

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik pada Sampah Organik di TPA Suwung Denpasar

FADEL ALKAHFI*)
WAYAN ADIARTAYASA
I GEDE PUTU WIRAWAN

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman Denpasar, Bali 80232

*)Email: fadelalkahfi7798@gmail.com

ABSTRACT

Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria in Organic Waste at TPA Suwung Denpasar

Organic waste contains a lot of lignocellulosic material which can be degraded by cellulases. The degradation of cellulose requires three types of enzymes produced by microorganisms. Cellulolytic bacteria are one of the microorganisms involved in the decomposition process and produce cellulase enzymes which can degrade organic matter. This study aims to isolate and test the ability of cellulolytic bacteria in the organic waste of TPA Suwung Denpasar by isolating morphological identification, and quantitative cellulase test. The results of this study found twenty-seven (27) bacterial isolates that were able to grow on CMC media and were classified based on colony morphology and obtained 3 different isolate groups. The isolates that had been grouped were coded A, B, and C. The colony of the isolated isolates appeared to be round and wrinkled. Some surfaces are convex, raised, and hilly and are clear, yellows in color, and white. Isolates A and C were gram positive, while isolate B was gram negative. Based on the calculation results of the Cellulolytic Index value, it was found that isolate B had the highest IS and was in the high category.

Keywords: Cellulolytic Bacteria, Organic Waste, Cellulase Enzymes

1. Pendahuluan

Sampah adalah sisa kegiatan dari proses alam dan manusia yang berbentuk padat dan cair (Suyoto, 2008). Sampah merupakan salah satu pokok permasalahan yang paling banyak dihadapi seluruh kota di dunia yang terdiri dari dua jenis sampah yaitu organik dan non organik. Sampah yang dihasilkan setiap hari akan melalui beberapa proses sampai Tempat Pemrosesan Akhir (TPA). Dari kedua jenis sampah tersebut, sampah organik penyumbang terbanyak di kota Denpasar. Sampah organik contohnya adalah sampah dedaunan, limbah pertanian, kotoran hewan dan lain-lain.

Tempat Pemrosesan Akhir (TPA) Suwung yang berada di Desa Suwung Kauh, Kecamatan Denpasar Selatan, Kota Denpasar Provinsi Bali dengan luas 44 ha

merupakan salah satu penampungan sampah terbesar yang ada di Bali. TPA Suwung menampung berbagai sampah yaitu itu sampah organik sampai sampah non organik. Jumlah sampah Kota Denpasar pada Tahun 2014 adalah 1.247.796 m³, Tahun 2015 adalah 1.294.696 m³, dan Tahun 2016 adalah 1.292.558 m³. Total dari sampah yang dihasilkan oleh Kota Denpasar 70% merupakan sampah organik (Data Statistik Dinas Lingkungan Hidup dan Kebersihan Kota Denpasar, 2017).

Sampah organik mengandung banyak bahan lignoselulosa yang bisa didegradasi oleh selulase. Selulosa merupakan komponen utama dalam bahan organik yang berasal dari tumbuhan dan memiliki ikatan β -1,4glikosidik. Degradasi selulosa membutuhkan tiga tipe enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme, yaitu endoglukanase, eksoglukanase, dan β -glukosidase (Moat & Foster, 1988; Lynd *et al.*, 2002). Enzim-enzim ini memiliki fungsi yang berbeda, namun bersama-sama bekerja dalam mendegradasi selulosa menjadi monomer-monomernya. Secara alami kompos dan limbah pertanian sulit di degradasi biasanya membutuhkan waktu 4-5 bulan dan selulosa yang di kandung mencapai 15-40% (Klemm *et al.*, 2006).

Enzim selulase dapat diproduksi oleh mikroorganisme selulolitik baik kapang (fungi) ataupun bakteri. Kapang yang biasa digunakan yaitu dari jenis, *Aspergillus*, *Trichoderma*, dan *Penicillium*. Sedangkan bakteri yang dapat menghasilkan enzim selulase yaitu *Micrococcus*, *Sporosphytophaga*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Cellvibrio*, dan *Pseudomonas* (Lynd *et al.*, 2002). Bakteri selulolitik merupakan salah satu mikroorganisme yang terlibat dalam proses dekomposisi dan menghasilkan enzim selulase yang dapat mendegradasi bahan organik (Saraswati *et al.*, 2006). Lamid *et al.* (2011) mengisolasi bakteri selulolitik dari rumen sapi yaitu *Cytophaga hutchinsoi*, *Bacillus sphaericus*, *Cellvibrio mixtus*, *Cellulomonas cellulans*, , *Achidothermas cellulyticus*, *Lactobacillus acidophilus*, dan *Nitrosomonas europae*

Informasi ilmiah bakteri selulolitik diharapkan menjadi bahan acuan dalam penelitian yang berhubungan dengan bakteri selulolitik. Yusnia *et al.* (2018) telah mengisolasi 28 isolat bakteri selulolitik dari Mangrove Suwung-Denpasar. Selain, itu Hardianti *et al.* (2016) telah mengidentifikasi 10 genus bakteri selulolitik pada sampah organik kota. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan identifikasi bakteri selulolitik penghasil enzim selulase yang terdapat di TPA Suwung Denpasar.

2. Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan sejak September 2020 sampai Desember 2020. Penelitian di Laboratorium Sumber daya Genetika dan Molekuler Universitas Udayana. Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel sampah organik yang diambil secara acak pada TPA Suwung, media Carboxy Methyl Cellulase (CMC), MgSO₄, K₂HPO₄, CaCl₂, MnSO₄, NaCl, CaCl₂, dithane M-45, NaCl 1%, akuades, *congo red* 0.1%, alkohol 70% & 96%, kristal violet, amonium oksalat, iodium, kalium iodida, dan lugol. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: beaker glass, autoklaf, jarum ose, inkubator, mortar , penggaris, timbangan, pipet tetes, pipet mikro, erlenmeyer, Petridis, shaker, tabung reaksi, Laminar Air Flow , stirer, rak tabung

reaksi, kertas label, aluminium foil, hand spray, lampu spiritus, sarung tangan, tas plastik, masker, mikroskop binokuler dan cahaya.

Pengambilan sampel sampah organik dilakukan masing-masing sudut TPA Suwung (utara, selatan, pusat, barat, dan timur) secara acak dengan metode diagonal. Setiap sampel sampah organik yang telah membusuk bercampur dengan tanah pada kedalaman 0-10 cm diambil seberat 10-15 gram. Pada kedalaman 0-10 cm memiliki kandungan bahan organik terbesar yang merupakan zona perakaran oleh sebab itu mikroorganisme di dalam tanah banyak ditemukan di daerah perakaran (Rhizosphere) (Ardi, 2009).

2.1 Pembuatan Media Penumbuhan Isolat Bakteri

Media yang digunakan adalah media Carboxyl Methyl Cellulose (CMC) dengan komposisi dalam 1 liter akuades yaitu 1 g MgSO₄, 1 g MnSO₄, 1 g Dithane M-45, 10 g CMC, 1 g NaCl, 18 g Agar, 0,5 g K₂HPO₄, 1 g CaCl₂. Bahan yang telah tercampur selanjutnya disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.2 Isolasi Bakteri

Seberat 10 gram sampel sampah organik terlebih dahulu dipotong-potong dan dihaluskan menggunakan mortar. Sampel sampah dimasukkan kedalam beaker glass dan ditambahkan akuades sebanyak 90 ml kemudian di stirrer sampai homogen dan diamkan sampai terjadi endapan (Ekawati *et al.*, 2012). Pengenceran dilakukan secara bertingkat dari 10⁻¹ sampai dengan pengenceran 10⁻⁸. Sampel pada pengenceran 10⁻⁶ sampai 10⁻⁸ masing-masing diambil sebanyak 0,1 ml diinokulasikan pada media selulolitik dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 72jam (Dar *et al.*, 2015).

2.3 Uji Bakteri Selulolitik Secara Kuantitatif

Seleksi isolat bakteri selulolitik dilakukan sesuai metode Azizah *et al.* (2014) yang dimodifikasi. Isolat bakteri stok diinokulasi menggunakan metode titik ke media CMC dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 25°C. Seleksi dilakukan dengan mengukur indeks selulolitik dari luas zona bening yang terbentuk menggunakan pewarna *congo red*. Setelah inkubasi, pewarna *congo red* 0.1% dituang ke dalam media CMC hingga menutupi seluruh permukaannya dan didiamkan selama 15 menit. Bilas menggunakan NaCl 1% dan hasil dari pewarnaan akan terlihat. Diameter zona bening dan koloni yang terbentuk diukur triplo menggunakan penggaris. Secara kualitatif, semakin besar enzim yang dihasilkan oleh koloni bakteri selulolitik berbanding lurus dengan zona bening yang dihasilkan. Klasifikasi daya degradasi selulosa berdasarkan nilai indeks selulolitik dengan ≤ 1 termasuk kategori rendah, 1-2 termasuk kategori sedang dan ≥ 2 termasuk kategori tinggi (Choi *et al.*, 2005). Nilai indeks selulolitik (IS) dapat diperoleh dengan rumus (Kasana *et al.* 2008):

$$\text{Indeks Selulolitik} = \frac{DB-DK}{DK} \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan :

DB = Diameter zona bening

DK = Diameter koloni (mm)

2.4 Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan gram dengan meneteskan akuades pada kaca preparat ditambahkan 1 ose sampel bakteri. Kemudian teteskan pewarnaan kristal violet dan biarkan selama 1 menit, cuci dengan akuades, teteskan mordant (lugol) biarkan selama 1 menit dan bilas kembali dengan akuades. Selanjutnya tetesi alkohol 96% biarkan selama 10 detik, cuci dengan akuades dan teteskan safranin biarkan selama 1 menit kemudian cuci lagi dengan air mengalir. Keringkan dengan menggunakan kertas tisu dan tambahkan minyak emersi dan amati di bawah mikroskop cahaya. Pengamatan preparat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 kali, 400 kali, hingga 1000 kali. Hasil pewarnaan yang diperoleh bakteri berwarna biru keunguan maka bakteri tersebut adalah bakteri gram positif, apabila diperoleh sel bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah gram negatif.

2.5 Analisis Data

Analisis data dari bakteri selulolitik dilakukan dengan melihat daya degradasi dari isolat dengan mengukur luas area zona bening, morfologi koloni bakteri yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk Tabel dan Gambar.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Isolasi Bakteri Selulolitik Pada Media CMC

Hasil pengamatan setiap hari, isolat bakteri tumbuh setelah 3 x 24 jam. Hasil isolat bakteri yang tumbuh pada media CMC dengan pengenceran yaitu Pada pengenceran 10⁻⁸ didapatkan 27 koloni yang terdiri dari 8 koloni berwarna putih, 12 koloni berwarna bening, dan 7 koloni berwarna kekuningan. Koloni yang diambil untuk di isolasi adalah pengenceran 10⁻⁸ (Tabel 1).

Tabel 1. Morfologi Koloni Isolat Bakteri A, B, & C

Isolat		Morfologi Koloni Bakteri			
Kode	Jumlah	Warna	Bentuk	Permukaan	Tepi
A	7	Kekuningan	Bundar	Cembung	Licin
B	12	Bening	Keriput	Berbukit-bukit	Berombak
C	8	Putih	Bundar	Timbul	Seperti wol

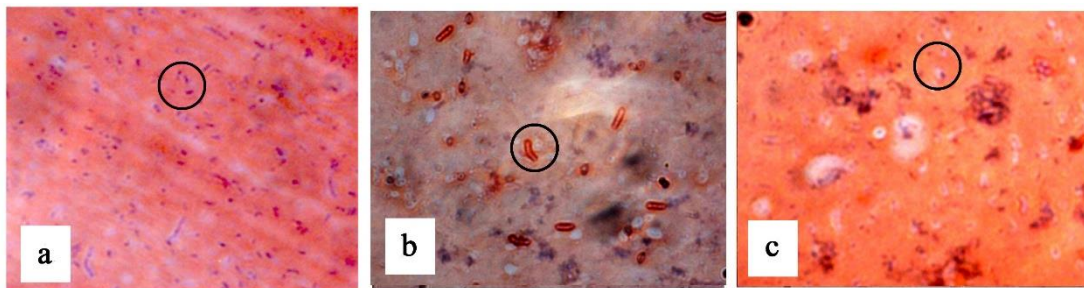
Keterangan : karakterisasi berdasarkan klasifikasi Hadioetomo (1993)

Pengamatan secara makroskopis meliputi warna, tepian, bentuk, dan elevasi atau permukaan koloni bakteri. Permukaan koloni dapat dilihat dari samping, dan tepi koloni dapat dilihat dari atas cawan (Hadioetomo, 1993). Isolat A memiliki bentuk koloni bundar dengan permukaan cembung dan tepi yang licin. Isolat B memiliki

bentuk koloni keriput dengan permukaan berbukit-bukit dan tepi yang bergelombang. Isolat C memiliki bentuk koloni bundar dengan permukaan timbul dan tepi yang seperti wol. Berdasarkan keseragaman warna didapatkan 3 isolat bakteri. Isolat tersebut masing-masing diberi kode A, B, dan C.

3.2 Pewarnaan Gram Bakteri Selulolitik

Hasil pengamatan yang telah dilakukan dengan perbesaran mikroskop 1000 kali didapatkan isolat A dan C memiliki gram positif yang semula berwarna kekuningan dan putih berubah menjadi biru keunguan. Isolat B memiliki gram negatif yang semula berwarna bening berubah menjadi warna kemerahan. Adapun bentuk sel bakteri isolat A dan B berbentuk batang atau basil. Serta isolat C memiliki bentuk bulat atau kokus (gambar 1).

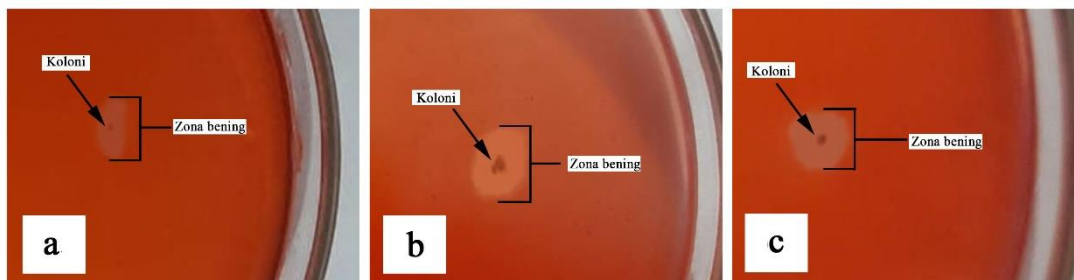


Gambar 1. Hasil Pewarnaan Gram Isolat. Isolat A gram positif (a) isolat B gram negatif (b) dan isolat C gram positif (c)

Menurut Hadioetomo (1993) disebabkan bahwa dinding sel bakteri Gram positif mengandung 10% asam tekoat dan 90% peptidoglikan. Penyebab dari sel berwarna biru keunguan karena sel bakteri membentuk ikatan kompleks dengan Kristal violet sebagai pewarna utama yaitu ungu. Hal ini disebabkan sel Gram negatif memiliki peptidoglikan 5-20%, sisanya adalah polisakarida. Dengan melarutkan lipid pada membran luar porositas dinding sel bakteri dapat meningkat dengan pemberian alkohol 96%, sehingga sel menjadi tidak berwarna karena kompleks ungu akan terlepas. Sedangkan sel berwarna merah disebabkan warna pembeding dari safranin.

3.3 Uji Isolat Bakteri Penghasil Selulase Secara Kuantitatif

Uji bakteri penghasil selulase menggunakan isolat bakteri A, B, & C yang telah dimurnikan. Pengukuran aktivitas enzim selulase yang dihasilkan dilakukan pada ketiga isolat dengan cara mengukur diameter zona bening yang dihasilkan. Pengukuran dilakukan dengan menambahkan larutan *congo red* 0.1% pada media dengan cara ditetaskan. Setelah 24 x 2 jam akan terlihat koloni dikelilingi zona bening (Gambar 2).



Gambar 2. Zona bening koloni bakteri dari media yang mengandung *congo red*. Zona bening isolat A (a), zona bening isolat (b), dan zona bening isolat C (c)

Pengukuran aktivitas enzim selulase secara kuantitatif dilakukan pada ketiga isolat dengan cara menghitung indeks zona bening yang dihasilkan. Isolat bakteri A memiliki nilai indeks selulolitik (IS) sebesar 1,4. Isolat B memiliki nilai IS 2,5. Isolat C memiliki nilai IS 2,3 (Tabel 2). Puspawati (2018), berhasil mengisolasi bakteri dari Sampah organik Kota Denpasar dengan lebar zona bening 16,5 mm dengan IS 7,3. Penelitian yang dilakukan Yusnia (2018) mengisolasi bakteri dari mangrove Denpasar menghasilkan zona bening paling tinggi 9,9 mm dengan IS 3,1.

Tabel 2. Hasil pengujian dan pengukuran zona bening isolat bakteri A, B, & C

Kode Isolat Bakteri	Diameter Koloni Bakteri (mm)	Diameter Zona Bening (mm)	Indeks Selulolitik	Ket.
A	2	4,7	1,4	Sedang
B	1,2	4,3	2,5	Tinggi
C	2,3	7,6	2,3	Tinggi

Keterangan : Tiga isolat yang menunjukkan zona bening pada uji kualitatif menggunakan *congo red*. Suhu inkubasi 25°C selama 2 x 24 jam.

Hasil pengukuran zona bening Zhang *et al.* (2006) menjelaskan bahwa prinsip pewarnaan dari larutan *congo red* 0,1% adalah zat pewarna yang akan berdifusi terhadap media agar dan hanya akan di absorpsi oleh rantai panjang polisakarida yang memiliki ikatan β -Dglukan yang dihasilkan dari aktivitas selulolitik. Semakin besar zona bening yang dihasilkan maka akan semakin tinggi tingkat kelarutan suatu enzim (Zverlova *et al.*, 2003). Penyebab indeks selulolitik dapat disebabkan oleh bakteri selulolitik yang diisolasi dan setiap bakteri mempunyai mekanisme yang berbeda. Besar hasil akhir yang diperoleh pada proses degradasi tergantung kepada beberapa faktor yaitu pH, akses terhadap karbon (kecocokan konformasi enzim dengan substrat), reaksi redoks yang terjadi, dan konsentrasi produk (Ambriyanto, 2010). Berdasarkan hasil indeks selulolitik yang didapatkan bahwa semua isolat memiliki klasifikasi indeks selulolitik yang tinggi. Semua isolat memiliki potensi menghasilkan enzim selulase.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka dapat ditarik kesimpulan yaitu jumlah koloni yang tumbuh pada media CMC didapatkan 27 koloni dan dikelompokkan menjadi tiga isolat yaitu A, B, & C. Jenis dari ketiga isolat bakteri dengan ciri: Kelompok A koloni berbentuk bundar berwarna kekuningan, gram positif, sel berbentuk batang, dan nilai Indeks Selulolitik (IS) 1,4 dengan kategori sedang. Kelompok B koloni berbentuk keriput, berwarna bening, gram negatif, sel berbentuk batang, dan nilai IS 2,5 dengan kategori tinggi. Kelompok C koloni berbentuk bundar, berwarna putih, gram positif, sel berbentuk bulat, dan nilai IS 2,3 dengan kategori tinggi.

Daftar Pustaka

- Ambriyanto, 2010. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Aerob Pendegradasi Selulosa Dari Serasah Daun Rumput Gajah (*Pennisetum purpureum* Schaum). Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Ardi, R. 2009. Kajian Aktivitas Mikroorganisme Tanah pada Berbagai Kelerengan dan Kedalaman Hutan Alam. Skripsi. Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Azizah, S. N., K. Muzakhar dan S. Arimurti. 2014. Skrining Bakteri Selulolitik Asal Vermicomposting Tandan Kosong Kelapa Sawit. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember (UNEJ). II (1): 26- 30.
- Dar, M. A., K. D. Pawar, J. P. Jadhav, dan R. S. Pandit. 2015. Isolation of Cellulolytic Bacteria from the Gastrointestinal Tract of *Achatina Fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and their Evaluation for Cellulose Biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 98: 73–80.
- Data Statistik Dinas Lingkungan Hidup dan Kebersihan Kota Denpasar. 2017. Lampiran Rekapitulasi Volume Sampah Kota Denpasar Tahun 2015, 2016, dan 2017.
- Hadioetomo, R. S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek (teknik dan prosedur dasar laboratorium). Jakarta (ID): PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Hardianti, N. S. Irda., dan Yustina. 2016. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Pada Sampah Organik Pasar Kota Pekanbaru Dan Potensinya Sebagai Rancangan Lembar Kerja Siswa (LKS) Biologi SMA. Universitas Riau.
- Kasana, R.C., R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt and A. Gulati. 2008. A rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Curr. Micro- biol.* 57:503-507.
- Klemm, D., D. Schumann, F. Kramer, N. Heßler, M. Hornung, H. P. Schmauder and S. Marsch. 2006. Nanocelluloses as Innovative Polymers in Research and Application. *Adv Polym Sci. Springer Berlin Heidelberg*. 205. 49-96.
- Lamid. M, T. P. Nugroho, S. Chusniati, K. Rochiman. 2011. Eksplorasi bakteri selulolitik asal cairan rumen sapi potong sebagai bahan inokulum limbah pertanian. *J Ilmiah Kedokteran Hewan* 4(1): 37-42.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, V. H. Vanzyl and I. J. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamental and biotechnology. *Microbiol Rev* 66: 506- 517.

- Moat, A. G., and J. W. Foster. 1988. *Microbial Physiology*. 4nd ed. John Wiley & Sons Inc. Toronto.
- Puspawati, N. M. I. 2018. "Eksplorasi Bakteri Selulolitik dari Sampah Organik Kota Denpasar" dalam *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika* Vol. 7. Denpasar: Universitas Udayana.
- Saraswati, R., E. Santosa, E. Yuniarti. 2006. *Organisme perombak bahan organik*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian Vol. 221-230. Bogor
- Suyoto, B. 2008. *Rumah Tangga Peduli Lingkungan*. Prima Media, Jakarta.
- Yusnia, E. D. 2018. Isolasi Dan Skrining Bakteri Selulolitik Dari Beberapa Tanah Hutan Di Bali. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri Universitas Udayana* 7(1):11-20.
- Zhang, Y., M. Himmel, and J. Mielenz. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selecton strategis. *Biotechnology advances*, 24(5): 452-481.
- Zverlova, V .V., W. Holl., and H. Schwarz. 2003. Enzymes for digestion of cellulose and other polysaccharides in the gut of longhorn beetle larvae, *Rhagium inquisitor* L. (Col.,Cerambycidae). *International biodeterioration & biodegradation*.