

PENGARUH TOLUENA DAN WAKTU INKUBASI TERHADAP AKTIVITAS SELULASE DARI TANAH HUTAN MANGROVE

Ni Komang Lia Wahyuni¹, I Nengah Wirajana^{1*}, I Wayan Budiarsa Suyasa¹

¹Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Udayana, Jimbaran, Badung, Bali, Indonesia

* wirajana@yahoo.com

ABSTRAK: Tanah hutan mangrove diketahui memiliki biodiversitas yang tinggi sebagai lokasi yang berpotensi untuk eksplorasi enzim. Salah satu enzim yang dapat dieksplorasi dari tanah hutan mangrove adalah selulase yang merupakan biokatalisator yang banyak digunakan dalam bidang industri. Tidak seperti pengukuran aktivitas selulase murni atau ekstrak kasar yang berasal dari salah satu sumbernya, pengukuran aktivitas selulase secara langsung dari tanah sering mengalami kesulitan dan banyak faktor yang harus dipelajari. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan toluena dan waktu inkubasi reaksi enzimatik terhadap aktivitas selulase yang terdapat pada tanah hutan mangrove pantai Suwung Bali. Pengukuran aktivitas selulase dilakukan dengan metode CMC (*Carboxymethyl Cellulose Assay*) pada sampel tanah (*slurry*, pelet, dan supernatan) dengan dan tanpa penambahan toluena dengan waktu inkubasi reaksi enzimatik 1 dan 24 jam. Glukosa yang dihasilkan dari reaksi dengan substrat CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) dianalisis secara spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm setelah direaksikan dengan asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan antiseptik toluena dan waktu inkubasi reaksi enzimatik berpengaruh terhadap aktivitas selulase tanah hutan mangrove pantai Suwung Bali. Aktivitas selulase tertinggi sebesar 249,26 U/mL diperoleh pada lumpur dengan penambahan toluena dan inkubasi reaksi enzimatik 1 jam.

Kata kunci : Selulase, tanah hutan mangrove, *Carboxymethyl Cellulose Assay*

ABSTRACT: Mangrove soil has high biodiversity and has been well known as potential location for enzymes exploration. One of the enzymes explored from mangrove soil is cellulase which is a biocatalysator commonly used in industries. Unlike the measurement of cellulase activity of pure or crude extract obtained from one source, direct measurement of cellulase activity of the soil often counter many obstacles and many factors are involved that need to be elaborated. The aim of this study is to determine the effects of toluene addition and incubation time of enzymatic reaction on activity of cellulase existing on soil of mangrove forest of Suwung Bali coastal. The measurement of cellulase activity was conducted by the method of CMC (*Carboxymethyl Cellulose Assay*) on soil samples (*slurry*, pellet, and supernatant) with and without the addition of toluene to the enzymatic reaction incubation time 1 and 24 hours. Glucose produced from reaction with the substrate CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) was analyzed by UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 540 nm (λ 540 nm). The results of this study showed that the addition of toluene antiseptic and incubation time of enzymatic reaction influence the activity of cellulase existing on soil of mangrove forest of Bali Suwung coastal. The highest cellulase activity was 249.26 U/mL obtained on slurry with the addition of toluene and with 1-hour incubation of the enzymatic reaction.

Keywords: Cellulase, soil, mangrove, *Carboxymethyl Cellulose Assay*.

1. PENDAHULUAN

Pengujian aktivitas enzim merupakan langkah awal untuk eksplorasi enzim secara metagenomik. Salah satu lokasi yang potensial untuk eksplorasi enzim adalah tanah hutan mangrove yang kaya akan komponen lignoselulosa, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Kandungan selulosa dalam tanah hutan mangrove memungkinkan adanya aktivitas selulase yang mendegradasi biomassa dalam tanah hutan mangrove.

Hampir semua metode yang dikembangkan oleh para ahli biokimia untuk uji enzim berguna sebagai petunjuk untuk uji aktivitas enzim dalam tanah, tetapi perhatian seharusnya lebih ditujukan pada penentuan produk reaksi enzim secara kuantitatif. Hal ini karena banyak metode yang tidak cocok dengan karakteristik kimia yang kompleks dari sistem tanah [1].

Waktu inkubasi dalam proses pengukuran aktivitas enzim yang terlalu lama dikhawatirkan akan menimbulkan kesulitan pengukuran glukosa (produk aktivitas selulase) secara kuantitatif. Hal ini disebabkan oleh adanya penyerapan glukosa ke dalam tanah, sehingga glukosa yang terukur lebih rendah [1]. Masalah lainnya adalah adanya aktivitas mikroorganisme yang membutuhkan glukosa sebagai sumber karbon, namun masalah ini dapat diatasi dengan perlakuan penambahan antiseptik seperti toluena [2].

Pada teknik pengukuran aktivitas enzim dalam tanah sering dilakukan perlakuan penurunan temperatur; penambahan antiseptik seperti toluena, etanol, Triton X-100, dimetil sulfoksida, radiasi dengan sinar gamma atau tembakan elektron, dan fumigasi dengan senyawa-senyawa seperti kloropikrin,

metilbromida, dan kloromisetin. Kelemahan dari perlakuan tersebut dalam pengukuran aktivitas enzim adalah dapat mendenaturasi protein enzim, sehingga aktivitas enzim yang terukur lebih rendah dari kenyataannya dalam tanah [1].

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini mencoba membandingkan dua metode penentuan aktivitas selulase dari tanah yang berbeda dalam hal waktu inkubasi reaksi enzimatik dan ada tidaknya penambahan antiseptik toluena. Penelitian sebelumnya menggunakan waktu inkubasi reaksi enzimatik 1 jam dan tanpa penambahan toluena [3]; sedangkan penelitian lainnya menggunakan waktu inkubasi 24 jam dan dengan penambahan toluena [2]. Pada penelitian ini, selain penentuan aktivitas selulase dari tanah menggunakan kedua metode tersebut di atas, juga dilakukan perbandingan penentuan aktivitas selulase dari tanah yang menggunakan waktu inkubasi reaksi enzimatik 1 jam dengan penambahan toluena dan waktu inkubasi 24 jam dengan tanpa penambahan toluena. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh penambahan toluena terhadap aktivitas selulase pada tanah hutan mangrove pantai Suwung Bali dengan waktu inkubasi reaksi enzimatik 1 dan 24 jam

2. PERCOBAAN

2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah yang telah diambil dari hutan mangrove pantai Suwung Kauh Bali; dan beberapa bahan kimia dengan kualitas *pro-analysis*, seperti: asam sitrat

(Merck), natrium sitrat (Merck), *Carboxymethyl cellulose* (Sigma), D-glukosa (ACS grade, Bio First), asam 3,5-dinitrosalisilat atau DNS (Sigma), KNa-tartrat (Sigma), NaOH (Merck), natrium sulfit (Sigma), fenol (Merk), toluene (Merk), dan aquades steril. Sedangkan peralatan yang digunakan adalah neraca analitik (*AE ADAM AFP 360 L*), Vortex (*ABV-1*), sentrifugasi (*Sorvall Pico*), *hot plate*, stirer magnetik, mikro pipet Eppendorf (100 μ L dan 1000 μ L), tip mikro, tabung mikro 1,5 mL (Eppendorf), *cuvette*, spektrofotometer UV mini-1240 *Shimadzu*, dan autoklaf.

2.2 Metode

Preparasi sampel tanah

Sampel tanah dibagi menjadi 3 bagian, yaitu *slurry*, pelet, dan supernatan sebagai sumber enzim ekstraseluler dari tanah yang diukur aktivitasnya secara langsung. Sebanyak 500 μ L sampel *slurry* tanah kemudian disentrifugasi pada kecepatan 9.500 x g selama 3 menit. Selain *slurry*, pelet dan supernatan hasil sentrifugasi yang telah dipisahkan, semua diukur aktivitas selulasenya

Pengukuran aktivitas selulase

Pada penelitian ini digunakan metode CMC (*Carboxymethyl Cellulose Assay*) untuk pengukuran aktivitas selulase. Pada uji aktivitas selulase sebanyak 500 μ L *slurry* ditambahi 50 μ L toluena dan 500 μ L CMC 2% dalam kondisi asam, lalu divorteks 1 menit. Kemudian, tabung uji diinkubasi selama 1 dan 24 jam. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 μ L DNS, lalu dipanaskan pada suhu 100°C dan didinginkan, lalu ditambahkan 400 μ L

akuades steril, kemudian disentrifugasi 3 menit (9.500xg) dan diukur serapannya pada λ 540 nm. Penambahan akuades steril pada sampel supernatant dan pelet disesuaikan hingga mencapai volume akhir 1,5 mL. Hal yang sama juga dilakukan untuk sampel uji tanpa penambahan toluena [2, 3].

Pengukuran aktivitas selulase menggunakan matriks yang sama seperti yang akan digunakan dalam pengukuran blanko, standar, dan t=0. Aktivitas selulase ditentukan dengan mengukur kadar glukosa yang dihasilkan. Kadar glukosa diukur dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm.

Penentuan kadar (konsentrasi) glukosa yang dihasilkan dari reaksi enzim dengan substrat dilakukan dengan menggunakan metode standar tunggal yang mengacu pada Hukum Lambert-Beer, dengan persamaan:

$$C_x = \frac{A_x \times C_s}{A_s}$$

yang mana: A_x = absorbansi sampel; C_x = konsentrasi sampel; A_s = absorbansi standar; dan C_s = konsentrasi standar.

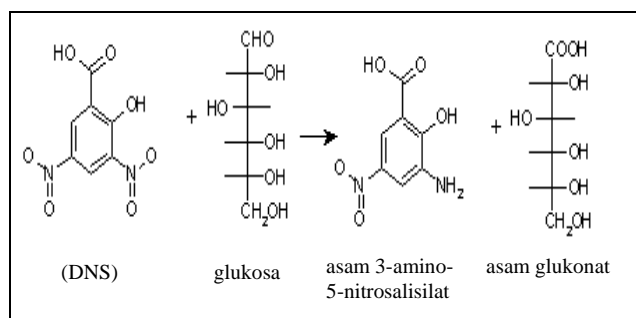
Aktivitas selulase dinyatakan dalam unit per mL (U/mL). Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol glukosa dalam waktu 1 jam pada kondisi percobaan. Penentuan aktivitas selulase dilakukan dengan menggunakan persamaan berikut ini.

$$\text{Aktivitas selulase (U/mL)} = \frac{X \text{ mg glukosa}}{\frac{0,18 \text{ mg glukosa/jam}}{\mu\text{mol/jam}} \times 1,5 \text{ mL} \times 1 \text{ jam}}$$

1 mol glukosa = 180 g
X : Jumlah glukosa yang dihasilkan (mg)

3. HASIL dan PEMBAHASAN

Pengukuran aktivitas selulase menggunakan substrat CMC dengan produk reaksi glukosa yang diukur kadarnya secara spektrofotometri UV-vis setelah direaksikan dengan DNS. Pada reaksi pengembangan warna, DNS akan tereduksi oleh glukosa dan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang berwarna kuning kecoklatan, sesuai reaksi pada Gambar 1.



Gambar 1. Reaksi pengembangan warna [4].

Aktivitas selulase pada tanah hutan mangrove hanya dapat terukur pada sampel dalam bentuk lumpur (*slurry*), sedangkan pada supernatan dan pelet tidak ditemukan aktivitas selulase. Aktivitas selulase hanya ditunjukkan dari sampel lumpur (*slurry*). Aktivitas selulase pada supernatan tidak dapat ditentukan kemungkinan disebabkan oleh selulase ikut terendapkan bersama dengan matriks tanah, yang mana selulase masih terikat sebagai kompleks selulase (selulosom) yang berbobot molekul tinggi, sehingga aktivitas selulasenya menjadi tidak terdeteksi.

Menurut Shoham *et al.* [5], sebagian besar dari selulase masih terikat ke dalam bentuk kompleks selulase (selulosom) yang banyak terdapat di matriks tanah. Ketika disentrifugasi, selulosom yang merupakan kompleks selulase yang bermolekul besar dengan bobot molekul tinggi akan cenderung mengendap bersama dengan matriks tanah. Walaupun selulase sebgaiian besar terendapkan bersama matiks tanah, namun apabila diukur aktivitas selulase dari pelet tanah, ternyata tidak menunjukkan adanya aktivitas selulase. Hal ini diduga disebabkan oleh kondisi pengukuran yang tidak sesuai karena cairan almiiah dalam tanah sebagian besar sudah terpisahkan yang menyebabkan selulase menjadi tidak aktif.

Pada Tabel 1 terlihat bahwa aktivitas selulase dengan penambahan toluena lebih besar dari pada aktivitas selulase tanpa penambahan toluene dengan waktu inkubasi reaksi enzimatis 1 dan 24 jam. Penambahan toluena dimaksudkan untuk menghambat mikroorganisme pengganggu yang memanfaatkan glukosa sebagai sumber karbon, sedangkan pada pengukuran aktivitas selulase dilakukan berdasarkan laju bertambahnya pembentukan glukosa.

Aktivitas selulase dengan waktu inkubasi reaksi enzimatis 1 jam lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas selulase inkubasi reaksi enzimatis 24 jam, baik tanpa dan dengan penambahan toluena. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan toluena dan waktu inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas selulase.

Tabel 1. Hasil Aktivitas Selulase Tanah Lumpur Hutan Mangrove Dengan dan Tanpa Toluena dan Waktu Inkubasi 1 dan 24 jam

Toluena	Aktivitas Selulase (U/mL)		Aktivitas selulase rata-rata (U/mL)	
	W ₁	W ₂₄	W ₁	W ₂₄
P ₀	63,41	9,03	106,95 ± 38,34	8,57 ± 1,43
	135,70	9,72		
	121,74	6,97		
P ₁	320,48	7,86	249,26 ± 126,47	12,76 ± 8,63
	103,25	8,01		
	324,07	22,40		

P₀: sampel tanpa penambahan toluena

P₁: sampel dengan penambahan toluena

W₁: sampel dengan waktu inkubasi reaksi enzimatis 1 jam

W₂₄: sampel dengan waktu inkubasi reaksi enzimatis 24 jam

Waktu inkubasi yang terlalu lama akan menurunkan aktivitas selulase yang disebabkan oleh adanya penyerapan glukosa ke dalam tanah dan adanya mikroorganisme yang tumbuh pada tanah dengan inkubasi yang lama, akan memerlukan glukosa sebagai sumber karbon sehingga glukosa yang terukur lebih rendah pada akhir reaksi dibandingkan dengan awal reaksi [5,7].

Data aktivitas selulase pada Tabel 1 menunjukkan derajat keterulangan yang rendah (standar deviasi yang cukup tinggi) kemungkinan disebabkan oleh sampel tanah hutan mangrove yang digunakan belum terhomogenkan dengan baik dan karena tanah merupakan matriks alam yang sangat kompleks.

Hasil tertinggi dari aktivitas selulase pada Tabel 1 ditunjukkan oleh tanah lumpur (*slurry*) dengan penambahan toluena dan inkubasi reaksi enzimatis 1 jam sebesar 249,26±126,47 U/mL. Jika dibandingkan

dengan aktivitas selulase yang diperoleh dari penelitian sebelumnya pada sampel yang sama tetapi tanpa penambahan toluena diperoleh aktivitas selulase sebesar 4,176 ± 0,630 U/mL [3]. Selain karena dinamika yang ada dalam sampel tanah, teknik pengukuran aktivitas enzim dengan penambahan toluena sangat mempengaruhi hasil yang diperoleh. Perbedaan jumlah enzim dan kondisi pengukuran mempengaruhi tinggi rendahnya aktivitas enzim pada umumnya.

4. KESIMPULAN

Toluena dan lamanya waktu inkubasi reaksi enzimatis berpengaruh terhadap aktivitas selulase tanah hutan mangrove.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini disampaikan terima kasih kepada Prof. Dr. I.B. Putra Manuaba dan Dra. Wiwik Susannah Rita, M.Si atas saran-saran yang diberikan.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Tabatabai, M.A. & Dick, W.A. Enzyme in Soil in "Enzyme in The Enviromental", (Ed. Burns, R.G. & Dick, R.P.), *Marcel Dekker Inc*, 2002. 567 – 591
- [2] Kapustka, L.A., Anne A.E., and William, C.S. The peroxidase-glucose oxidase system: A new method to determine glucose liberated by carbohydrate degrading soil enzymes. *Plant and Soil*. 1981, 63, 487 – 490
- [3] Wirajana, Yuliana, D.A., dan Ratnayani. Skrining selulase dari tanah hutan mangrove Pantai Suwung Bali. *J. Kimia*. 2012, 6(2), 191 – 195

- [4] Otajevwo, D.F., dan Aluyi, H.S.A. Cultural conditions necessary for optimal cellulase yield by cellulolytic bacterial organisms as they relate to residual sugars released in broth medium. *J.Modern Applied Scienc.* 2011, 5(3), 141 – 151
- [5] Shoham, Y., Lamed, R., and Bayer, E.A., The Cellulosome Concept as an Efficient Microbial Strategy for the Degradation of Insoluble Polysaccharides, *J.Trends in Microbiology*, 1999, 7(7), 275 – 281