

## SKRINING SELULASE DARI TANAH HUTAN MANGROVE PANTAI SUWUNG BALI

I Nengah Wirajana, Ketut Ratnayani, dan Darma Asih Yuliana

*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran*

### ABSTRAK

Tanah mangrove diketahui memiliki biodiversitas yang tinggi sebagai lokasi yang berpotensi untuk eksplorasi enzim. Tujuan skrining aktivitas selulase langsung adalah untuk menemukan aktivitas selulase yang berasal dari tanah hutan mangrove pantai Suwung Bali. Tanah hutan mangrove diambil dari tiga lokasi berbeda yang diberi label A (8°43'38.20"LS), B (8°43'46,18"LS), dan C (8°43'37,38"LS). Skrining aktivitas selulase dilakukan dengan metode *Filter Paper Assay* dan *Carboxymethyl Cellulose Assay*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas selulase ekstraseluler dapat diukur secara langsung dari sampel tanah hutan mangrove. Aktivitas selulase tertinggi berasal dari tanah C sebesar 0,866 U/g tanah dengan metode *Filter Paper Assay*, sedangkan dengan metode *Carboxymethyl Cellulose Assay* diperoleh aktivitas sebesar  $4,176 \pm 0,630$  U/g tanah.

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

### ABSTRACT

Mangrove soil has high biodiversity and well known as potential location for enzymes exploration. The aim of direct screening for cellulase of mangrove soil is to find out the cellulase activity from mangrove soil. Mangrove soils were collected from three different locations labelled as A (8°43'38.20"SL), B (8°43'46,18"SL), and C (8°43'37,38"SL). The screening was conducted by *Filter Paper Assay* and *Carboxymethyl Cellulose Assay* methods.

The results showed that cellulase activities can be measured directly from mangrove soil samples of Suwung Beach-Bali. The highest cellulase activities were 0,866 U/g soil by *Filter Paper Assay* and  $4,176 \pm 0,630$  U/g soil by *Carboxymethyl Cellulose Assay*, given by soil samples C.

Keywords: Cellulase, mangrove forest soil, *Filter Paper Assay*, *Carboxymethyl Cellulose Assay*.

### PENDAHULUAN

Eksplorasi enzim selulolitik sangat perlu dilakukan untuk pemanfaatan enzim dalam mendegradasi limbah organik menjadi produk yang lebih bermanfaat (Ohmiya et al, 2003). Namun, sekitar 99% dari biodiversitas bakteri lingkungan tidak dapat dikulturkan dan informasi genom masih banyak yang belum terungkap (Amann et al, 1995). Salah satu cara eksplorasi enzim yang kini sedang dilakukan untuk mengungkap informasi genom

baru adalah metagenomik, yaitu: langkah baru dalam analisis genom secara langsung dari lingkungan dalam rangka membangun pustaka metagenomik dari berbagai macam mikroorganisme yang ada dalam lingkungan tersebut (Handelsman, 2004). Metagenomik memberikan peluang besar dalam penemuan diversitas enzim yang baru karena kita dapat mengeksplorasi genom mikroba secara langsung dari lingkungan habitatnya (Uchiyama & Mizaki, 2009; Schmeisser, et al., 2007).

Salah satu lokasi yang potensial (biodiversitas tinggi) untuk eksplorasi enzim adalah hutan mangrove. Akar mangrove diketahui mampu menahan limbah organik dan partikel endapan yang terbawa arus (Irwanto, 2006) dan tanahnya kaya akan lignoselulosa yang terdiri atas tiga jenis polimer utama, yaitu: selulosa, hemiselulosa dan lignin (Meryandini, *et al.*, 2009). Berkaitan dengan berlimpahnya selulosa dalam tanah hutan mangrove, maka kemungkinan besar akan terdapat aktivitas selulase yang mendegradasi biomassa dalam tanah hutan mangrove. Gilna dan Khaleel (2011) telah berhasil menemukan aktivitas selulase ekstraseluler dari jamur *Aspergillus fumigatus* yang berasal dari tanah hutan mangrove Kerala-India. Pendekatan metagenomik yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah penentuan aktivitas selulase ekstraseluler secara langsung dari tanah hutan mangrove pantai Suwung Bali. Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif-eksploratif dalam menemukan informasi aktivitas selulase.

## MATERI DAN METODE

### Bahan

Sampel tanah hutan mangrove,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,2 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,2 M, *Carboxymethyl cellulose* (Sigma), kertas saring Whatman no.1, strip pH indikator universal (Merck), glukosa anhidrat, asam 3,5-dinitrosalisilat, dan aquades steril.

### Peralatan

Botol polietilen steril, neraca analitik, botol semprot, sentrifugasi *Hettich* EBA III, tabung sentrifugasi, *hot plate*, stirer magnetik, termometer, labu ukur, gelas beaker, *ball filler*, pipet volume (5 mL; 10 mL), mikro pipet, tip mikro putih (10  $\mu\text{L}$ ), kuning (200  $\mu\text{L}$ ), dan biru (1000  $\mu\text{L}$ ), tabung mikro 1,5 mL (Eppendorf), lemari pendingin, cuvette, dan spektrofotometer UV mini-1240 *single beam* merk Shimadzu

### Cara Kerja

#### *Pengambilan Sampel Tanah*

Sampel tanah hutan mangrove diambil di tiga lokasi berbeda, yaitu di lokasi A ( $8^\circ 43' 38,20'' \text{LS}$ ), B ( $8^\circ 43' 46,18'' \text{LS}$ ), dan C ( $8^\circ 43' 37,38'' \text{LS}$ ). Masing-masing lokasi diukur terlebih dahulu pH tanah dan suhunya. Sampel diambil pada kedalaman 0-10 cm dan disimpan dalam botol plastik steril.

#### *Uji Aktivitas Selulase Dengan Metode Filter Paper Assay*

Sebanyak 1,0 g tanah ditambahi 1,0 mL buffer fosfat pH 7 atau 6 (sesuai pH tanah) kemudian 50 mg kertas saring Whatman no.1 dimasukkan ke dalamnya dan semua tabung uji, kontrol enzim, dan kontrol substrat diinkubasi selama 60 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1,0 mL DNS, lalu dipanaskan pada air mendidih dan didinginkan, lalu ditambahkan 5,0 mL aquades, kemudian disentrifugasi dan diukur serapannya pada  $\lambda$  540 nm.

#### *Uji Aktivitas Selulase Dengan Metode Carboxymethyl Cellulose (CMC)*

Sebanyak 0,2 g tanah ditambahi 500  $\mu\text{L}$  CMC 2% dalam kondisi asam dan divorteks 1 menit, lalu semua tabung uji diinkubasi 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50  $\mu\text{L}$  DNS, lalu dipanaskan pada air mendidih dan didinginkan, lalu ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  aquades, kemudian disentrifugasi 3 menit (2.000 rpm) dan diukur serapannya pada  $\lambda$  540 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

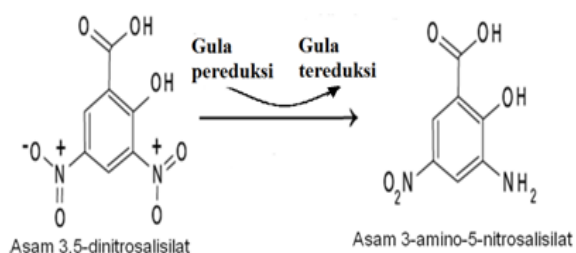
### **Pengambilan Sampel Tanah**

Dari hasil pengamatan saat pengambilan sampel tanah diperoleh data pH tanah A dan B adalah 7, sedangkan pH tanah C adalah 6. Suhu tanah di titik A adalah  $30^\circ\text{C}$ , sedangkan untuk titik B dan C adalah  $29^\circ\text{C}$ .

#### *Uji Aktivitas Selulase Dengan Metode Filter Paper Assay*

Penggunaan substrat kertas saring ditujukan sebagai satu pendekatan substrat selulosa alami dalam uji aktivitas selulase. Kertas saring memiliki kemurnian yang hampir sama dengan selulosa dan memiliki bentuk

struktur kombinasi antara kristal dan amorf selulosa, namun kelarutannya lebih rendah dibandingkan CMC (Zhang *et al*, 2006). Pada reaksi pengembangan warna, asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) akan tereduksi oleh produk glukosa (gula pereduksi) dan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang berwarna kuning kecoklatan, sesuai reaksi berikut (Otajewwo dan Aluyi, 2011):



Aktivitas selulase ekstraseluler yang terukur merupakan aktivitas selulase yang berasal dari kompleks selulosom yang berasal dari tanah mangrove. Dari hasil pengukuran diperoleh aktivitas selulase tertinggi berasal dari sampel tanah C (sesuai Tabel 1).

Tingginya aktivitas selulase dari titik C kemungkinan disebabkan oleh tingginya jumlah selulase atau kompleks selulase (selulosom). Kompleks selulase atau selulosom ini lebih efektif mendegradasi selulosa karena adanya kerjasama antara selulase dengan sub unit enzim-enzim lainnya seperti xilanase dan mannanase yang

mampu mendegradasi selulosa menjadi monomer glukosa (Ohmiya *et al*, 2003). Aktivitas selulase ekstraseluler dari kompleks selulosom ini dapat menjadi suatu informasi baru mengenai keunggulan selulase. Selain itu, besarnya aktivitas selulase yang dieksplorasi langsung dari lingkungannya juga bergantung pada tingkat kemurnian enzim dan jumlah enzim dalam sampel. Aktivitas selulase yang diukur langsung dari tanah, tanpa melalui proses isolasi dan pemurnian akan memiliki tingkat aktivitas yang berbeda dibandingkan dengan aktivitas selulase murni yang berasal dari isolat jamur.

### Uji Aktivitas Selulase Dengan Metode *Carboxymethyl Cellulose Assay*

Pada metode ini substrat yang digunakan adalah substrat buatan, yaitu *Carboxymethyl cellulose* (CMC), sedangkan waktu inkubasi pada metode CMC adalah 30 menit (Ghose, 1987). Menurut Zhang *et al* (2006), substrat CMC memiliki kelarutan yang lebih besar dibandingkan dengan kertas saring. Faktor tersebut memungkinkan untuk mempermudah terjadinya hidrolisis CMC secara enzimatik oleh kompleks selulase atau selulosom yang terdapat pada sampel tanah hutan mangrove tersebut. Dari hasil pengukuran diperoleh aktivitas selulase tanah hutan mangrove dari lokasi A, B dan C, seperti yang tertera pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas selulase tanah hutan mangrove titik A, B dan C dengan metode *Filter Paper Assay* (FPA)

Lokasi	Kode sampel	A <sub>540</sub>	Kadar Glukosa (mg/0,5mL)	Aktivitas Selulase (U/g tanah)	Aktivitas Selulase Rata-rata (U/g tanah)
A	A <sub>1</sub>	0,228	0,14	0,026	0,025
	A <sub>2</sub>	0,221	0,13	0,024	
B	B <sub>1</sub>	0,329	0,26	0,048	0,051
	B <sub>2</sub>	0,345	0,29	0,054	
C	C <sub>1</sub>	0,422	3,64	0,674	0,866
	C <sub>2</sub>	0,472	5,72	1,059	

Tabel 2. Hasil uji aktivitas selulase tanah hutan mangrove di titik A, B dan C dengan metode uji *Carboxymethyl Cellulose* (CMC)

Lokasi	Kode sampel	A <sub>540</sub> kontrol t = 0	A <sub>540</sub>	Kadar Glukosa (mg/mL)	Aktivitas selulase (U/g tanah)	Aktivitas Selulase Rata-rata (U/g tanah)
A	A <sub>1</sub>	0,247	0,446	0,42	0,389	0,340 ± 0,190
	A <sub>2</sub>		0,455	0,54	0,500	
	A <sub>3</sub>		0,423	0,14	0,130	
B	B <sub>1</sub>	0,256	0,487	0,94	0,559	0,699 ± 0,174
	B <sub>2</sub>		0,489	0,97	0,898	
	B <sub>3</sub>		0,468	0,69	0,639	
C	C <sub>1</sub>	0,117	0,517	4,76	4,407	4,176 ± 0,630
	C <sub>2</sub>		0,462	3,74	3,463	
	C <sub>3</sub>		0,531	5,03	4,657	

Dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa aktivitas selulase tertinggi berasal dari sampel tanah C. Tingginya aktivitas selulase tersebut berkaitan dengan banyaknya jumlah selulase atau kompleks selulase (selulosom). Namun, selulase yang diukur aktivitasnya secara langsung dari lingkungan, tanpa melalui tahap isolasi dan pemurnian akan memiliki tingkat kemurnian enzim yang lebih rendah dan kemungkinan besar ada inhibitor di tanah yang bisa mempengaruhi aktivitas selulase lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas selulase murni yang diisolasi dan dimurnikan dari jamur. Hal ini ditunjukkan dengan hasil aktivitas selulase yang diperoleh Lakshmi dan Narasimha (2010) dari isolat jamur *Aspergillus sp.* sebesar 64 U/mL dan aktivitas selulase dari isolat *Penicillium sp.* adalah 43,32 U/mL. Dengan mengasumsikan bahwa 1 g tanah sampel sama dengan 1 mL sumber enzim, maka hasil penelitian uji aktivitas selulase dari tanah A, B dan C secara berurutan, yaitu: 0,340 ± 0,190 U/mL; 0,699 ± 0,174 U/mL; 4,176 ± 0,630 U/mL. Selulase yang diisolasi oleh Lakshmi dan Narasimha (2010) dari jamur *Aspergillus sp.* ataupun *Penicillium sp.* memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas selulase yang berasal dari sampel tanah mangrove. Hal ini disebabkan oleh jumlah molekul selulase dari sampel tanah mangrove lebih sedikit dibandingkan dengan selulase yang

diisolasi dari jamur *Aspergillus sp.* dan *Penicillium sp.*

Pada umumnya enzim tanah yang aktivitasnya diukur secara langsung memiliki rentang aktivitas yang bervariasi. Hal ini tergantung pada jenis metode dan tipe tanah yang digunakan dalam pengukuran (Nannipieri *et al.*, 2002). Hal ini dapat menjadi alasan derajat keterulangan yang cukup rendah dari aktivitas selulase yang diperoleh dari penelitian ini.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan di atas, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa aktivitas selulase dapat ditentukan secara langsung dari tanah hutan mangrove pantai Suwung Bali dengan menggunakan metode *Filter Paper Assay* (FPA) dan metode *Carboxymethyl Cellulose Assay* (CMC).

### Saran

Perlu dilakukannya penelitian aktivitas selulase murni yang telah diisolasi dari tanah hutan mangrove dengan variasi suhu dan pH untuk menentukan kondisi optimum selulase yang berasal dari tanah hutan mangrove pantai Suwung Bali.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pada penelitian ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Astro Kasih-Yayasan Sampoerna Foundation yang telah mendukung biaya penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H., 1995, Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells Without Cultivation, *J. Microbiol. Rev.*, 59 : 143-69
- Ghose, 1987, Measurement Cellulase Activities, *J. Pure & Appl. Chem.*, 59 (2) : 257-268
- Gilna, V. V. and Khaleel, K. M., 2011, Cellulase Enzyme Activity of *Aspergillus fumigatus* From Mangrove Soil on Lignocellulosic Substrate, *J. Recent Research in Science and Technology*, 3 (1) : 132-134
- Handelsman, J., 2004, Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68 : 669-85
- Irwanto, 2006, *Keanekaragaman Fauna pada Habitat Mangrove*, Yogyakarta
- Lakshmi, S. A. and Narasimha, G., 2012, Production of Cellulases by Fungal Cultures Isolated from Forest Litter Soil, *Journal Annals of Forest Research*, 55 (1) : 1-8
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti T. C, Rahmania, N., dan Satria, H., 2009, Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya, *Makara Sains*, 13 (1) : 33-38
- Nannipier, P., Kandeler, E., and Ruggiero, P., 2002, Enzyme Activities and Microbiological and Biochemical Processes in Soil, Dalam: Burn, R.G. and Dick, R.P., 2002, *Enzyme In the Environmental*, Marcel Dekker Inc., USA.
- Ohmiya, K., Sakka, K., Kimura, T., and Morimoto, K., 2003, Application of Microbiology Genes To Recalcitrant Biomass Utilization and Environmental Conversation, *J. Bioscience and Bioengineering*, 95 (6) : 549-561
- Otajevwo, F. D. and Aluyi, H. S. A., 2011, Cultural Conditions Necessary for Optimal Cellulase Yield by Cellulolytic Bacterial Organisms as They Relate to Residual Sugars Released in Broth Medium, *J. Modern Applied Science*, 3 (5) : 141-151
- Schmeisser, C., Steele, H., and Streit, W. R., 2007, Metagenomics: Biotechnology with Non-Culturable Microbes, *J. Appl Microbiol Biotechnol*, 75 : 955-962
- Uchiyama, T. and Miyazaki, K., 2009, Functional Metagenomics for Enzyme Discovery: Challenges to Efficient Screening, *J. Biotech*, 20 : 616-622
- Zhang, Percival Y-H., Himmel, E. M., and Mielenz, J. R., 2006, Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, *J. Biotechnology Advances*, 24 : 452-458