

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR PADA LARVA *Cossus cossus* PENGHASIL SELULASE

Maswati Baharuddin^{1*}, Nurul Khaerah¹, Nurul Fadillah¹, Sappewali¹, Fitria Azis¹

¹Program Studi Kimia

Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

Jl. Sultan Alauddin No. 63, Gowa, Sulawesi Selatan, Indonesia. 92113

*E-mail: bmaswati@gmail.com

Abstrak: Larva *Cossus cossus* adalah serangga ordo Lepidoptera yang hidup di pohon menteng (*Baccaurea racemosa*) dari Desa Lejja Soppeng. Larva dapat menghasilkan selulase untuk menghidrolisis selulosa menjadi gula sederhana (glukosa) dengan memutuskan ikatan 1,4-glikosidik dalam selulosa. Selulase tekstil digunakan dalam industry detergen, makanan, dan kertas yang dapat diproduksi oleh mikroba seperti selulolitik ragi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui jenis isolat khamir dan bakteri serta aktivitas selulase simbiosis khamir larva *C. cossus*. Metode penelitian meliputi isolasi dan pemurnian khamir, identifikasi khamir dan uji aktivitas selulase yang dilakukan setengah kuantitatif (uji yodium dan uji Congo Red) serta uji kuantitatif dengan metode asam dinitrosalisilat (DNS) yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 3 isolat bakteri dan 3 isolat jamur yang bersimbiosis dengan larva *C. cossus*. Isolat dari bakteri *Acinotobacter*, *Pseudomonas* dan *Bacillus*. Isolat dari jamur diidentifikasi secara molekuler diidentifikasi isolat memiliki kesamaan DNA 94% sebagai *Paphiopedilum concolor* dan kesamaan 90% sebagai strain *Cyberlindnera jadinii*.

Kata Kunci: *Cossus cossus*; fungi; mikroba simbiosis; selulase

Abstract: Larvae *Cossus cossus* is the order Lepidoptera insects that live in the menteng tree (*Baccaurea racemosa*) from the Village Lejja Soppeng. Larvae can produce cellulase to hydrolyze cellulose into simple sugars (glucose) by deciding 1,4-glycosidic bonds in cellulose. Textile cellulase is used in industry detergents, food, and paper that can be produced by microbes such as yeast cellulolytic. The purpose of this study to determine the species of yeast and bacteria isolates and cellulase activity of the leavened symbionts of larvae *C. cossus*. Stages of the study include the isolation and purification of yeast; identification of yeasts and cellulase activity test conducted half quantitative (test iodine and test Congo Red) and quantitative test methods dinitrosalicylic acid (DNS) is measured by using a UV-Vis spectrophotometer. The results showed that there were 3 isolates from bacteria and 3 isolates from fungi which symbionts of larvae *C. cossus*. Isolates from bacteria *Acinotobacter*, *Pseudomonas* and *Bacillus*. Isolates from fungi were identified molecular identified isolates have similar DNA 94% as *Paphiopedilum concolor* and similarity of 90% as *Cyberlindnera jadinii* strain.

Keywords: cellulase; *Cossus cossus*; fungi; symbion microbes

PENDAHULUAN

Indonesia terkenal sebagai negara dengan keanekaragaman hayati terbesar di dunia yang mencakup keanekaragaman tumbuhan dan hewan. Keanekaragaman ini dapat memberikan manfaat, baik berupa barang dan jasa, maupun yang berupa nilai dalam pemanfaatan lainnya seperti dalam bidang penelitian khususnya hewan dengan kelas insekta.

Insekta (serangga) merupakan kelompok hewan dengan keragaman terbesar karena serangga mampu mempertahankan keberlangsungan hidupnya pada habitat yang bervariasi, kapasitas reproduksi yang tinggi, kemampuan memakan jenis makanan yang berbeda serta kemampuan menyelamatkan diri dari musuhnya (Amirullah, 2014). Salah satu insekta yang memiliki jenis terbanyak adalah ngengat yang tergolong dalam ordo Lepidoptera (serangga bersayap sisik). Jenis ngengat yang mudah ditemukan di kawasan sumber air panas adalah ngengat kambing (*Cossus cossus*).

C. cossus merupakan hewan kelas insekta yang banyak hidup di pohon dan dapat menghasilkan selulase karena serat kayu pada pohon sebagian besar terdiri atas komponen lignoselulase. Serangga ini memakan batang dan cabang dari berbagai pohon dan dibutuhkan waktu sekitar tiga atau empat tahun untuk menjadi dewasa. *C. cossus* memiliki mikroba yang berperan dalam proses penguraian, berupa bakteri, protozoa yang terdapat pada saluran pencernaan larva atau khamir yang terdapat pada sarangnya. (Purwadaria, 2003).

Khamir merupakan kelompok mikroorganisme yang termasuk filum Fungi (Noverita, 2009) yang memegang peranan penting dalam hidrolisis senyawa polisakarida (selulosa) yang berada di dalam tanah. (Kanti, 2003) yang terdapat pada sarang. (Purwadaria, 2003). Khamir memiliki bermacam-macam jenis yang dapat diidentifikasi baik secara makroskopis maupun molekuler. Identifikasi makroskopis meliputi warna balik, warna koloni, dan tekstur koloni (Yuniar, 2013). Identifikasi molekuler dapat digunakan untuk mengidentifikasi khamir hingga tingkat spesies menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan analisis *sequence* DNA (Ediningsari, 2008). Khamir memiliki sifat selulolitik yang dapat menghasilkan selulase.

Selulase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis selulosa menjadi gula sederhana atau glukosa dengan memutuskan ikatan glikosidik β -1,4 dalam selulosa. Aktivitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan satu mikromol gula reduksi (glukosa) setiap menit (Syam, 2008). Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui spesies yang dihasilkan isolat khamir dan aktivitas selulase dari khamir yang bersimbiosis dengan larva *Cossus cossus*.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel larva *Cossus cossus* yang berasal dari kawasan permandian air panas Lejja. Prosedur kerja pada penelitian ini terdiri atas beberapa tahap.

a. Preparasi Sampel

Sampel larva *C. cossus* ditambahkan NaCl fisiologis kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* hingga menghasilkan pengenceran 10^{-3} . Suspensi larva *C. cossus* dan dimasukkan ke dalam cawan petri. Isolasi jamur menggunakan media PDA yang mengandung streptomisin dan untuk isolasi bakteri menggunakan media *Nutrient*

agar yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-5 hari. Khamir yang tumbuh kemudian dimurnikan pada medium PDA dengan metode *streak kuadran* dari setiap koloni yang tumbuh. Streptomisin berfungsi mencegah tumbuhnya bakteri pada media PDA.

b. Pemurnian Khamir

Pemurnian koloni menggunakan media yang sama yaitu media PDA. Pemurnian dilakukan dengan mengambil sebanyak satu ose koloni yang memiliki karakter berbeda baik dari bentuk, warna, maupun morfologinya, selanjutnya diinokulasikan pada media PDA miring yang baru sebagai stok isolat dan disimpan pada suhu 37°C.

c. Identifikasi Khamir

Identifikasi khamir meliputi identifikasi makroskopis dan molekuler.

1. Identifikasi makroskopis

Identifikasi isolat khamir terpilih secara makroskopis dengan diinokulasikan sebanyak satu ose koloni khamir dengan aktivitas terbaik pada media PDA yang baru secara aseptis. Tahap selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 48 jam dan diamati struktur makroskopisnya meliputi bentuk koloni, warna koloni, warna balik koloni.

2. Identifikasi molekuler

Identifikasi molekuler terdiri atas beberapa tahapan yaitu meliputi tahap ekstraksi DNA, PCR, dan elektroforesis.

a) Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan memasukkan tripsin ke dalam *microcentrifuge* sebanyak 1,5 mL dan sampel isolat diambil dengan menggunakan ose dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 300 rpm. Supernatan dibuang dan residu sel ditambahkan dengan 200 µL PBS, 20 µL Proteinase K lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan residu sel ditambah 200 µL GBS *Buffer*, dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 2 menit dan ditambahkan 5 µL RNase (50 mg/mL). Campuran tersebut divortex serta diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar untuk memastikan efisien degradasi RNA. Supernatan dibuang dan residu sel ditambah dengan 200 µL etanol kemudian divortex selama 10 detik. Jika endapan muncul pindahkan ke dalam *microcup* 2 mL (termasuk endapan larutan) kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Sampel ditambahkan dengan 600 µL *buffer wash* dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. Supernatan dibuang dan residu sel ditambahkan dengan 100 µL larutan standar elusi kemudian sampel dipindahkan ke dalam *microcup*. *Buffer* elusi (10 mM tris-HCl, pH 8,5 pada 25°C) ditambahkan sebanyak 1,5 mL. *Buffer* TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ditambahkan untuk elusi yang bermanfaat sebagai EDTA untuk mempertahankan DNA agar tahan dalam jangka panjang. Sampel didiamkan selama 3 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik untuk mengelusi DNA dimurnikan (10 mM tris-HCl, pH 8,5 pada 25°C).

b) *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Tahap pertama pembuatan PCR *mix* sebanyak 25 µl volume total yang terdiri atas 1 µL DNA sampel dengan konsentrasi 25-50 ng µL; 10 x *buffer* 5 µL; 25 mM MgCl₂ 2 µL; dNTP 10 mM 1 µL; pasangan primer ITS1 (5' TCCGTAGG TGAACCTGCGG 3') dan ITS4 (5' TCCTCC GCTTATTGATATGC 3') masing-masing 1 µL; enzim *hotstar* 0,25 µL; DNA 5 µL; dan ddH₂O 34,75 µL. PCR *mix* yang telah dibuat dimasukkan ke dalam tabung PCR. Amplifikasi dilakukan dengan denaturasi awal selama 5 menit pada

suhu 94°C, selanjutnya sebanyak 35 siklus melalui tiga tahapan meliputi denaturasi selama 1 menit pada 94°C, penempelan primer (*annealing*) selama 1 menit pada suhu 55°C, sintesis selama 2 menit pada suhu 72°C, dan pada tahap akhir ditambah 10 menit pada suhu 72°C.

c) Elektroforesis

Analisis DNA hasil amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dalam bufer *Tris Boric EDTA* (TBE 0.5x) dan visualisasi menggunakan sinar UV.

d. Uji Aktivitas Selulase

Uji aktivitas selulase terdiri atas beberapa pengujian yaitu uji semikuantitatif penghasil selulase dan uji kuantitatif khamir penghasil selulase.

1) Uji semikuantitatif penghasil selulase

a) Metode *Congo red*

Hasil isolasi khamir inokulasikan ke dalam dalam media CMC *plate* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari. Pengujian mikroba penghasil selulase dengan uji *Congo red* dengan cara meneteskan *Congo red* pada permukaan media yang berisi isolat. Bila terdapat zona bening mengindikasikan selulase diproduksi oleh isolat sehingga di daerah tersebut selulosa sudah dihidrolisis sedangkan yang belum terhidrolisis berwarna ungu.

b) Metode Gram Iodin

Hasil isolasi khamir diinokulasikan ke dalam media CMC *plate* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari. Pengujian aktivitas selulolitik dengan menambahkan Gram Iodin. Koloni khamir yang mampu menguraikan CMC ditunjukkan dengan kemampuannya membentuk zona bening di sekeliling koloni setelah diuji dengan Gram Iodin selama 3-5 menit. Perbedaan warna media yang mencolok antara bagian yang terhidrolisis dan tidak terhidrolisis setelah penambahan Gram Iodin pada media dikarenakan Gram Iodin menghasilkan kompleks berwarna hitam kebiruan yang bereaksi dengan selulosa (polisakarida) sehingga zona bening terlihat lebih jelas.

2) Uji kuantitatif khamir penghasil selulase

a) *Pretreatment* serbuk jerami padi

Jerami padi dijemur selama 2 hari dan dipotong kecil-kecil selanjutnya dioven selama 4 jam pada suhu 60°C. Sampel jerami padi digerus dan selanjutnya diayak menggunakan ayakan 100 mesh sehingga diperoleh serbuk jerami padi dengan ukuran 100 µm. Serbuk jerami padi sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan dengan natrium hidroksida (NaOH) 0,5 N sebanyak 100 mL lalu dioven selama 24 jam pada suhu 80°C selanjutnya disaring. Serbuk jerami padi dibilas dengan akuades hingga pH netral (diuji dengan kertas lakmus), dikeringkan dengan oven selama 2 jam pada suhu 105°C, digerus dan diayak dengan ayakan 100 mesh. Hasil yang diperoleh dari perlakuan ini adalah serbuk selulosa.

b) Produksi selulase

Produksi selulase dimulai dengan mencampurkan 5 gram bubuk jerami dengan 25 mL larutan nutrisi di dalam erlenmeyer 250 mL dan ditutup dengan kapas steril serta dilapisi aluminium foil, kertas, dan diikat dengan benang. Campuran substrat dan media kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Media kemudian didinginkan hingga suhu ruang sebelum proses inokulasi mikroba yang dilakukan secara aseptik. Spora yang tumbuh di dalam satu tabung reaksi disuspensikan ke dalam 1 mL larutan 0,1% *tween 80* kemudian diinokulasikan secara aseptik ke dalam

media. Hasil dari proses tersebut kemudian diinkubasi selama 4, 5, 6, 7 dan 8 hari pada suhu 37°C dengan pH pada media cair sebesar 3.

c) Pemanenan enzim

Pemanenan enzim dilakukan dengan sistem sentrifugasi menggunakan *sentrifuge*. Enzim di dalam erlenmeyer terlebih dahulu dicampur dengan 10 mL larutan *tween 80*. 1%. Sentrifugasi dilakukan selama 30 menit dengan kecepatan 4.000 rpm pada suhu 4°C. Cairan enzim (supernatan) yang dihasilkan kemudian disaring dengan kertas saring agar terpisah dengan residu padatan.

d) Uji aktivitas selulase (*FP-ase*)

Aktivitas enzim diuji menggunakan metode *CMCase* dalam satuan *International Unit* (IU) dengan reagen *Dinitrosalicylic Acid* (DNS). Suasana alkali gula pereduksi akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat membentuk senyawa yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.

1. Pembuatan kurva standar glukosa

Satu (1) mL larutan standar glukosa (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1) dan 1 mL akuades sebagai kontrol dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya sebanyak 1 mL reagen DNS ditambahkan ke dalam larutan standar glukosa dan dihomogenkan selanjutnya dipanaskan selama 5 menit dan didinginkan. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis.

2. Uji aktivitas selulase (*FP-ase*) pada sampel

Satu (1) mL sampel (supernatan) dan 1 mL aquadest sebagai kontrol dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 1 mL reagen DNS pada ditambahkan pada larutan enzim tersebut dan dihomogenkan. Tabung reaksi yang berisi sampel dipanaskan selama 5 menit dan didinginkan. Larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan pada kurva standar untuk mengetahui konsentrasi produk glukosa pada sampel. Satu unit aktivitas selulase dinyatakan sebagai jumlah μmol produk glukosa hasil hidrolisis selulase tiap satu hari pada kondisi pengujian. Nilai aktivitas selulase ditentukan berdasarkan perhitungan sebagai berikut:

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

Keterangan:

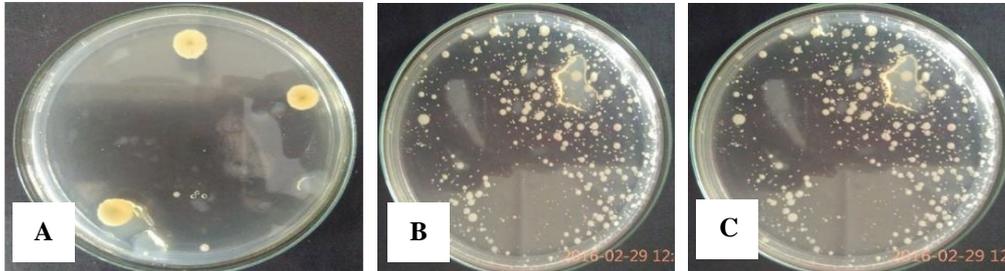
[glukosa]	= kadar glukosa (mg/mL)
BM	= berat molekul glukosa
VE	= volume enzim
t	= waktu inkubasi

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, sampel yang telah diperoleh yaitu larva *Cossus cossus* (CCL), serbuk pohon menteng (CCP) dan Cairan pertahanan diri (CCS) dibuat inokulasi suspensi menggunakan pengenceran bertingkat hingga 10^{-3} . Pengenceran ini dilakukan untuk mengurangi jumlah mikroorganisme yang terdapat pada sampel. Inokulasi suspensi dilakukan dengan memasukkan sampel ke dalam tabung reaksi dan diencerkan dengan garam fisiologis (NaCl 0,85%) yang berfungsi sebagai penyangga pH agar sel mikroorganisme yang terdapat pada sampel tidak rusak akibat menurunnya pH lingkungan.

Hasil suspensi diisolasi ke dalam media *Potato Dextro Agar* (PDA) yang sebelumnya ditambahkan streptomisin 0,001 % untuk mencegah pertumbuhan bakteri pada media PDA. Hasil isolasi pada media PDA hari ke 3, diperoleh isolat CCL, CCP

dan CCS. Isolat CCL terdapat 3 bulatan-bulatan besar pada cawan petri yang berwarna hijau kekuningan, pada isolat CCP terdapat bulatan-bulatan kecil di dalam cawan petri yang berwarna putih sedangkan isolat CCS terdapat satu bulatan besar berwarna hijau kekuningan (Gambar 1).



Gambar 1. Pertumbuhan isolat khamir hari ke-3 pada pada sampel larva *Cossus cossus* (CCL) (A); serbuk pohon menteng (CCP) (B); dan cairan pertahanan diri (CCS) (C)

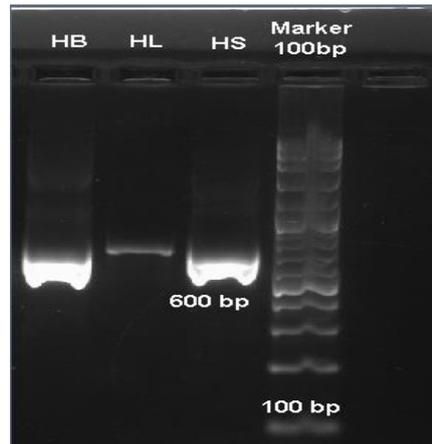
Hasil ketiga isolat tersebut kemudian dimurnikan dengan mengambil koloni khamir menggunakan ose dan diinokulasikan pada media media *Patato Dextro Agar* (PDA) yang terdapat di cawan petri dan tabung reaksi sebagai stok selanjutnya. Proses ini dilakukan untuk memisahkan atau memindahkan khamir tertentu dari lingkungan, sehingga diperoleh kultur murni atau biakan murni.

Isolat yang diperoleh pada penelitian ini dilanjutkan dengan identifikasi yang terdiri atas identifikasi makroskopis dan molekuler. Identifikasi makroskopis dilakukan selama 5 hari dengan pengamatan warna koloni, tekstur koloni dan warna balik koloni pada 3 isolat. Pada isolat CCL memiliki kesamaan dengan isolat CCS dimana hasil pengamatan hari pertama sampai ke lima dengan warna koloni yang dihasilkan berturut-turut adalah putih, kuning, hijau kekuningan, hijau dan hijau tua kekuningan dengan tekstur koloni permukaannya kasar dan pada warna balik cawan petri isolat CCL pada hari pertama berwarna putih sedangkan pada hari kedua sampai hari kelima berwarna kuning.

Isolat CCL dan CCS diduga adalah *Aspergillus* sp. Menurut Samson et al. (Noverita, 2009), koloni *Aspergillus* sp. pada saat muda berwarna putih, dan akan berubah menjadi berwarna hijau kekuningan setelah membentuk konidia. Kepala konidia berwarna hijau kekuningan hingga hijau tua kekuningan, berbentuk bulat, konidiofor berdinding kasar, hialin. Hasil pengamatan isolat CCP yang dilakukan selama 5 hari, dengan warna koloni dan warna balik koloni berwarna putih dengan tekstur koloni licin. Isolat ini diduga *Candida* sp. Menurut Lodder (Noverita, 2009), pertumbuhan *Candida* sp. pada media umumnya berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung, halus, licin dan kadang-kadang sedikit berlipat-lipat terutama pada koloni yang telah tua. Secara makroskopis *Candida* sp. berwarna putih kekuningan, dengan permukaan yang halus.

Isolat juga dilakukan identifikasi molekuler menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang merupakan metode secara akurat sehingga diperoleh susunan dari taksonomi hingga spesiesnya. Keberhasilan isolasi DNA diketahui melalui elektroforesis gel agarosa. Gel agarosa di bawah sinar UV akan memperlihatkan adanya pita-pita DNA yang menandakan bahwa DNA telah berhasil diisolasi. Isolasi DNA merupakan tahap awal dalam identifikasi molekuler. Keberhasilan isolasi DNA sangat memengaruhi kualitas DNA yang diperoleh. Pita DNA hasil isolasi yang diperoleh tidak berupa pita tunggal, melainkan berbentuk noda memanjang. Pita DNA yang berbentuk noda memanjang pada gel elektroforesis ini disebut *smear* yang disebabkan karena polisakarida yang dihasilkan oleh fungi tersebut ikut terekstraksi saat isolasi DNA dilakukan (Rahayu, 2015).

Isolat DNA fungi dari larva *C. cossus* berhasil diamplifikasi pada daerah ITS1 dan rDNA menggunakan pasangan primer ITS4. Keberhasilan amplifikasi diketahui dengan adanya pita-pita DNA pada gel agarosa setelah dilakukan elektroforesis. Hal ini sesuai dengan hasil amplifikasi yang diperoleh, yaitu berat molekul DNA hasil amplifikasi PCR adalah sebesar 600 pb (Gambar 2), terlihat pita DNA yang diperoleh berupa pita tunggal. Hal ini menandakan bahwa DNA hasil amplifikasi sudah cukup murni yang memiliki pita DNA berukuran 600 bp dari hasil amplifikasi dari 3 isolat. Urutan pita DNA tersebut sesuai dengan yang diharapkan dari ketiga isolat dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut karena hasil perunutan yang baik.



Gambar 2. Hasil elektroforesis amplifikasi DNA

Hasil BLAST urutan fragmen isolat yaitu dari 2 isolat dapat diidentifikasi jenisnya. Isolat CCP memiliki kesamaan DNA dengan persentase kemiripan 90% yaitu *Cyberlindnera jadinii* strain. *C. jadinii* strain juga dikenal dengan nama *C. utilis* (Environment Canada, 2015) yang merupakan genus *Candida* dengan jenis khamir. Isolat CCL diidentifikasi sebagai *Paphiopedilum concolor* dengan persentase kemiripan DNA sebesar 94 %.

Pada penelitian ini juga dilakukan uji aktivitas selulase yang terdiri atas uji semikuantitatif khamir selulase dan uji kuantitatif khamir penghasil selulase. Uji semikuantitatif pada isolat bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas enzim selulolitik dari isolat. Uji semikuantitatif yang digunakan adalah melalui uji iodin dan pewarnaan dengan menggunakan *Congo red* 0,1%. Uji ini dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media agar yang mengandung karbosilmetil selulosa (CMC) kompleks dan diinkubasi selama 7 hari serta dilakukan pengamatan zona bening tiap harinya. Karbosilmetil selulosa (CMC) merupakan suatu polimer anionik yang umum digunakan pada pengujian aktivitas enzim. Enzim pendegradasi CMC akan ditahan pada permukaan dinding sel atau dilepaskan ke luar sel dan membuat selulase yang disekresikan akan berdifusi ke dalam permukaan media agar. Selulase merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat ekstraseluler yang menyebabkan enzim tersebut akan disekresikan dalam media tumbuh isolate (Hasanah, 2015).

Tahap pewarnaan dilakukan dalam media agar CMC dan pewarna *Congo red* akan mendeteksi zona yang mampu dihidrolisis oleh selulase. Prinsip pewarnaan ini adalah zat pewarna akan berdifusi ke dalam media agar dan hanya akan diabsorpsi oleh rantai panjang polisakarida yang memiliki ikatan β -D-glukan. Media yang kelebihan *Congo red* dibilas dengan larutan garam NaCl 1% sebagai pencuci. Pencucian dengan larutan NaCl akan membuat zona hasil hidrolisis selulase akan tampak lebih jelas. Uji kualitatif

terhadap 3 isolat yaitu CCL, CCP, dan CCS yang diisolasi dari larva *Cossus cossus* menunjukkan bahwa pada hari 1 dan ke 2 ke 3 isolat ini belum menghidrolisis selulase atau tidak menghasilkan zona bening dan pada hari ke 3 sampai dengan hari ke 7 hanya isolat CCP yang menghidrolisis selulase dengan terbentuknya zona bening sedangkan pada isolat CCL hanya hari ke 5 yang mempunyai zona bening. Zona bening menunjukkan zona tempat terputusnya ikatan β -1,4-glikosidik yang menghubungkan monomer D-glukosa pada CMC. Isolat yang memiliki zona bening merupakan isolat yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi selulosa (Hasanah, 2015).

Tiga isolat yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan hanya 2 isolat yang memiliki potensi selulase untuk menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik pada CMC. Selulase yang digunakan untuk proses hidrolisis ini bersifat ekstraseluler. Sifat enzim ekstraseluler terlihat dari zona bening yang terbentuk di sekitar koloni. *Congo red* berinteraksi kuat dengan ikatan β -1,4-glikosidik. Metode ini dipilih karena proses seleksi dapat berlangsung cepat, mudah, dan sensitif. Pewarnaan dengan *Congo red* dapat menentukan mikroba selulolitik dalam konsentrasi selulosa yang rendah pada substrat dan dapat mempersingkat waktu inkubasi. Berbagai jenis selulase diperlukan dalam mendegradasi sempurna struktur selulosa yang kompleks (Hasanah, 2015).

Uji kuantitatif dilakukan untuk mengetahui aktivitas selulase. Uji ini dilakukan dengan membuat selulosa menggunakan jerami padi dengan metode delignifikasi. Perlakuan delignifikasi substrat jerami padi dengan menggunakan Natrium hidroksida 0,5 N dapat memberikan aktivitas enzim endoglukanase tertinggi. Hal ini disebabkan semakin tinggi konsentrasi larutan NaOH, kemampuan untuk melarutkan lignin dan merusak struktur selulosa akan semakin bertambah, yang mengakibatkan serat-serat selulosa akan semakin longgar sehingga semakin mudah dihidrolisis oleh mikroorganisme baik untuk pertumbuhannya maupun untuk produksi selulase (Gunam, 2011).

Serbuk selulosa yang telah dibuat kemudian ditambahkan dengan isolat CCP dan CCL dengan waktu fermentasi selama 8 hari untuk mengetahui aktivitas selulase yang dihasilkan. Pengujian diukur berdasarkan jumlah gula pereduksi menggunakan metode asam dinitrosalisilat (DNS) dan glukosa sebagai kurva standar. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan menambahkan *tween 80*. *Tween 80* digolongkan dalam surfaktan anionik dimana bagian alkilnya tidak bermuatan. Penggunaan *tween 80* dimaksudkan sebagai surfaktan sehingga dapat mempersatukan campuran yang terdiri dari air dan minyak pada hasil fermentasi. Hasil reduksi gula pada hidrolisis selulosa menggunakan enzim selulase dari mikroorganisme dengan surfaktan *tween 80* meningkat 2x lipat karena surfaktan *tween 80* mampu menaikkan stabilitas enzim dan mencegah penguraian enzim selama hidrolisis, memengaruhi struktur substrat dan membuatnya dapat lebih dijangkau oleh enzim. Sehingga mempengaruhi interaksi antara enzim dan substrat. Selanjutnya, pengukuran aktivitas enzim menggunakan metode asam dinitrosalisilat (DNS) yang didasarkan pada jumlah gula pereduksi sebagai hasil hidrolisis selulase. Pada proses degradasi selulosa menjadi glukosa, enzim endo-1,4- β -glukanase, ekso-1,4- β -glukanase, dan β -glukosidase bekerja secara sinergis (Hasanah, 2015).

Konsentrasi gula pereduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa. Kurva standar yang diperoleh memiliki persamaan $y = 0,9253x - 0,0753$ dengan nilai R^2 sebesar 0.9797. Konsentrasi gula pereduksi digunakan untuk menghitung aktivitas enzim. Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah mikromol glukosa yang dihasilkan oleh satu mL enzim setiap menit. Hasil uji kuantitatif isolat dengan variasi waktu fermentasi yang memiliki nilai aktivitas selulase pada hari ke-4 isolat CCL yaitu sebesar 0,18460

mU/mL sedangkan isolat CCP nilai aktivitas selulase 0,29427 mU/mL. Nilai aktivitas isolat CCL dan CCP pada hari ke-5 adalah 0,11226 mU/mL dan 0,42901 mU/mL. Pada hari ke-6, nilai aktivitas selulase isolat CCL 0,14628 mU/mL dan CCP 0,54816 mU/mL. Sedangkan pada hari ke-7 memiliki nilai aktivitas selulase tertinggi. Isolat CCL yaitu sebesar 0,21142 mU/mL dan isolat CCP sebesar 0,63596 mU/mL. Pada hari ke-8 mengalami penurunan nilai aktivitas selulase isolat CCL yaitu 0,12099 mU/mL dan isolat CCP sebesar 0,52064 mU/mL.

Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa waktu fermentasi juga memengaruhi aktivitas selulase. Waktu fermentasi terbaik dalam menghasilkan selulase dengan aktivitas enzim yang tertinggi adalah 7 hari. Aktivitas selulase akan semakin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi. Peningkatan aktivitas selulase yang terjadi pada hari ke-4 hingga hari ke-8 menunjukkan bahwa terjadi interaksi antara selulase dengan selulosa yang tinggi. Interaksi antara selulase dengan selulosa akan membentuk kompleks enzim-substrat yang menghasilkan glukosa sebagai produk. Penurunan aktivitas selulase yang terjadi pada hari ke-8 hingga hari ke-10 menunjukkan bahwa interaksi antara selulase dengan selulosa mulai menurun. Hal ini disebabkan oleh akumulasi produk yang terbentuk pada hari sebelumnya menyebabkan penghambatan bagi selulase. Produk dari hidrolisis selulosa dapat menjadi inhibitor bagi aktivitas selulase.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa isolat khamir yang bersimbion dengan larva *Cossus cossus* adalah spesies *Paphiopedilum concolor* dari isolat CCL dan *Cyberlindnera jadinii strain* yang juga dikenal dengan nama *Candida Utilis* dari isolat CCP. Nilai aktivitas selulase dari khamir yang bersimbion dengan larva *C. cossus* yang tertinggi terjadi pada hari ke-7 dengan nilai aktivitas sebesar 0,21142 mU/ dari isolat CCL dan 0,63596 mU/mL dari isolat CCP.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada tim peneliti Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Sains & Teknologi, UIN Alauddin Makassar. Penelitian ini didukung dan disponsori oleh UIN Alauddin Makassar melalui dana BOPTN.

DAFTAR PUSTAKA

- Amirullah, A., Ariani, C., & Suriana, S. (2014). Keanekaragaman Kumbang *Cerambycidae* (Coleoptera) di Kawasan Gunung Mekonggan Desa Tinukari Kecamatan Wawo Kabupaten Kolaka Utara Provinsi Sulawesi Tenggara. *Jurnal Biowallacea*, 1(1).
- Ediningsari, A. R. (2008). Identifikasi Khamir Dari Perairan Mangrove dan Laut Cagar Alam Pulau Rambut berdasarkan Daerah Internal *Transcribed Spacer* (ITS). *Skripsi*. Depok: Universitas Indonesia.
- Environment Canada, Health Canada. (2015). *Draft Screening Assessment for Candida Utilis ATCC 9950*. Canada: Environment Canada, Health Canada.
- Gunam, I. B. W., Buda, K., & Guna, I. M. Y. S. (2010). Pengaruh Perlakuan Delignifikasi dengan Larutan NaOH dan Konsentrasi Substrat Jerami Padi terhadap Produksi Selulase dari *Aspergillus niger* NRRL A-II, 264. *Jurnal Biologi*, 14(1), 55-61.
- Hasanah, N., & Saskiawan, I. (2015). Aktifitas Selulase Isolat Jamur dari Limbah Media Tanah Jamur Merang. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 1(5), 1110-1115.
- Kanti, A., & Sudiana, I. M. (2003). Aktifitas CMC-ase Khamir *Candida* sp. yang Diisolasi dari Tanah Kebun Biologi Wamena, Papua. *Berita Biologi*, 6(5), 655-660.
- Noverita, N. (2009). Identifikasi Kapang dan Khamir Penyebab Penyakit Manusia pada Sumber Air Minum Penduduk pada Sungai Ciliwung dan Sumber Air Sekitarnya. *Vis Vitalis*, 2(2), 12-22.

- Purwadaria, T., Marbun, P. A., Sinurat, A. P., Ketaren, P. P. (2003). Perbandingan Aktivitas Selulase Dari Bakteri dan Kapang Hasil Isolasi Dari Rayap. *Balai Penelitian Ternak*, 8(4), 213-219.
- Rahayu, F., Saryono, S., & Nugrho, T. T. (2015). Isolasi DNA dan Amplifikasi PCR Daerah ITS rDNA Fungi Endofit Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*) LBKURCC69. *Jurnal JOM MIPA*, 2(1), 100-106.
- Syam, K. A. (2008). Optimasi Produksi dan Aktivitas Enzim Selulase dari Mikroba Selulolitik Asal Rayap. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Yuniar, W. (2013). Skrining dan Identifikasi Kapang Selulolitik pada Proses Vermikomposting Tondan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.