

OPTIMASI SUHU DAN pH TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
ENDOGLUKANASE MENGGUNAKAN
RESPONSE SURFACE METHODOLOGY (RSM)
*Optimization of Temperature and pH on Endoglucanase Enzyme Activity Using Response
Surface Methodology (RSM)*

Ambar Kusumaningrum, Ida Bagus Wayan Gunam*, I Made Mahaputra Wijaya
PS Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Kampus Bukit
Jimbaran, Badung, Kode pos : 80361; Telp/Fax : (0361) 701801.

Diterima 21 Januari 2018 / Disetujui 18 Maret 2019

ABSTRACT

This study aims to determine the optimal temperature and pH for the growth of cellulolytic bacterial isolates to produce high cellulase enzyme activity. This study used one potential cellulolytic bacterial isolate B2S8 which had the highest cellulose degradation value and highest cellulase enzyme activity in previous studies. Carboxymethyl Cellulose (CMC) was used as a substrate on growth media and enzyme activity test. Optimization of temperature and pH on cellulase enzyme activity was done by Response Surface Methodology (RSM) by Central Composite Design (CCD). The results using Response Surface Methodology (RSM) showed that the highest endoglucanase enzyme activity was at 36.9 °C and pH 6.9 was equal to 0.0269 IU/mL.

Keywords: *cellulolytic bacteria, endoglucanase enzyme, activity, Response Surface Methodology.*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan suhu dan pH optimal pada pertumbuhan isolat bakteri selulolitik untuk menghasilkan aktivitas enzim selulase yang tinggi. Penelitian ini menggunakan satu isolat bakteri selulolitik potensial B2S8 yang memiliki nilai aktivitas enzim selulase tertinggi dan tingkat degradasi selulosa tertinggi dalam penelitian sebelumnya. Penelitian ini menggunakan Carboxymethyl Cellulose (CMC) sebagai substrat pada media pertumbuhan dan uji aktivitas enzim. Optimalisasi suhu dan pH pada aktivitas enzim selulase menggunakan Response Surface Methodology (RSM). Hasil analisis menggunakan Response Surface Methodology (RSM) dengan metode Central Composite Design (CCD) menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulase tertinggi terjadi pada suhu 36,9 °C dan pH 6,9 menghasilkan nilai aktivitas enzim endoglukanase sebesar 0.0269 IU/mL.

Kata kunci: Bakteri selulolitik, enzim endoglukanase, aktivitas, Response Surface Methodology.

*Korespondensi Penulis:
Email : ibwgunam@unud.ac.id

PENDAHULUAN

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalis untuk proses biokimia. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10⁸ sampai 10¹¹ kali lebih cepat daripada tanpa menggunakan katalis (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

Enzim dapat diproduksi oleh kelompok bakteri, kapang maupun khamir (Imas, 2009). Salah satu jenis enzim yang memiliki peranan penting dalam biokonversi limbah- limbah organik adalah enzim selulase. Mikroorganisme penghasil selulase dari kelompok bakteri menjadi pilihan utama karena memiliki pertumbuhan yang cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi selulase menjadi lebih pendek (Alam dkk, 2004). Sehingga sangat cocok untuk dilakukan produksi dan uji aktivitas enzim selulase kasar dari bakteri selulolitik yang selanjutnya dapat digunakan sebagai bahan dalam pembuatan bioetanol (Chasanah et al., 2013).

Enzim selulase adalah enzim yang mampu mendegradasi selulosa dengan produk utamanya yakni glukosa, selobiosa dan selooligosakarida. Selulase memiliki sistem enzim yang terdiri dari endo-1,4- β -glukanase, ekso-1,4- β -glukanase dan β -D-glukosidase. Ketiga enzim ini bekerja secara sinergis mendegradasi selulosa dan melepaskan gula pereduksi sebagai produk akhirnya (Kim, 2001).

Produksi enzim selulase menggunakan media Carboxymethyl Cellulose (CMC) karena dalam media ini mengandung selulosa yang digunakan sebagai substrat pada reaksi enzimatik (Meryandini et al., 2010). Carboxymethyl Cellulose (CMC) merupakan substrat terbaik untuk menginduksi sintesis enzim selolitik ekstraseluler dan konsentrasi CMC 1% merupakan konsentrasi yang optimum untuk produksi selulase (Alam et al., 2004).

Aktivitas enzim selulase dipengaruhi

oleh beberapa faktor antara lain suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim serta keberadaan inhibitor (Hames dan Hooper, 2005). Suhu dan pH merupakan faktor utama yang harus diketahui (Sari, 2008), karena setiap enzim akan berfungsi secara optimal pada suhu dan pH tertentu. Kecepatan reaksi menurun tajam di atas suhu optimal karena enzim merupakan protein yang akan terdenaturasi pada suhu tinggi (Fitriani, 2003). Disamping itu, sedikit pergeseran pH dari pH optimum juga akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi yang dikatalisis enzim (Murray et al., 2003). Hal ini disebabkan karena asam amino yang merupakan pusat aktif enzim harus berada dalam keadaan ionisasi yang tetap agar menjadi aktif, karena pada hakekatnya enzim adalah protein yang tersusun atas asam amino yang dapat melakukan ionisasi (Hames dan Hooper, 2000).

Karakterisasi enzim selulase dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu dan pH optimal pertumbuhan isolat bakteri selulolitik B2S8 dalam menghasilkan enzim selulase (endoglukanase) yaitu isolat potensial terbaik bakteri selulolitik yang telah melalui tahap uji konfirmasi enzim selulase spesifik dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Nababan (2018). Oleh karena itu, penentuan kondisi optimal utamanya yaitu suhu dan pH perlu dikaji lebih lanjut.

Proses optimisasi dilakukan dengan menggunakan metode analisis statistik yaitu Response Surface Methodology (RSM). Metode RSM merupakan sekumpulan teknik matematika dan statistika yang berguna untuk menganalisis permasalahan dimana beberapa variabel independen mempengaruhi variabel respon dan tujuan akhirnya adalah untuk mengoptimalkan respon (Montgomery, 2001). Keunggulan metode RSM ini diantaranya tidak memerlukan data-data percobaan dalam jumlah yang besar dan tidak membutuhkan waktu lama (Iriawan & Astuti, 2006). Oleh karena itu dengan adanya metode

RSM menggunakan software (Minitab17), diharapkan proses optimisasi dapat jauh lebih cepat dan akurat.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioindustri dan Lingkungan, Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Analisis Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana. Waktu pelaksanaan penelitian Juli–September 2018.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu UV-Vis Spektrofotometer (Thermo-scientific), pH meter (Schott instrumen), autoClave (Hirayama), laminar air flow (Kojair), vortex (Maxi Max II), waterbath shaker, gelas ukur (Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), termometer, pipet mikro, pipet tetes, microtube, coolbox, magnetic stirrer, hot plate, timbangan analitik, bunsen, penjepit, kapas, aluminium foil.

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini, yaitu: isolat bakteri selulolitik B2S8 yang sudah diskriming dan diranking pada penelitian sebelumnya yang merupakan hasil isolasi dari tanah hutan di Bali, K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, Yeast extract, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, akuades, buffer sodium sitrat, NaOH, Carboxymethyl Cellulose (CMC) (MERCK), reagen asam dinitro salisilat (DNS).

Rancangan Percobaan menggunakan Response Surface Methodology (RSM)

Model Response Surface Methodology (RSM) dipergunakan untuk melihat kondisi optimal suhu dan pH terhadap pertumbuhan bakteri selulolitik dalam menghasilkan enzim selulase. Variabel bebas/faktor x adalah suhu dan pH untuk menganalisa respon y (aktivitas enzim selulase). Rancangan percobaan yang digunakan adalah Central Composite Design

(CCD) dua faktor. Dari hasil CCD diperoleh nilai 1,414. Center point dari variasi suhu pada penelitian ini mengacu pada hasil terbaik dari penelitian yang dilakukan oleh Aruwajoye (2014) dan Irawati (2016) yaitu suhu optimal aktivitas ekstrak kasar selulase tertinggi pada CMCase adalah 37 °C. Penentuan pH optimal aktivitas enzim selulase mengacu pada penelitian dari Susanti (2011) dan Putri (2016) yang menyatakan bahwa pH optimal aktivitas enzim selulase adalah pada pH 7.

Penelitian ini menggunakan suhu 27,1005 °C; 30 °C; 37 °C; 44 °C dan 46,8995 °C dimana 27,1005 °C dan 46,8995 °C merupakan suhu yang dihasilkan dari perumusan menggunakan Response Surface Methodology (RSM) dengan pH 5,58579; 6; 7; 8 dan 8,41421 dimana pH 5,58 dan 8,41 merupakan pH yang dihasilkan dari perumusan menggunakan Response Surface Methodology (RSM). Jumlah unit percobaan yang diuji berdasarkan CCD dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil rancangan menggunakan CCD selanjutnya menjadi percobaan yang diperoleh sebanyak 13 unit percobaan. Data yang diperoleh dianalisis untuk memperoleh bentuk permukaan respon dan menentukan kondisi optimal percobaan menggunakan perangkat statistik minitab 17. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

Pelaksanaan Penelitian

Persiapan sampel

Sampel isolat potensial terbaik bakteri selulolitik didapatkan dari hasil uji konfirmasi enzim selulase spesifik dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Nababan (2018). Kemampuan isolat bakteri selulolitik tersebut dalam menghasilkan enzim selulase telah melalui tahap pengujian kualitatif yaitu dengan pengukuran zona bening sehingga diperlukan pengujian kuantitatif lanjutan guna untuk mengetahui

kemampuan isolat bakteri selulolitik tersebut

dalam menghasilkan enzim selulase.

Tabel 1. Optimasi suhu dan pH terhadap aktivitas enzim endoglukanase menggunakan RSM dengan metode CCD

No	Kode		Percobaan	
	X1	X2	Suhu (°C)	pH
1	-1	-1	30	6
2	+1	-1	44	6
3	-1	+1	30	8
4	+1	+1	44	8
5	-1,414	0	27,1005	7
6	+1,414	0	46,8995	7
7	0	-1,414	37	5,58579
8	0	+1,414	37	8,41421
9	0	0	37	7
10	0	0	37	7
11	0	0	37	7
12	0	0	37	7
13	0	0	37	7

Pembuatan media

Media yang digunakan adalah media cair Basic Liquid Media (BLM) yang mengandung substrat CMC (Carboxyl Methyl Cellulose) yang merupakan senyawa turunan dari selulosa yang mudah larut dalam medium dan mudah terhidrolisis (Ambriyanto, 2010) Media cair yang sudah dicampurkan akuades dengan pH 6,8–7 kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoClave dengan suhu 121 oC selama 15 menit. Media didinginkan sampai suhu 50 oC. Media harus dalam keadaan steril (tidak ditumbuhi dengan mikroba lain yang tidak diharapkan) agar kultur mikroba yang dihasilkan tidak terkontaminasi (Suriawiria, 2005).

Karakterisasi dan Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Sebanyak 5 buah Erlenmeyer yang sudah berisi 100 mL Basic Liquid Medium (BLM) dengan campuran substrat CMC (Carboxymethyl Cellulose) dengan konsentrasi 1%, dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali sehingga diperoleh sebanyak

15 unit percobaan, masing-masing diatur pada pH 6,8–7, kemudian diinokulasi dengan isolat bakteri selulolitik terpilih dengan nilai Optical Density (OD) 5 sebanyak 1 mL dan diinkubasi di dalam waterbath shaker selama 3 hari (Pandey et al., 2015) pada suhu yang bervariasi yaitu 27,10 °C; 30 °C; 37 °C; 44 °C dan 46,89 °C. Karakterisasi enzim dilakukan secara bertahap, yang pertama menentukan suhu optimal, kemudian data suhu optimal yang diperoleh digunakan pada proses karakterisasi kedua yaitu dengan variasi pH.

Sebanyak 5 buah Erlenmeyer yang sudah berisi 100 mL Basic Liquid Medium (BLM) dengan campuran substrat CMC (Carboxymethyl Cellulose) dengan konsentrasi 1%, dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali sehingga diperoleh sebanyak 15 unit percobaan, masing-masing diatur pada pH yang bervariasi yaitu 5,58; 6; 7; 8 dan 8,41 kemudian diinokulasi dengan isolat bakteri selulolitik terpilih dengan nilai Optical Density (OD) 5 sebanyak 1 mL dan diinkubasi di dalam waterbath shaker pada suhu optimal yaitu 37°C selama 3 hari (Pandey et al., 2015). Setelah inkubasi, 10

mL setiap kultur disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C dan supernatannya berfungsi sebagai enzim kasar yang digunakan untuk menentukan aktivitas enzim (Immanual et al., 2006).

Sebanyak 13 buah Erlenmeyer yang sudah berisi 100 mL Basic Liquid Medium (BLM) dengan campuran substrat CMC (Carboxymethyl Cellulose) dengan konsentrasi 1%, dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali sehingga diperoleh sebanyak 39 unit percobaan, masing-masing diatur pada pH yang bervariasi yaitu 5,58; 6; 7; 8 dan 8,41 kemudian diinokulasi dengan isolat bakteri selulolitik terpilih dengan nilai Optical Density (OD) 5 sebanyak 1 mL dan diinkubasi di dalam waterbath shaker pada suhu yang bervariasi yaitu 27,10 °C; 30 °C; 37 °C; 44 °C dan 46,89 °C selama 3 hari (Pandey et al., 2015). Setelah inkubasi, 10 mL BLM yang sudah diinkubasi bersama kultur disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C dan supernatannya merupakan enzim kasar yang digunakan untuk menentukan aktivitas enzim (Immanual et al., 2006). Rancangan dengan 13 unit percobaan ini merupakan hasil perumusan Response Surface Methodology (RSM) untuk memprediksi suhu dan pH optimal isolat B2S8 dalam menghasilkan enzim selulase yang kemudian dicocokkan dengan hasil percobaan sebelumnya sehingga didapatkan hasil yang akurat.

Penggunaan media CMC pada produksi enzim selulase kasar berfungsi sebagai substrat dan sebagai zat penginduksi (inducer) untuk menghasilkan enzim selulase kasar. Substrat CMC juga dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber karbon untuk menghasilkan glukosa (Apriani et al., 2014). Selanjutnya dilakukan uji aktivitas endoglukanase (CMCase) (Prazad et al., 2013).

Uji Aktivitas Enzim Selulase

(Endoglukanase)

Aktivitas enzim selulase (endoglukanase) diuji dengan menggunakan campuran reaksi yang mengandung 1 mL larutan enzim kasar yang sebelumnya telah disentrifugasi pada saat produksi enzim selulase kasar dari isolat terpilih dengan 1 mL larutan 1% CMC pada buffer sodium sitrat 50 mM (pH 5,0) diinkubasi pada suhu 50 °C selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 mL asam dinitrosalisilat lalu dididihkan selama 5 menit (Dar et al., 2015).

Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase

Aktivitas selulase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu Unit/mL. Satu unit merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah 1 µmol selulosa menjadi gula pereduksi per menit pada kondisi pengujian. Kadar glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa dengan enzim selulase berdasarkan nilai absorbansi pada λ 540 nm (Huang et al., 2012; Duza and Mastan 2013; Dar et al., 2015).

Konsentrasi glukosa dikonversi dalam satuan IU/mL:

$$\begin{aligned} \text{IU/mL} &= 1 \text{ } \mu\text{mol/menit glukosa yang} \\ &\quad \text{dihasilkan} \\ &= 0,18 \text{ mg/menit glukosa} \end{aligned}$$

Sehingga,

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Massa glukosa}}{\text{BMG} \times \text{Ve} \times \text{T}} \text{ } \mu\text{mol/menit ml (Unit/mL)}$$

Keterangan :

BMG = Berat Molekul Glukosa (180 g/mol)

Ve = Volume Ekstrak Kasar Enzim (mL)

T = Waktu Inkubasi (menit)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi dan Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Aulanni'am (2005) menyebutkan bahwa enzim selulase dari bakteri selulolitik termasuk kedalam golongan enzim ekstraseluler. Fungsi utama enzim ekstraseluler adalah mengubah nutrisi di

sekitar sel dan membawanya masuk ke dalam sel sebagai energi untuk pertumbuhan sel. Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan memisahkan suspensi bakteri dengan bagian supernatan sebagai enzim kasar yang sudah dikarakterisasi berdasarkan suhu dan pH sebelumnya dengan cara melakukan sentrifugasi (Aulanni'am, 2005).

CMC pada media produksi berfungsi sebagai substrat dan sekaligus sebagai zat penginduksi (inducer) untuk menghasilkan enzim selulase. Penginduksi (inducer) adalah suatu senyawa yang dibutuhkan untuk menginduksi gen agar terjadi ekspresi gen, sesuai dengan teori Jacob-Monod tentang induksi enzim. Substrat CMC juga dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber karbon untuk menghasilkan glukosa (Apriani et al., 2014). Produksi enzim pada penelitian ini menggunakan konsentrasi substrat CMC 1% berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Jennifer and Thiruneelakandan (2015).

Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Berdasarkan analisis statistik menggunakan Response Surface Methodology (RSM) suhu berpengaruh terhadap pertumbuhan isolat bakteri selulolitik B2S8 dalam menghasilkan enzim selulase.

Pengujian secara manual dilakukan untuk mencari kisaran (range) suhu optimal dan membuktikan bahwa hasil perumusan suhu optimal menurut Response Surface Methodology (RSM) memberikan hasil yang sesuai dan akurat. Berdasarkan data yang telah dihasilkan pada perlakuan sebelumnya didapatkan hasil suhu optimal dari ekstrak kasar enzim selulase isolat B2S8 adalah pada suhu 37 °C dengan aktivitas enzim sebesar $0,0203 \pm 0,0004$ IU/mL. Penelitian ini sebanding dengan penelitian Aruwajoye (2014) dengan hasil suhu optimal 37 °C menghasilkan aktivitas enzim selulase

sebesar 1,7 Unit/mL. Penelitian Irawati (2016) dengan hasil suhu optimal aktivitas ekstrak kasar selulase tertinggi pada CMC oleh *Bacillus circulans* 37 °C menghasilkan nilai aktivitas enzim selulase sebesar 0,0219 Unit/mL.

Suhu optimal merupakan suhu yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim (Poedjiadi dan Supriyanti, 1992). Suhu berpengaruh terhadap reaksi enzimatik. Peningkatan suhu secara umum akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia enzim, tetapi kenaikan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim yaitu berubahnya struktur protein enzim, sehingga menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim tersebut (Saropah dkk., 2012).

Sebagian besar enzim selulase memiliki aktivitas optimal pada rentang suhu 20 – 50 °C. Enzim yang aktif bekerja pada rentang suhu tersebut termasuk ke dalam golongan mesozim (Saropah et al., 2012). Sedangkan enzim selulase yang memiliki aktivitas optimal pada rentang suhu 50–80 °C termasuk ke dalam golongan termozim atau sering disebut dengan termostabil (tahan panas) (Meryandini dkk., 2009). Berdasarkan hal tersebut, maka enzim selulase yang dihasilkan dari isolat bakteri selulolitik B2S8 termasuk dalam golongan mesozim.

Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Pengujian aktivitas enzim selulase pada variasi pH dilakukan dengan menggunakan suhu optimal hasil perlakuan sebelumnya yaitu suhu 37 °C. Pengujian secara manual dilakukan untuk mencari kisaran (range) pH optimal dan membuktikan bahwa hasil perumusan pH optimal menurut Response Surface Methodology (RSM) memberikan hasil yang sesuai akurat.

Berdasarkan data yang telah dihasilkan pada perlakuan sebelumnya, didapatkan hasil

pH optimal dari ekstrak kasar enzim selulase isolat B2S8 adalah pada pH 7 dengan aktivitas enzim yaitu sebesar $0,0267 \pm 0,00047$ IU/mL. Penelitian ini sebanding dengan penelitian Susanti (2011) menyatakan pH optimal aktivitas ekstrak kasar selulase tertinggi pada CMC_{case} oleh *Bacillus circulans* koleksi biakan murni Laboratorium Mikrobiologi ITB dengan nilai 129,97 U/mL adalah pada pH 7. Penelitian Putri (2016) menyatakan pH optimal aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* dengan nilai 0,054 IU/mL adalah pada pH 7.

Rentang pH untuk aktivitas selulase sudah sesuai dengan kisaran pH optimal untuk aktivitas CMC_{case} yaitu pada rentang pH 4,5–7,0 (Fikrinda, 2000). Enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri bekerja maksimum pada pH mendekati netral (pH 6–7) (Rasul et al., 2015). Sari (2010) menjelaskan bahwa pada saat pH 7 (netral) sekitar 90% asam amino penyusun enzim

berada pada bentuk aktif. Hal ini menunjukkan bahwa pH optimal enzim selulase yang dihasilkan oleh isolat B2S8 optimal pada pH asam rendah sampai mendekati pH netral. Sari (2010) menambahkan bahwa kondisi pH yang terlalu asam atau terlalu basa dapat menyebabkan asam amino penyusun enzim menjadi inaktif.

Hasil Analisis Data Aktivitas Enzim Selulase Menggunakan RSM

Hasil analisis aktivitas enzim selulase terhadap perlakuan suhu dan pH dapat dilihat pada Tabel 2. Nilai aktivitas enzim yang digunakan dalam perhitungan menggunakan Response Surface Methodology (RSM) adalah nilai rata-rata dari hasil ulangnya, sedangkan pada center point yaitu pada suhu 37 °C dan pH 7 yang digunakan dalam perhitungan adalah nilai ulangan dari aktivitas enzim.

Tabel 2. Hasil analisis aktivitas enzim endoglukanase

No	Suhu (°C)	pH	Aktivitas Enzim (IU/mL)
1	30	6	0,0141
2	44	6	0,0149
3	30	8	0,0137
4	44	8	0,0132
5	27,10	7	0,0117
6	46,89	7	0,0108
7	37	5,58	0,0140
8	37	8,41	0,0132
9	37	7	0,0260
10	37	7	0,0266
11	37	7	0,0274
12	37	7	0,0268
13	37	7	0,0276

Analisis aktivitas enzim selulase mendapatkan hasil regresi dengan model persamaan regresi yaitu :

$Y = -0,495 + 0,011540\text{Suhu} + 0,08881\text{pH} - 0,000152\text{Suhu}^2 - 0,006245\text{pH}^2 - 0,000048\text{Suhu} \cdot \text{pH}$. Persamaan RSM menunjukkan bahwa perubahan pH

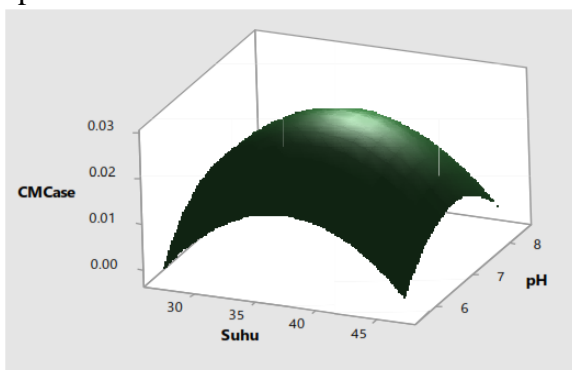
memiliki pengaruh terbesar terhadap hasil uji aktivitas enzim selulase. Pengaruh tersebut dapat dilihat dari koefisien pH yang mempunyai nilai terbesar dibandingkan suhu inkubasi. Hal tersebut mungkin terjadi karena penentuan kisaran nilai kode pH terlalu sempit sehingga perbedaan hasilnya tidak

terlalu berbeda jauh dibanding suhu inkubasi.

Perhitungan statistik menunjukkan bahwa koefisien determinasi (R^2) = 98,08%. Nilai koefisien determinasi memberikan pengertian bahwa korelasi antara suhu dan pH terhadap aktivitas enzim selulase sebesar 98,08% sedangkan sisanya sebesar 1,92% dipengaruhi oleh faktor-faktor lainnya yang tidak dapat dijelaskan oleh respon.

Hasil uji lack of fit dapat digunakan untuk menguji kecocokan model. Lack of fit data aktivitas enzim selulase memiliki nilai p-value 0,094 dimana p-value lack of fit lebih besar dari nilai α (5%) artinya model yang dibuat telah sesuai (Myers dan Montgomery, 1995). Dengan demikian, persamaan model tersebut sangat valid dan dapat untuk memprediksi respon, karena suatu persamaan RSM valid atau tidak ditentukan dari pengujian regresi data tersebut.

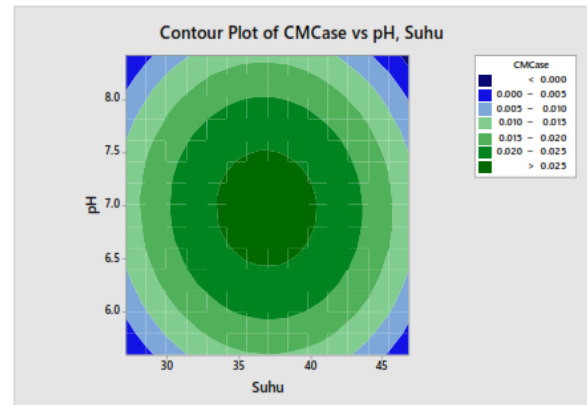
Kurva yang terbentuk pada Gambar 1 menyerupai parabola terbalik yang membentuk respon maksimum. Peningkatan aktivitas enzim selulase terjadi hingga suhu 36,9 °C dengan pH 6,9, tetapi setelah melewati suhu 36,9 °C dan pH 6,9 aktivitas enzim selulase mengalami penurunan. Peningkatan nilai aktivitas enzim selulase berbanding lurus dengan peningkatan suhu dan pH inkubasi hingga mencapai titik optimal.



Gambar 1. Grafik surface plot aktivitas enzim selulase terhadap suhu dan pH

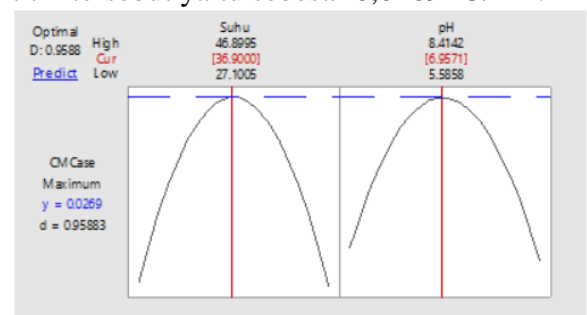
Grafik contour plot dari aktivitas enzim selulase dilihat pada Gambar 2. Perubahan warna pada grafik contour plot menunjukkan

terdapat perbedaan nilai aktivitas enzim selulase dengan kombinasi suhu dan waktu yang berbeda. Grafik contour plot berwarna hijau menunjukkan bahwa nilai aktivitas enzim selulase lebih besar dari 0,025 IU/mL, sedangkan warna biru menunjukkan nilai rendemen oleoresin kurang dari 0,000 IU/mL.



Gambar 2. Grafik contour plot aktivitas enzim selulase terhadap suhu dan pH

Berdasarkan analisis statistik menggunakan Response Surface Methodology (RSM), kondisi optimal respon yang didapatkan berdasarkan nilai optimasi terhadap aktivitas enzim selulase yang terdapat pada Gambar 3 diketahui bahwa nilai optimal suhu yaitu 36,9 °C dengan pH sebesar 6,9. Aktivitas enzim yang diprediksi pada titik tersebut yaitu sebesar 0,0269 IU/mL.



Gambar 3. Grafik D-Optimally aktivitas enzim selulase terhadap suhu dan pH

Uji Aktivitas Enzim Selulase (Enzim Endoglukanase)

Uji aktivitas enzim selulase dilakukan dengan substrat Carboxymethyl Cellulose (CMC). Aktivitas enzim selulase pada substrat Carboxymethyl Cellulose (CMC) merupakan aktivitas enzim endo- β -glukonase dengan menghidrolisis ikatan glukosidik β -1,4 secara acak terutama pada daerah amorf serat selulosa dan tidak menyerang selobiosa tapi mendegradasi selodekstrin dan selulosa yang telah dilunakkan dengan asam fosfat dan selulosa yang telah disubstitusi seperti CMC yang membentuk glukosa dan selooligosakarida. Enzim ini secara umum dikenal sebagai CMCase atau selulase Cx. Pengukuran aktivitas enzim juga dilakukan dengan metode DNS berdasarkan estimasi jumlah glukosa (gula reduksi) sebagai hasil hidrolisis selulosa (Jennifer and Thiruneelakandan, 2015). Reaksi DNS berlangsung pada suasana basa dan pada suhu tinggi atau pada air mendidih. Adanya gula reduksi pada sampel akan bereaksi dengan larutan DNS yang awalnya berwarna kuning menjadi warna jingga kemerahan. Besar kecilnya aktivitas enzim akan mempengaruhi kadar gula pereduksi yang dihasilkan (Kusmiati dan Agustini, 2010 dalam Novitasari, 2014). Semakin gelap warna DNS yang dicampurkan maka jumlah gula yang tereduksi semakin banyak (Rosyada, 2015).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kondisi suhu dan pH optimal pada pertumbuhan isolat bakteri selulolitik B2S8 untuk menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi terjadi pada suhu 36,9 °C dengan pH 6,9 sehingga dapat menghasilkan aktivitas enzim selulase (endoglukanase) sebesar 0,0269 IU/mL.

Saran

Berdasarkan penelitian yang telah

dilakukan dapat disarankan untuk melanjutkan penelitian dengan melakukan optimasi konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim selulase dari isolat bakteri selulolitik B2S8.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, M., Manchur, M., dan Anwar, M. 2004. Isolation, Purification, Characterization Of Cellulolytic Enzymes Produced by The Isolate *Streptomyces omiyaensis*. *Journal Biology Science*. 7(10): 1647-1653.
- Apriani, K., Haryani, Y., Kartika, G. 2014. Produksi dan Uji Aktivitas Selulase dari Isolat Bakteri Selulolitik Sungai Indragari. *Jom FMIPA*. 1(2): 261- 267.
- Aruwajoye, G.S. 2014. Extracellular Cellulase Production by *Bacillus circulans* Isolated from Decayed Wood. *IJARAS*. 3(2): 1 – 8.
- Aulanni'am. 2005. Protein dan Analisisnya. Malang: Citra Mentari Grup
- Chasanah, E., Dini, I. R., and Mubarik, N. R. 2013. Karakterisasi Enzim Selulase PMP0126Y dari Limbah Pengolahan Agar. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 8(2):103–113.
- Dahiya, S., Singh, N., & Rana, J. 2009. Optimization of growth parameters of phytase producing fungus using RSM. *Industrial Research*. 17(5): 955-959.
- Dali, S., Arfah, R., Karim, A., Patong, A.R. 2013. Eksplorasi Enzim Amilase dari Mikroba yang Diisolasi dari Sumber Air Panas di Sulawesi Selatan dan Aplikasinya dalam Produksi Maltodekstrin. Laporan Akhir. Makassar: Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.

- Dar, A., Pawar, K., & Jadhav, J. d. 2015. Isolation of Cellulolytic Bacteria from Gastro- intestinal Tract of *Achatina Fulica* (gastroda pulmonata) and their evaluation from cellulose buodegradation. International biodegradation and biodeterioration. 8(2): 73-80.
- Duza, M., and Mastan, S. 2013. Isolation, Characterization and screening of enzyme producing bacteria from different soil samples. International Journal Pharmacy Bioscience. 10(6): 813-824.
- Fikrinda. 2000. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Selulase Ekstermofilik dari Ekosistem Air Hitam. Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- Fitriani, E. 2003. Aktivitas Enzim Karboksimetil Selulase *Bacillus pumilus* Galur 55 pada Berbagai Suhu Inkubasi. Bogor: Kimia FMIPA IPB.
- Hames, B., and Hooper, N. 2000. BioChemistry : The Instant Notes. Hongkong: Spinger- Verlag.
- Hames, D., Hooper, N. 2005. BioChemistry. Ed ke-4. New York: Taylor and Francis Group.
- Immanual, G., Dhanusa, R., Prema, P., & Palavesam, A. 2006. Effect of different growth parameters on endoglukanase enzyme activity ny bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. Journal environment science and technology. 6(2): 25-34.
- Irawati, R. 2016. Karakterisasi pH, Suhu dan Konsentrasi Substrat pada Enzim Selulase Kasar yang Diproduksi oleh *Bacillus circulans*. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Iriawan, N., dan Astuti, S.P. 2006. Mengolah Data Statistik dengan Mudah Menggunakan Minitab 14. Yogyakarta.Penerbit ANDI.
- Jennifer, V dan Thiruneelakandan, G. 2015. Enzymatic Activity of Marine Lactobacillus Species from South East Coast of India. IJSET. 2(1): 542-546.
- Kim, K.H. and Hong, J., 2001, Supercritical CO2 Pretreatment of LignoCellulose Enhances Enzymatic Cellulose Hydrolysis, Bioresource Technol. 77(2): 139-144.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., dan Sunarti, T. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. Sains, 13(1): 33-38.
- Meryandini A., Widosari W., Maranatha B., Sunarti TC., Rachmania N., and Satria H. 2010. Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. Jurnal Sains, 13(1):33-38.
- Montgomery, DC. 2001. Design and Analysis of Experiments 5th edition. New York: John Wiley & Sons, Inc
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. 2003. Harper's Illustrated BioChemistry. Ed ke-26. San Fransisco: McGraw-Hill.
- Myers, R. H. and Montgomery, D. C. 1995. Response Surface Methodology: ProCess and Product Optimization Using Designed Experiments, New York: John Wiley & Sons.
- Pandey, S., Tiwari, R., Singh, S., Nain, L., dan Saxena, A, K. 2014. J. Microbiol. Biotechnol. 24(8): 1073-1080.
- Poedjiadi, A. 2006. Dasar-Dasar Biokimia Edisi Revisi. Jakarta: UI Press.
- Poedjiadi, A dan Supriyanti, F.M. 1992. Dasar-Dasar Biokimia. Jakarta: UI Press.
- Rasul, F., Afroz, A., Rashid, U., Mehmood,

- S., Zeeshan, N. 2015. Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacteria from Soil and Waste (Molasses) of Sugar Industry. *Int J Biosci.* 6 (3): 230-238.
- Rosyada, N. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Selulolitik pada Saluran Pencernaan Mentok (*Cairina moschata*). Skripsi. Surakarta: Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret.
- Sari, R. F. 2010. Optimasi Aktivitas Selulase Ekstraseluler dari Isolat Bakteri RF-10. Skripsi. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Saropah, D. 2012. Penentuan Kondisi Optimal Ekstrak Kasar Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul. Malang: UIN Malang.
- Suriawiria, U. 2005. Mikrobiologi Dasar. Jakarta: Penerbit Paps Sinar Sinanti.
- Susanti, E. 2011. Optimasi Produksi dan Karakterisasi Sistem Selulase dari *Bacillus circulans* strain Lokal dengan Induser Avicel. *Jurnal Ilmu Dasar.* 12(1): 40–49.
- Vijayaraghavan, P dan Vincent, S.G.P. 2012. Purification and Characterization of Carboxymethyl Celullase from *Bacillus* sp, Isolated from a Paddy Fied. *Polish Journal of Microbiology.* 16(1): 51 – 55.
- Novitasari, E. 2015. Pengaruh Suhu dan Lama Sakarifikasi Terhadap Proses Hidrolisis Bekatul Menjadi Glukosa Menggunakan Enzim Glukoamilase. Skripsi. Malang: UIN Malang.