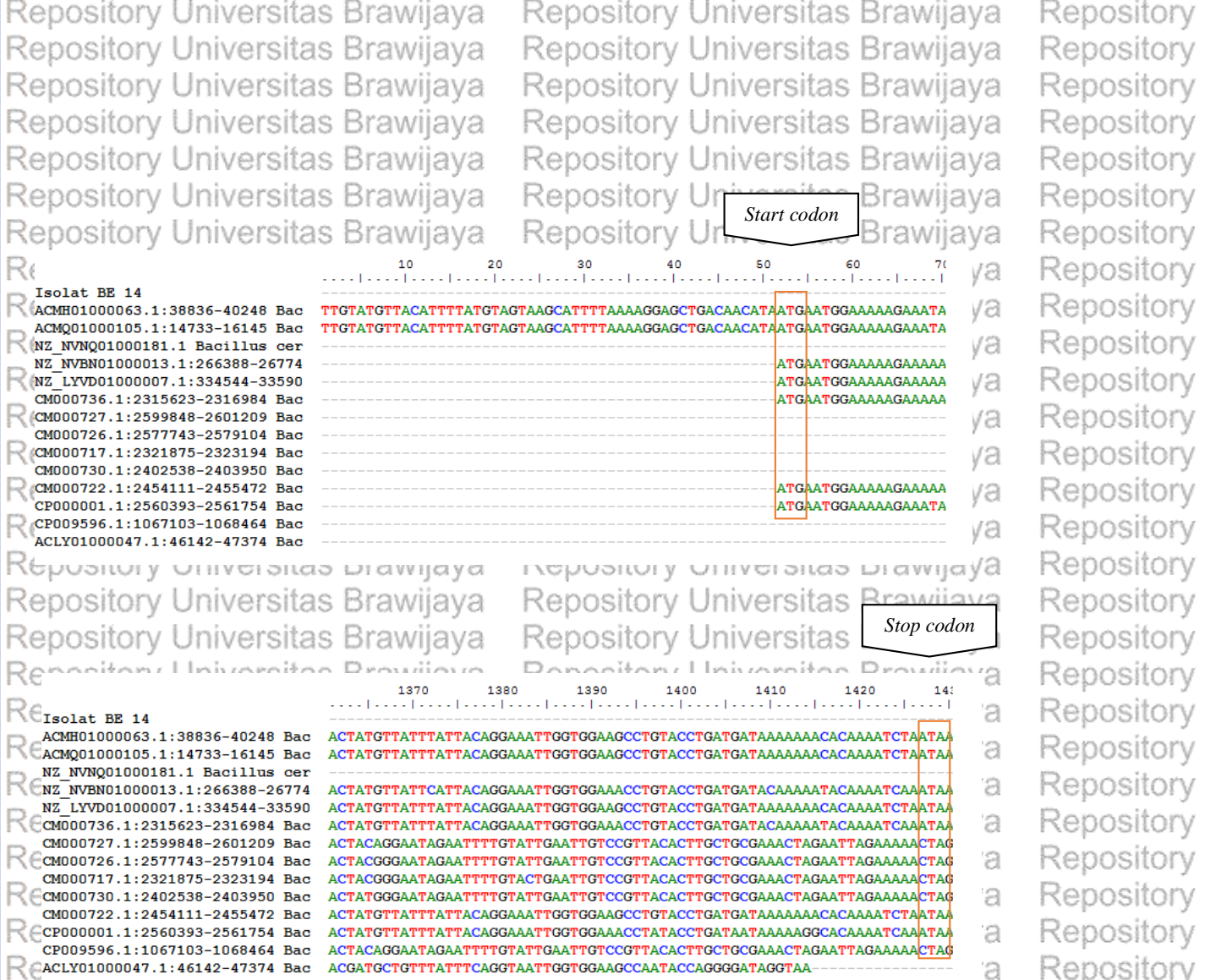


miristilasi, terjadi penambahan gugus myristyl pada suatu protein pada akhir proses translasi. Motif ini memiliki consensus, pada sekuen gen ini ditemukan dalam urutan NTPNVI, TSDASG dan GASKTG. Motif MYRISTYL biasanya mengandung sekuen gen GTSDAS, GASKTG, GTKDST, GSMNSN dan GASTGN (Stroh *et al.*, 2002). Motif PKC_PHOSPHO_SITE menunjukkan daerah tempat terjadinya fosforilasi protein kinase C, pada sekuen gen ini ditemukan dalam urutan SVK, TAK, SLR dan SDK. Menurut Leonard *et al.* (2011) PKC_PHOSPHO_SITE mempunyai urutan sekuen gen SDK, STK, TAR, TYK, TLK.

4.4.2 Karakter gen pengkode endoglukanase isolat BE 14

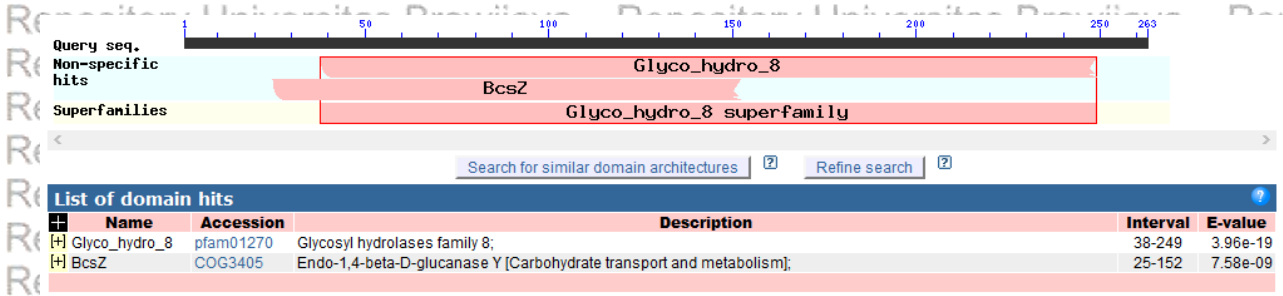
Pada penelitian ini diperoleh sekuen endoglukanase dari isolat BE 14 dengan ukuran 874 bp. Berdasarkan hasil BLAST bahwa protein endoglukanase isolat BE 14 memiliki homologi dengan endoglukanase (*Bacillus cereus* Rock 1-15) dengan similaritas 99,71 % dan *Query cover* 95 %. Letak suatu gen endoglukanase ditunjukkan pada daerah ORF yaitu daerah yang akan diterjemahkan menjadi protein. Gambar 32 menunjukkan *start codon*, ATG, dan *stop codon*, TGA/TAG/TAA dari enzim endoglukanase isolat BE 14 (*Bacillus cereus*).

Pada endoglukanase *Bacillus cereus* Rock 1-15 *start codon* muncul pada urutan basa 52-54 bp dan *stop kodon* pada 1428-14300 (Gambar 30). Pada isolat BE 14 panjang basa dimulai pada urutan 135 sampai 1043. Pada isolat BE 14 tidak terlihat *start* dan *stop codon* tersebut. Hal ini dikarenakan gen endoglukanase isolat BE 14 terlalu pendek, yaitu hanya 874 bp. Letak *start* dan *stop codon* isolat BE 14 dapat diasumsikan sama dengan *Bacillus cereus* Rock 1-15 (ACMH01000063) yang mempunyai similaritas/kesamaan tertinggi 99,71 %. Perbedaan antara sekuen isolat BE 14 dengan *Bacillus cereus* Rock 1-15 yaitu pada urutan basa ke 305 pada *Bacillus cereus* Rock 1-15 ada basa C sedangkan isolat BE 14 muncul basa T (Lampiran 12). Perbedaan urutan dna ini menyebabkan perbedaan sifat dari keduanya, yaitu perbedaan aktivitas glikosil hidrolasenya. Endoglukanase isolat BE 14 masuk dalam kelompok glikosil hidrolase (GH8) sedangkan endoglukanase *Bacillus cereus* Rock 1-15 masuk dalam kelompok GH5.



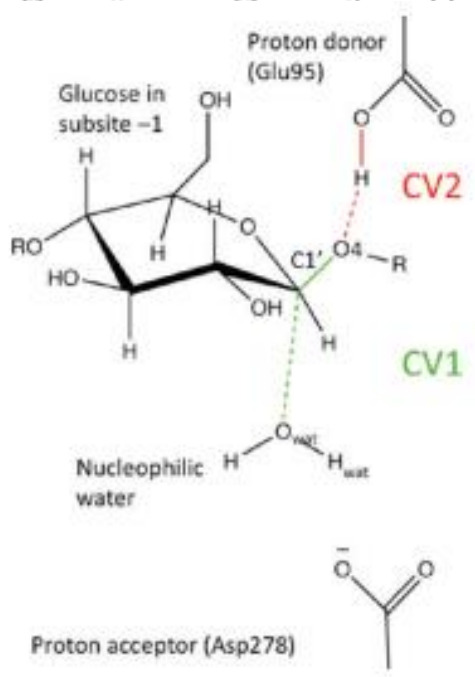
Gambar 30. Daerah ORF dari isolat BE 14 (*Bacillus cereus*)

Analisis domain fungsional isolat BE 14. Domain merupakan suatu unit dari protein yang independen secara struktural yang memiliki karakteristik berupa protein globular kecil. Domain bertanggung jawab pada aktivitas protein dan biasanya memiliki fungsi yang spesifik. *Gen Bank Database* dapat dimanfaatkan untuk melacak keberadaan motif dan domain tersebut. Pada *Database* tersebut dapat diketahui protein yang berbeda yang memiliki motif dan domain yang sama, maka digolongkan dalam satu famili.



Gambar 31. Domain katalitik gen endoglukanase isolat BE 14 (sumber : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)

Pada sekuen gen endoglukanase isolat BE 14 ditemukan domain katalitik selulase pada urutan protein 38-249 (Gambar 31). Superfamilinya menunjukkan karakter khas selulase dalam kelompok glikosil hidrolase 8. Gen *BscZ* yang merupakan karakter endo- β -1,4-glukanase Y ditemukan pada urutan basa 25-152. Gen *BglC* tidak ditemukan pada gen pengkode endoglukanase isolat BE 14. Domain katalitik glikosil hidrolase 8 (GH8) memiliki 2 fungsi aktivitas yaitu selulase dan kitonase.



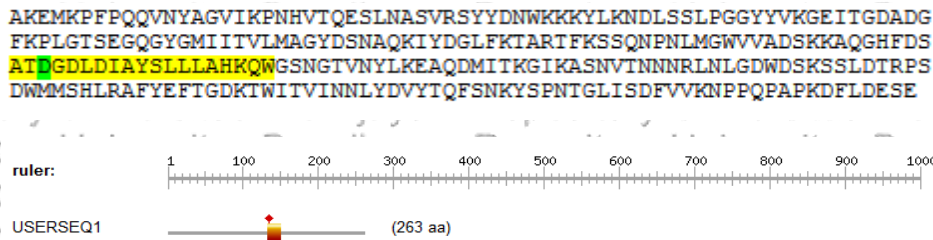
Petersen *et al.*, 2009

Gambar 32. Mekanisme reaksi hidrolisis oleh enzim GH8



Pada mekanisme hidrolisis oleh enzim kelompok GH8 menunjukkan adanya dua variabel kolektif, CV1 dan CV2 (Gambar 32). CV1 merupakan ikatan kovalen R-glikosidik atom C1 dan atom oksigen molekul air yang masuk dengan putusnya ikatan glikosidik secara simultan. CV2 adalah transfer proton antara donor proton katalitik dan atom O4. Mekanisme ini dipunyai oleh enzim selulase secara umum, xylanase dan endoglukanase lainnya.

Sisi aktif enzim endoglukanase isolat BE 14. Enzim memiliki sisi aktif, yaitu bagian enzim yang berfungsi sebagai katalis. Pada sisi ini, terdapat gugus prostetik yang diduga berfungsi sebagai zat elektrofilik sehingga dapat mengkatalis reaksi yang diinginkan. Sisi aktif gen pengkode endoglukanase *Bacillus cereus* ditunjukkan pada urutan asam amino 133-151 yaitu ATDGDIAYSLLIAHKQW. Keberadaan sisi aktif tersebut menunjukkan karakter sisi aktif enzim kelompok Glikosil Hidrolase (GH) 8. Ada 1 residu asam aspartat (D) pada residu 135 yang berperan sebagai katalis, sebagai penanda sisi aktif kelompok endoglukanase.

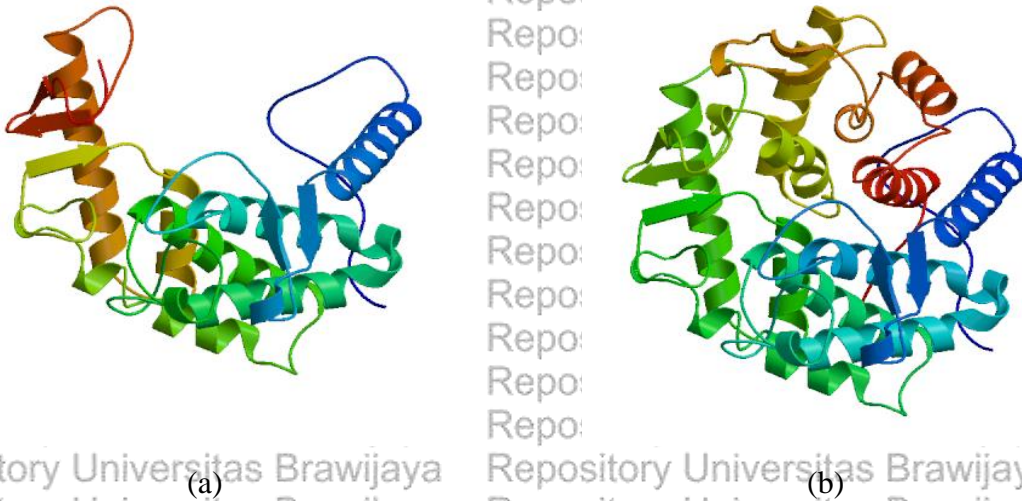


Gambar 33. Daerah sisi aktif gen endoglukanase isolat BE 14 (sumber : <http://prosite.expasy.org>)

Pada sisi aktif endoglukanase isolat BE 14 terdapat Asp135 yang diduga sebagai aseptor proton (Gambar 33), sedangkan glutamat tidak muncul pada analisis sisi aktif menggunakan prosite. Pada analisis sisi aktif menggunakan *Software prosite* masih kurang spesifik letak sisi aktif, namun hasil ini dapat digunakan sebagai dasar penentuan sisi aktif dari analisis *Docking*. Pada endoglukanase *Clostridium thermocellum* menunjukkan bahwa Glu95 sebagai donor proton dan Asp278 sebagai aseptor proton (Peterson *et al.*, 2009).



Model protein endoglukanase isolat BE 14. Berdasarkan hasil identifikasi molekular bahwa model protein endoglukanase isolat BE 14 termasuk dalam endoglukanase *Bacillus cereus*. Memiliki kemiripan dan ukuran lebih kecil dari model protein endoglukanase *Bacillus cereus* Rock 1-15, hal ini dikarenakan hasil isolasi gen endoglukanase isolat BE 14 diperoleh ukuran sekuen 874 bp atau 263 aa. Pada endoglukanase *Bacillus cereus* Rock 1-15 mempunyai ukuran sekuen 1413 bp atau 470 aa.



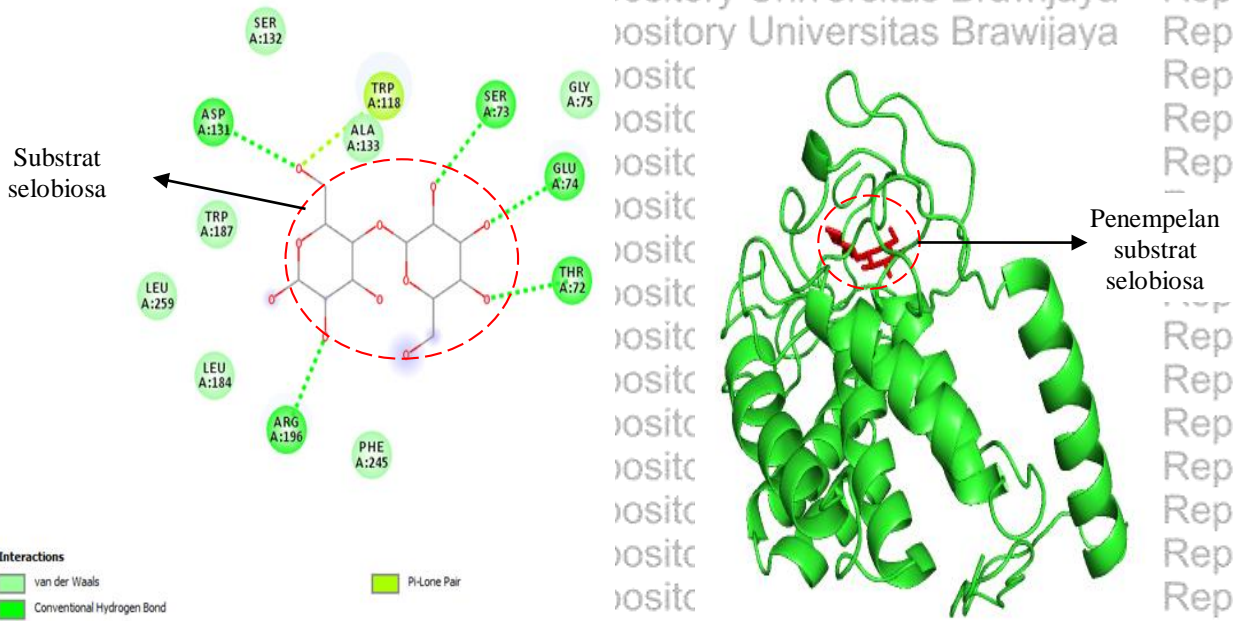
Gambar 34. Struktur protein endoglukanase
(a) Isolat BE 14, (b) *Bacillus cereus* Rock 1-15
(www.swissmodel.expasy.org)

Struktur protein endoglukanase isolat BE 14 terdiri dari α -heliks berjumlah 7, β -sheet 4 dan loop 11, sedangkan endoglukanase *Bacillus cereus* Rock 1-15 memiliki α -heliks 12, β -sheet 4 dan loop 16 (Gambar 34). Kedua protein tersebut mempunyai kesamaan pada jumlah β -sheet. β -sheet ini berupa lembaran-lembaran lebar yang tersusun dari sejumlah rantai asam amino yang saling terikat melalui ikatan hidrogen maupun ikatan tiol (S-H) (Campbell *et al.*, 2008).

Analisis Docking protein endoglukanase isolat BE 14. Analisis *Docking* merupakan metode yang menggunakan aplikasi komputer yang mampu memprediksi orientasi terbaik satu molekul terhadap molekul lainnya ketika keduanya saling berinteraksi dan terkait untuk membentuk sebuah kompleks yang stabil (Nauli, 2014). Pada analisis *Docking* ini dapat



diketahui bagian enzim yang terikat dengan substrat serta sisi aktif enzim yang merupakan daerah spesifik yang menyebabkan reaksi kimia terjadi. Sisi aktif enzim yang mengikat substrat terjadi melalui ikatan hidrogen (hidrofilik), ikatan hidrofobik, ikatan kovalen temporer (van der waals) serta kombinasi ketiganya.



Gambar 35. Interaksi antara endoglukanase isolat BE 14 dengan substrat selobiosa secara *in silico*

Pada analisis *Docking* ini protein endoglukanase isolat BE 14 diinteraksikan dengan substrat selobiosa hasil hidrolisis substrat CMC (Gambar 35). Hasil *Docking* menunjukkan beberapa asam amino yang berinteraksi dengan substrat selobiosa secara hidrofilik/ikatan hidrogen antara lain Ser73, Glu74, Thr72, Asp131 dan Arg196. Interaksi hidrofobik terjadi pada ikatan dengan asam amino Gly75, Ala133, Ser 132, Leu184, Trp187, Phe245 dan Leu259. Adanya Glu74 dan Asp131 merupakan penanda sisi aktif dari endoglukanase isolat BE 14.

Pada interaksi protein endoglukanase isolat BE 14 dengan substrat selobiosa memiliki *Binding affinity* -23,22 kkal/mol. Nilai *Binding affinity* yang dimiliki isolat BE 14 lebih rendah dibandingkan dengan isolat BE 8, artinya kekuatan ikatan antara protein endoglukanase isolat BE 14 terhadap substrat selobiosa lebih besar. Nilai *Binding affinity*



sangat erat hubungannya dengan nilai K_M . K_M merupakan ukuran konstanta disosiasi (K_d) suatu enzim antara kompleks enzim-substrat. Menurut Mertz *et al.* (2007) nilai K_M berbanding terbalik dengan nilai *Binding affinity*. Semakin besar nilai K_M maka semakin kecil nilai *Binding affinity*. Nilai K_M isolat BE 8 sebesar 6,18 mg/mL dan isolat BE 14 yaitu 11,16 mg/mL, sehingga *Binding affinity* isolat BE 8 lebih besar dibandingkan *Binding affinity* isolat BE 14.

Motif protein isolat BE 14. Motif adalah suatu pola sekuen lestari yang berukuran pendek yang menunjukkan perbedaan yang berkaitan dengan fungsi protein tertentu. Motif protein dari sampel *Bacillus cereus* tidak mempunyai daerah CBM (*Cellulose Binding Module*), Glikosil Hidrolase (GH) 8 pada residu 133-151 yaitu ATDGDLDIAYSLLLHKQW. Ditemukan juga motif-motif pendek di sepanjang sekuen protein antara lain ASN-Glycosilation: NASV, NGTV, NVTN, PKC_Phospho site : SYYD, SATD, SSLD, SVR, TAR, TFK, SKK dan SNK ; Myristyl : GTSEGO, GMIITV, GLFKTA, GSNGTV dan GIKASN. Sisi katalitik GH8 isolat BE 14 diawali dengan asam amino aspartat 133, hal ini merupakan ciri khas utama GH8 kelompok *Bacillus* (Prakash & Gobal, 2014)

Berdasarkan karakterisasi antara *Bacillus subtilis* dan *B.cereus* dapat dibuat tabel kesamaan dan perbedaan gen endoglukanase diantara keduanya. Berdasarkan tabel 9 menunjukkan bahwa sekuen protein enzim endoglukanase yang dimiliki *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus* mempunyai kemiripan khususnya pada motif protein. Hal ini dikarenakan kedua isolat tersebut masih dalam satu Genus *Bacillus*.

4.5 Pembahasan Umum Hasil Penelitian

Pada isolasi bakteri selulolitik dalam bekatul diperoleh dua isolat potensial yaitu isolat BE 8 dan BE 14. Berdasarkan uji kualitatif nilai indeks selulolitik kedua isolat tergolong rendah yaitu <1 namun pada uji secara kuantitatif keduanya memiliki aktivitas paling tinggi baik aktivitas endoglukanase, eksoglukanase maupun beta glukosidase. Nilai indeks selulolitik yang rendah disebabkan perbedaan kondisi lingkungan pertumbuhan, pada uji kualitatif ditumbuhkan dalam media padat dan uji kuantitatif pada media cair. Pada media cair kedua isolat tumbuh dengan cepat sehingga untuk produksi bahan-bahan hasil



metabolisme lebih cepat dibandingkan di media padat. Kedua isolat tersebut juga memiliki pola kurva pertumbuhan yang panjang, sehingga mempunyai populasi sel yang tinggi yang dapat menghasilkan enzim yang lebih banyak dan aktivitas enzim tinggi.

Secara *in vitro* isolat BE 8 dan BE 14 memiliki sistem selulase yang lengkap yaitu adanya aktivitas endoglukanase, eksoglukanase dan beta glukosidase. Hal ini yang membedakan karakter isolat selulolitik *indigenous* bekatul dengan isolat selulolitik yang lain (Kim *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2010; Ming, 2012) dan menjadi temuan baru dalam penelitian ini. Endoglukanase isolat BE 8 dan BE 14 selama produksi enzim selulase ditumbuhkan dalam substrat CMC, meskipun demikian isolat tersebut juga memiliki aktivitas eksoglukanase dan betaglukosidase. Hal ini dihubungkan dengan gen yang dimiliki kedua isolat tersebut. Berdasarkan analisis domain dan motif gen endoglukanase isolat BE 8 termasuk dalam kelompok GH5 dan juga ditemukan gen *BglC* yang termasuk dalam kelompok GH1, kelompok ini memiliki aktivitas β -glukosidase. Isolat BE 8 juga memiliki motif protein yang termasuk kelompok GH5, dengan aktivitas endoglukanase maupun eksoglukanase. Isolat BE 14 memiliki domain kelompok GH8 yang mampu menghidrolisis selooligosakarida (eksoglukanase).

Gen endoglukanase isolat BE 8 mempunyai domain katalitik selulase yang di dalamnya ditemukan gen *BglC*, CBM (*Cellulose Binding Module*) yang merupakan daerah pengikatan enzim dengan substrat pada residu 228 – 246, sisi aktif pada asam amino 77-86 yaitu VIYEIANEPN dan termasuk dalam kelompok Glikosil Hidrolase/GH1 dan 5. Gen endoglukanase isolat BE 14 mempunyai domain yang mengandung Gen *BscZ* yang merupakan karakter endo- β -1,4-glukanase Y ditemukan pada urutan basa 25-152, sisi aktif pada urutan asam amino 133-151 yaitu ATDGDIAYSLLIAHKQW dan termasuk dalam kelompok GH 8. Secara fungsional, sekuen protein gen pengkode endoglukanase isolat BE 8 dan BE 14 memiliki aktivitas selulase khususnya endoglukanase yang ditunjukkan adanya domain dan sisi aktif glutamat dan aspartat.

Isolat BE 8 mempunyai kekerabatan yang tinggi dengan Spesies *Bacillus subtilis*, berdasarkan data domain yang ada di database Uniprot sebagian besar gen endoglukanase *Bacillus subtilis* termasuk kelompok GH5 dan terdapat daerah CBM, sedangkan endoglukanase isolat BE 8 (*Bacillus subtilis*) *indigenous* bekatul termasuk dalam kelompok



GH5, GH1 dan ada CBM. Temuan baru dalam penelitian ini bahwa *Bacillus subtilis indigenus* bekatul memiliki aktivitas enzim kelompok GH1, kelompok enzim ini mampu memproduksi glukosa lebih cepat.

Secara umum aktivitas BE 8 lebih tinggi dibandingkan dengan isolat BE 14 baik dalam kondisi ekstrak kasar maupun setelah dimurnikan secara parsial, hal ini ada hubungannya dengan nilai V_{max} , K_M dan afinitas enzim terhadap substrat (*Binding affinity*).

Nilai V_{max} isolat BE 14 lebih rendah dibandingkan isolat BE 8, artinya enzim selulase isolat BE 14 lebih cepat jenuh oleh substrat yang berakibat rendahnya produk hidrolisis yaitu glukosa sehingga aktivitasnya lebih rendah. Nilai K_M berbanding terbalik dengan nilai *Binding affinity*. Nilai K_M isolat BE 8 lebih rendah dibandingkan isolat BE 14 artinya disosiasi kompleks substrat dengan enzim lebih rendah dikarenakan kuatnya ikatan antara substrat enzim (*Binding affinity* lebih besar) ditunjukkan dengan nilai yang semakin negatif. Semakin kuat ikatan substrat enzim maka kerja enzim untuk menghidrolisis substrat menjadi produk lebih maksimal (aktivitas enzim meningkat).

Berdasarkan hasil karakterisasi secara *in silico* dari sekuen protein gen pengkode endoglukanase pada bakteri isolat BE 8 dan BE 14 dapat diketahui bahwa kedua sekuen protein tersebut memiliki aktivitas fungsional yang menunjukkan peluang terekspresinya enzim endoglukanase dari kedua isolat bakteri tersebut. Gen endoglukanase isolat BE 8 yang merupakan spesies *Bacillus subtilis* mempunyai domain kelompok GH1 dan BglC, dan didalamnya juga ada CBM dalam kelompok GH5. Beberapa *Bacillus subtilis* seperti *Bacillus subtilis* P07983, P23549 dan D4FXC0 memiliki domain BglC, GH5 dan CBM3 (Uniprot.org), yang berbeda dengan isolat BE 8 adalah adanya domain kelompok GH1.

Endoglukanase isolat BE 14 merupakan spesies *Bacillus cereus* mempunyai domain kelompok GH8. Berdasarkan data di uniprot semua endoglukanase *Bacillus cereus* A0A0K6KDM6, A0A2L0QG54 dan U3R8G6 mempunyai domain dalam kelompok GH5 dan CBM3. Domain kelompok GH8 merupakan kelompok enzim selulase yang spesifik untuk substrat tidak terlarut artinya endoglukanase isolat BE 14 mampu menghidrolisis substrat tidak terlarut air seperti avicel, kitosan, xilosa dan lichenan (ikatan 1,3-1,4- β -D-glukan) (Cuyvers *et al.*, 2011). Domain yang khas dari isolat BE 8 adalah kelompok GH1 yang mempunyai aktivitas β -glukosidase dan β -galaktosidase, artinya endoglukanase isolat



BE 8 mampu untuk menghidrolisis substrat selobiosa dengan aktivitas β -glukosidase menghasilkan glukosa dan substrat galaktosida seperti laktosa untuk menghasilkan galaktosa dan glukosa (He & Withers, 1997). Domain GH5 merupakan domain yang paling besar dari kelompok glikosil hidrolase (GH) biasanya ditemukan dari rantai multi-modular polipeptida yang mengandung modul pengikat katalitik, substrat-pengikat, dan fungsional selulase. Pada kedua sekuen protein tersebut, juga memiliki kemiripan pada beberapa aspek, yang dapat mengindikasikan lestarnya (tidak terlalu banyak terjadi mutasi) sekuen gen endoglukanase pada *genus* yang sama. Berdasarkan kemampuan enzim selulase yang dimiliki kedua isolat tersebut dapat dimanfaatkan untuk hidrolisis substrat selulosa selain bekatul seperti jerami, ampas tebu yang memiliki struktur selulosa yang lebih kristalin. Aplikasi lebih lanjut isolat bakteri selulolitik *indigenous* bekatul dapat dimanfaatkan untuk pembuatan pakan ternak dengan daya cerna tinggi, bioremediasi pada pengolahan limbah selulosa, produksi glukosa, produksi bioetanol dan lain sebagainya.

Sisi aktif enzim juga menentukan keberhasilan hidrolisis selulosa. Residu-residu pada sisi aktif bertindak sebagai donor atau akseptor proton terhadap substrat supaya terjadi reaksi.

Sisi aktif dianalisis menggunakan metode *Docking* dan *software prosite*, hal ini untuk memperkuat hasil analisis sisi aktif. Hasil analisis prosite digunakan sebagai dasar untuk menentukan posisi aktif protein enzim dengan substrat pada analisis *Docking*.

Sisi aktif endoglukanase ditandai adanya residu glutamat dan aspartat. Pada sisi aktif endoglukanase isolat BE 8 hasil *Docking* menunjukkan adanya residu Asp44 (ikatan hidrofilik) dan Glu84 dan Glu172 (ikatan hidrofobik), sedangkan hasil dari *prosite* diperoleh sisi aktif pada residu Glu 80 dan Glu84, memiliki kesamaan jenis residu asam aminonya meskipun beda urutannya. Sisi aktif isolat BE 14 mempunyai residu Glu74 dan Asp131 dan hasil *prosite* adanya Glu 135. Letak sisi aktif hasil *Docking* dan *prosite* berbeda namun masih memberikan gambaran adanya sisi aktif glutamat dan aspartat dari endoglukanase isolat BE 14.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan :

1. Isolat BE 8 dan BE 14 merupakan isolat terbaik dari 22 isolat bakteri selulolitik *indigenous* bekatul yang mempunyai kondisi optimum dalam memproduksi enzim selulase pada pH 7, penambahan Mg^{2+} pada suhu 37 °C.
2. Enzim selulase hasil pemurnian parsial menggunakan ammonium sulfat jenuh 80 % meningkatkan aktivitas spesifik 5,8 kali untuk isolat BE 8 dan 3,2 kali untuk isolat BE 14, aktivitasnya optimum pada pH 6 dan suhu 60 °C dengan nilai V_{max} dan K_M masing-masing 4,55 U/mL, 6,18 mg/mL untuk isolat BE 8 dan 4,19 U/mL; 11,16 mg/mL untuk BE 14.
3. Isolat BE 8 dan BE 14 secara fenotipik dan filogenetik tes diidentifikasi secara berurutan sebagai spesies *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus*.
4. Isolat BE 8 dan BE 14 secara *in vitro* terbukti memiliki aktivitas endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase. Secara *in silico* kedua isolat tersebut memiliki gen endoglukanase dibuktikan dengan similaritasnya yang tinggi dengan gen endoglukanase *Bacillus subtilis* untuk isolat BE 8 dan *Bacillus cereus* untuk isolat BE 14. Gen endoglukanase isolat BE 8 dibuktikan dengan adanya gen *BglC* dalam kelompok GH1 yang mampu menghidrolisis disakarida dengan aktivitas β -glukosidase dan β -galaktosidase serta mempunyai CBM kelompok GH5, sedangkan gen endoglukanase isolat BE 14 memiliki gen *BcsZ* dalam domain kelompok GH8 yang mempunyai kemampuan untuk menghidrolisis selulosa tidak terlarut dan ikatan 1,3-1,4- β -D-glukan.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat disampaikan beberapa saran, antara lain bagi :

1. Peneliti

Pada isolasi gen endoglukanase masih diperoleh sekuen DNA yang kurang panjang (<1500 bp) sehingga pemodelan protein tidak menggambarkan struktur protein utuh dari gen endoglukanase, meskipun berdasarkan analisis *Docking* menunjukkan adanya penempelan substrat pada sisi aktif enzim. Hal ini disebabkan penggunaan primer yang kurang pas



sehingga tidak mengamplifikasi semua gen endoglukanase, sehingga perlu melakukan analisis primer dari berbagai penelitian yang digunakan untuk mengisolasi gen endoglukanase.

2. Masyarakat praktis

Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas enzim dari isolat bakteri selulolitik *indigenus* bekatul. Hal ini akan membuka peluang untuk industri memanfaatkan isolat bakteri selulolitik maupun enzim selulase *indigenus* bekatul untuk produksi glukosa, pembuatan detergen, tekstil, kertas, pengolahan limbah dan lain sebagainya.

3. Pemerintah

Produksi bekatul semakin hari semakin meningkat, hal ini dapat mendukung berdirinya industri dalam negeri berbahan dasar bekatul sehingga mendorong penyerapan tenaga kerja yang lebih banyak dan mendukung pembangunan ekonomi yang lebih baik.