

SKRINING BAKTERI SELULOLITIK ASAL TANAH KEBUN PISANG (*Musa paradisiaca*)

Meli Astriani

Dosen Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Muhammadiyah Palembang, Jl. Jenderal A. Yani 13 Ulu, Palembang 302663 Indonesia

E-mail: meliastriani.g201@gmail.com

ABSTRACT

Cellulose is the most abundant biomass in nature. Utilization of organic wastes can be improved by changing the cellulose from wastes into products which have the economic value with the help of cellulolytic bacteria. Cellulolytic bacteria are bacteria that have the ability to produce cellulase. Cellulase can degrade cellulose as the substrate. The aim of this study were to obtain cellulolytic bacteria, and to provide an information about the test of cellulolytic bacterial activity. Stages of this study are as follows: isolation and purification, morphological and physiological characterization of cellulolytic bacteria, tests enzyme activity. Results showed that there were two types of cellulolytic bacteria which had been obtained, namely isolate A1 and A2 that were able to grow on CMC media and each isolate has the ability to form a clear zone of 1.3 and 1.25 mm, respectively. Isolate A1 belonged to genus *Pseudomonas* with enzyme activity of 1.248 unit/ml.

Keywords: *Biomass; Cellulolytic; Isolation; Screening; Pseudomonas.*

PENDAHULUAN

Selulosa merupakan biomassa yang paling berlimpah di alam. Selulase adalah enzim yang sebagian besar diproduksi oleh mikroorganisme antara lain kelompok bakteri maupun jamur. Pemanfaatan enzim selulase saat ini semakin meningkat dalam kegiatan industri makanan, kertas, detergen, dan industri pertanian. Pemanfaatan serasah yang ada di tanah masih dapat dimanfaatkan menjadi produk yang bernilai ekonomis. Kompos merupakan produk yang berasal dari dekomposisi limbah organik yang mengandung selulosa dengan bantuan enzim selulase yang dimiliki oleh bakteri selulolitik (Saraswati *et al*, 2010; Alam *et al*, 2013). Berbagai sumber limbah selulosa seperti *vermicomposting* tandan kosong kelapa sawit (Azizah, 2013) dan sampel tanah hutan yang kaya akan serasah tumbuhan dimanfaatkan oleh bakteri selulolitik dalam mendekomposisi bahan organik (Ashwani *et al*, 2014).

Beberapa spesies bakteri selulolitik dilaporkan berasal dari tanah antara lain *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Bacilli*, dan beberapa *actinomycetes* (Lederberg, 2014). *Bacillus pumilis*, *lichniformis Bacillus*, *Paenibacillus dendritiformis*, *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri hasil isolasi ampas tebu yang berpotensi sebagai bakteri selulolitik dan ethanologenic untuk menghasilkan etanol yang

berperan dalam bidang bioenergi (Chaudhary *et al*, 2015).

Serasah yang ada di tanah kebun pisang merupakan salah satu yang masih menyimpan bahan organik berupa selulosa yang banyak terdapat pada limbah pelepah pisang (Prabawati *et al*, 2008). Serasah ini diduga sebagai substrat bagi bakteri yang mempunyai enzim selulase (Meryandini *et al*, 2009). Berdasarkan informasi tersebut, penelitian ini perlu dilakukan untuk mengisolasi dan memperoleh bakteri yang berasal dari tanah kebun pisang, kemudian menyeleksi bakteri yang memiliki kemampuan penghasil enzim paling besar, serta melakukan identifikasi bakteri, selanjutnya memberikan informasi uji aktivitas bakteri selulolitik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan. Alat yang digunakan meliputi autoklaf, batang segitiga, bunsen, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, inkubator, jarum ose, kapas, mikro pipet, pipet serologis, plastik, rak, tabung reaksi, timbangan analitik. Adapun bahan yang digunakan, aquades, alkohol, bradford reagen, congo red reagen, CMC (*Carboxyl methyl cellulose*) medium, DNS reagent, larutan NaCl 0,85%, pewarna gram (kristal violet, iodium, safranin, dan alkohol 96%), medium triftopan, medium simon sitrat, medium TSIA, medium fermentasi glukosa, medium MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*), dan sampel tanah.

Tahapan penelitian ini meliputi:

1. Isolasi dan Pemurnian

Sebanyak 1 gram sampel dilarutkan ke dalam larutan NaCl 0,85%, kemudian dihomogenkan dengan vortex. Suspensi diambil sebanyak 1 ml lalu dilakukan pengenceran bertingkat, pengenceran terakhir (10^{-5} dan 10^{-6}) diambil suspensi sebanyak 0,1 ml dimasukkan pada cawan yang berisi Medium CMC (*Carboxyl methyl cellulose*) padat lalu ditebar dengan menggunakan batang segitiga, diinkubasi selama 2 hari sampai ditemukan koloni bakteri yang tumbuh. Tahap berikutnya adalah penghitungan koloni bakteri yang tumbuh. Setelah itu, dibuat replika plating dengan cara koloni bakteri yang tumbuh dipindahkan secara aseptis pada dua cawan yang berisi medium CMC padat. Replika plating dilakukan terus-menerus sampai didapatkan koloni murni, jika pada replika plating menunjukkan koloni yang telah murni, selanjutnya digores dengan teknik kuadran secara aseptis pada dua cawan petri dan diinkubasi selama 2 hari.

2. Karakterisasi Morfologi dan Fisiologi Bakteri

a. Pembentukan Zona Bening

Satu cawan petri yang terdapat koloni tunggal ditambahkan 1 ml larutan *Congo Red* (0,1 % w/v) sampai merata dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Kemudian dicuci dengan larutan NaCl 2 M sebanyak dua kali. Diamati dan diukur zona bening yang terbentuk. Indeks aktivitas selulolitik dapat diukur dengan menggunakan persamaan sebagai berikut (Kasana *et al*, 2008)

$$I = \frac{D_{\text{zona bening}} - D_{\text{koloni}}}{D_{\text{koloni}}}$$

b. Pewarnaan Gram

Sebanyak satu ose isolat bakteri yang berumur 24 jam diratakan pada kaca objek, kemudian difiksasi diatas bunsen, ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit lalu dibilas dengan aquades, dikeringkan, ditetesi dengan larutan iodium selama 2 menit lalu dibilas dengan aquades, dikeringkan, kemudian warna dihilangkan dengan ditetesi alkohol 95% selama 30 detik dan dibilas dengan aquades, dikeringkan, diwarnai kembali dengan safranin selama 30 detik lalu dibilas dengan aquades, dikeringkan (Hadioetomo, 1993).

c. Uji Biokimia

Isolat bakteri yang terpilih selanjutnya dilakukan karakterisasi yang meliputi uji fermentasi glukosa,

uji TSIA, fermentasi asam campuran (uji merah metil), fermentasi butanadiol (uji Voges Proskauer), uji sitrat, uji indol, hidrolisis urea, hidrolisa gelatin, hidrolisa pati, uji indol, uji sitrat, uji H₂S (Hadioetomo, 1993).

3. Pengukuran Aktivitas Enzim

a. Pembuatan Crude Enzim

Sebanyak satu ose isolat ditambahkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 40 ml CMC medium, dishaker pada inkubator bergoyang selama 3 hari.

b. Pengukuran Aktivitas Enzim Selulolitik

Dibuat empat perlakuan yaitu sampel, blanko, kontrol, dan standar. *Crude enzim* disentrifugasi 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm, lalu diambil 1 ml dan ditambahkan pada tabung sampel yang telah berisi CMC *solution* 1% pada tabung blanko hanya berisi 1 ml CMC *solution* 1%, pada tabung kontrol ditambahkan 1ml CMC *solution* 1% lalu diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 30 menit. Sedangkan, pada tabung standar ditambahkan 1 ml glukosa standar dengan konsentersasi 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml. Ditambahkan reagen DNS 2 ml pada sampel, tabung standar, blanko, dan kontrol. Untuk blanko ditambahkan 1 ml *aquades solution* dan kontrol ditambahkan 1 ml *crude enzim*. Kemudian sampel, blanko, kontrol, tabung standar diinkubasi pada suhu 100 °C selama 15 menit. Lalu di *cooling* dan diukur dan diukur masing-masing absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.

4. Variabel pengamatan

Variabel yang diamati adalah karakteristik morfologi dan fisiologis isolat bakteri, serta nilai gula pereduksi, nilai aktivitas enzim, dan kadar protein.

5. Penyajian Data

Semua data yang diperoleh disajikan dalam bentuk gambar dan tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Isolasi dan Pemurnian

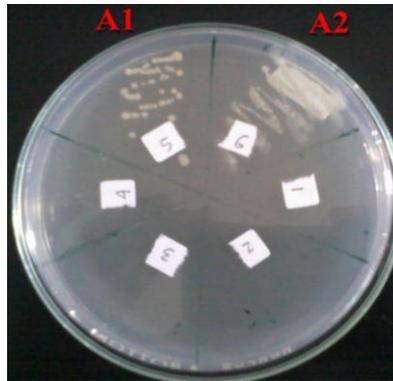
Hasil isolasi dan pemurnian bakteri selulolitik yang diisolasi dari tanah kebun pisang dilakukan pada dua pengenceran terakhir yaitu 10^{-5} dan 10^{-6} . Diperoleh jumlah bakteri yang diduga merupakan bakteri selulolitik berjumlah 6. Data ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil isolasi pada sampel tanah asal kebun pisang

Asal Sampel	Pengenceran	Jumlah Isolat
Tanah Kebun Pisang	10^{-5}	4
	10^{-6}	2
Total Jenis Bakteri		6

Koloni yang tumbuh dipindahkan pada replika *plating*. Bakteri yang mampu hidup pada media CMC lalu ditandai untuk dilakukan pemurnian pada media CMC. Diperoleh 2 isolat bakteri yang mampu hidup pada media CMC setelah ditumbuhkan dengan cara digores. Isolat tersebut adalah kode A1 dan kode A2 (Gambar 2).

Isolat bakteri dengan kode A1 mempunyai bentuk morfologi pinggiran rata, berbentuk bulat dan berwarna putih kekuningan. Isolat dengan kode A2 menunjukkan bentuk pinggiran rata namun setelah dilakukan pemurnian dengan metode kuadran bentuk dari isolat A2 motil dengan pinggiran yang melebar pada medium CMC, koloni berwarna putih kekuningan.

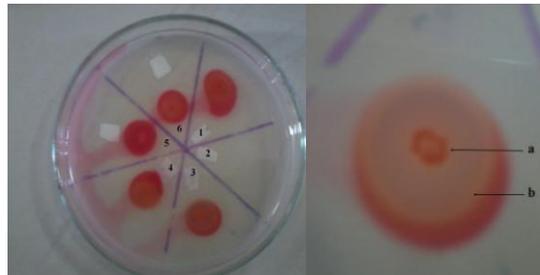


Gambar 1. Hasil pemurnian bakteri

Pembentukan Zona Bening

Bakteri selulolitik membentuk zona bening di sekeliling koloni setelah ditetaskan *Congo Red* (Gambar 2). Kemampuan bakteri dalam

menghidrolisa sululosa dinyatakan dalam bentuk indeks aktivitas selulolitik. Hal ini dengan ditunjukkan terbentuk zona bening pada isolat A1 dan A2 yaitu 1,3 dan 1,25 mm (Gambar 2).



Gambar 2. Pembentukan zona bening (a) isolat bakteri dan (b) Zona bening

Pewarnaan Gram

Isolat yang berpotensi mempunyai nilai selulolitik yang tinggi adalah isolat dengan kode A1 yang selanjutnya akan dilakukan pewarnaan Gram

untuk mengetahui jenis bakteri. Bentuk sel bakteri setelah dilakukan pewarnaan yaitu batang dan Gram negatif (Gambar 3).



Gambar 3. Pewarnaan Gram isolat A1

Uji Fisiologis

Pengujian secara fisiologis isolat A1 disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Uji Fisiologis isolat A1

No	Uji	Hasil	Keterangan
1	Indol	-	Tidak terbentuk cincin merah muda pada lapisan atas media
2	TSIA	+	Terjadi perubahan warna menjadi

3	Metil Merah	-	coklat kehitaman dan gelap Tidak terbentuk cincin merah pada media
4	Voges-Prokauer	+	Terjadi perubahan warna terdapat cincin merah pada lapisan atas media
5	Katalase	+	Terlihat adanya gelembung udara pada sekitar koloni
6	Fermentasi Gula	-	Tidak terjadi perubahan warna dan pembentukan gas pada tabung durham
7	Sitrat	-	Tidak terjadi perubahan warna hijau menjadi biru

Pengukuran Aktivitas Enzim

Hasil akhir yang diperoleh dari pengukuran aktivitas enzim selulolitik yaitu sebesar 1,248 unit/ml.

B. Pembahasan

Bakteri A1 dan A2 memiliki kemampuan tumbuh pada media CMC yang merupakan bakteri selulolitik sebagai pendegradasi selulosa. Hal ini dapat dilihat bahwa bakteri A1 dan A2 mampu tumbuh pada media CMC yang mengandung substrat selulosa murni yang berbentuk *amorphous* sehingga aktivitas enzim selulase pada substrat CMC merupakan aktivitas enzim endo-1,4- β -glukanase. Endo-1,4- β -glukanase bekerja pada rantai dalam CMC menghasilkan oligo-sakarida atau rantai selulosa yang lebih pendek (Meryandini *et al*, 2009).

Bakteri A1 dan A2 merupakan bakteri yang berasal dari tanah. Kemampuan bakteri tumbuh pada substrat selulosa sebagian besar bakteri aerob. Bakteri yang berasal dari tanah merupakan bakteri yang hidup pada kondisi aerob. Beberapa diantaranya menggunakan selulosa jika tidak ada sumber karbon, pembentukan dan ekskresi selulosa. Aktivitas enzim selulase akan dibentuk oleh mikroorganisme, apabila selulosa merupakan satu-satunya substrat. Pembentukannya dihambat oleh substrat lain maupun oleh produk pemecahan selulosa (Schlegel, 1994).

Penapisan bakteri A1 dan A2 dengan pengujian degradasi medium yang ditambahkan *congo red* menunjukkan adanya kemampuan kualitatif selulolitik isolat dengan terbentuk zona bening di sekitar koloni (Astuty, 2012). Isolat A1 membentuk zona bening lebih tinggi dibandingkan isolat A2 yaitu sebesar 1,3 mm. Dilaporkan Zahidah & Shovitri (2013) isolat *Bacillus* sp. memiliki IS sebesar 1,95 mm. Kemampuan membentuk zona bening pada media CMC menunjukkan adanya enzim endo-1,4- β -glukanase yang dapat memutuskan ikatan 1,4- β -glukosida pada serat selulosa secara acak dan banyaknya amorf pada

substrat tersebut menyebabkan CMC dapat dihidrolisis dengan lebih efisien (Goto *et al*, 1992).

Identifikasi isolat A1 ditinjau dari hasil uji fisiologis, uji fermentasi gula yang mengandung glukosa. Hasil tidak mengalami perubahan warna dan tidak terbentuk gas pada tabung durham, sehingga dikatakan negatif. (Hadiotomo, 1993). Pada Uji *Methyl red* menunjukkan hasil negatif karena tidak terbentuknya cincin merah di permukaan atas. Uji *Voges Proskauer* menunjukkan hasil positif karena terbentuk cincin merah di atas permukaan setelah ditetesi reagen A+B. Uji *Voges-Proskauer* digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang melakukan fermentasi dengan hasil akhir 2,3 butanadiol. Bila bakteri memfermentasikan karbohidrat menjadi 2,3 butanadiol sebagai produk utama, akan terjadi penumpukan bahan tersebut dalam media pertumbuhan.

Uji *Simmon's sitrat* hasilnya negatif karena tidak terjadi perubahan warna dengan indikator adanya perubahan warna medium dari hijau menjadi biru. Hal ini kemungkinan bahwa isolat tersebut tidak memproduksi enzim citrase. Indikator bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber energi (Hadiotomo, 1995).

Isolat A1 menunjukkan negatif pada uji indol. Hal ini terlihat saat dideteksi dengan penambahan reagen Kovac's ternyata tidak adanya cincin merah pada permukaan medium. Uji TSIA positif terlihat adanya perubahan warna menjadi gelap. Karakter yang teridentifikasi dari serangkaian tahap mengamati morfologi, pewarnaan gram dan dilakukan uji fisiologis ternyata isolat A1 dapat dikatakan termasuk pada genus *Pseudomonas* dengan ciri-ciri bentuk sel batang, gram negatif, positif katalase, negatif fermentasi glukosa dan uji indol, positif uji TSIA, negatif uji simmon's sitrat dan MR, positif uji *voges proskauer*. Menurut Holt *et al*. (1994) *Pseudomonas* merupakan kelompok bakteri sel batang dalam bentuk tunggal atau berkelompok. Berukuran 0,5-1,0 x 1,5-5,0 bakteri

gram negatif yang bersifat aerob, motil dengan letak flagella yang berlawanan, katalase positif, biasa ditemui pada tanah, air dan laut. Ciri genus *Pseudomonas* yaitu berbentuk sel tunggal, batang lurus, motil, gram negatif, dapat menggunakan H₂ atau CO sebagai sumber energi. Aerobik sejati, katalase positif (Pelczar & Chan, 2005).

Kemampuan Bakteri A1 dalam menghasilkan enzim selulolitik yaitu sebesar 1,248 unit/ml. Aktivitas total selulase ditentukan dengan mengukur aktivitas campuran enzim yang menghidrolisis bahan yang mengandung selulase dan menghasilkan glukosa sebagai produk akhir. Selulase merupakan suatu kompleks multienzim yang bekerja menghidrolisis selulase menjadi glukosa. Dilaporkan Pratiwi (1994) aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya jenis bakteri, waktu inkubasi, interaksi bakteri dengan jenis substrat, serta interaksi substrat dan waktu

KESIMPULAN

Didapatkan bakteri selulolitik dengan IS paling tinggi yaitu bakteri kode A1 sebesar 1,3 mm yang tergolong dalam genus *Pseudomonas* dan dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim yang diperoleh sebesar 1,248 unit/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Alam, M.S., Sarjono, P.R., Aminin, A.L.N. (2013). Isolasi dan Karakterisasi Selulase dari Bakteri Selulolitik Termofilik Kompos Pertanian Desa Bayat, Klaten, Jawa Tengah. *Jurnal Sains dan Matematika*, 21(2): 48-53.
- [2] Ashwani, K., Saida, L., Reddy, K.V. (2014). Isolation, Screening, and Characterization of Cellulolytic Bacteria from Forest Soil Sample. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(10): 679-685.
- [3] Astuty, E. (2012). Aktivitas Selulolitik dan Karakterisasi Aktinomiset Asal Tanah Gambut. *Thesis*, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- [4] Azizah, S.N. (2013). Skrining Bakteri Selulolitik Asal *Vermicomposting* Tandan Kosong Kelapa Sawit. Skripsi, Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Jember.
- [5] Chaudhary N, Qazi JI, Irfan M. (2015). Isolation and Identification of Cellulolytic and Ethanologenic Bacteria from Soil. *Iranian Journal of Science and Technology*. Articles in Press. http://ijsts.shirazu.ac.ir/article_3254.html
- [6] Goto, M., Furukuwa, K., Hasyashida, S. (1992). An Avicel-affinity Site in an Avicel digesting Exocellulase from a *Trichoderma viride* Mutant. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 56 (10): 1523-1528.
- [7] Hadioetomo, R.S. (1993). *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: PT. Gramedia.
- [8] Holt, J.G., Noel, R.K., Peter, H. A., James, T.S., Stanley, T.W. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th. New York Lippincott Williams & Wilkins.
- [9] Kasana, Salwan, Dhar, Dutt, Gulati. 2008. A Rapid dan Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol*. 57: 503-507.
- [10] Lederberg, J. (2014). *Encyclopedia of Microbiology, Four-Volume Set*. New York: Academic Press.
- [11] Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T.C., Rachmania, N., Satria, H. (2009). Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakteristik Enzimnya. *Makara Sains*, 13(1): 33-38.
- [12] Saraswati, R., Santosa, E., Yuniarti, E. (20 November 2016). Organisme Perombak Bahan Organik. <http://balittanah.litbang.deptan.go.id/pupuk10.Pdf>.
- [13] Schlegel. (1994). *Terjemahan Mikrobiologi Umum Edisi Keenam*. Yogyakarta: Gajah mada university press.
- [14] Pelczar, M.J dan Chan, E. (2005). *Dasar-Dasar Mikrobiologi. Edisi ke-5*. Jakarta: UI-Press.
- [15] Prabawati, S. Y., Wijaya, A. G. (2008). Pemanfaatan Sekam Padi dan Pelepah Pohon Pisang Sebagai Bahan Alternatif Pembuatan Kertas Berkualitas. *Jurnal Aplikasi*. 9(1): 44-56.
- [16] Pratiwi, A.E. (1994). Pemanfaatan Limbah Nanas untuk Produksi Enzim Selulase dari Beberapa Jenis Mikroorganisme. *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [17] Zahidah, D., Shovitri, M. (2013). Karakterisasi dan Potensi Bakteri Aerob sebagai Pendegradasi Limbah Organik. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(1): 2337-3520.