

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik pada Sampah Upacara Agama di Pura Goa Lawah Klungkung

NI MADE ADHYA NIDIDHYA SANI^{*)}
WAYAN ADIARTAYASA
I GEDE PUTU WIRAWAN

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman Denpasar, Bali 80232
^{*)}Email: adhyasani10@gmail.com

ABSTRACT

Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria in Religious Ceremony Waste at Goa Lawah Temple Klungkung

Cellulolytic bacteria are bacteria that can hydrolyze cellulose complexes into smaller oligosaccharides and finally glucose. Cellulolytic bacteria synthesize a set of enzymes that can hydrolyze cellulose called cellulase enzymes. This study aims to isolate and identify cellulolytic bacteria that have the potential to degrade cellulose by taking organic waste samples from TPS Pura Goa Lawah Klungkung. Characterization was carried out by growing selected pure isolates on CMC media and then *dripping with congoed* 0.1% to test their cellulolytic potential. The results of bacterial isolation at 10dilution⁻⁸ obtained 28 bacterial isolates that were able to grow and utilize cellulose as a carbon source. From the isolation results obtained The 4 bacterial isolates each had different morphological characters capable of producing clear zones with a diameter of 10 mm: 5 mm respectively; 3 mm and 4 mm. The results of the isolation of bacterial colonies appeared to be round and irregular in shape, had clear and cream colors, had a convex and flat surface and all isolates had smooth edges. Type C bacterial isolates included gram-negative groups, bacterial isolates A, B and D included gram-positive groups and all bacterial isolates A, B, C and D were rod-shaped. The degradation ability based on the cellulolytic index value of bacterial isolate A was in the highest category compared to bacterial isolates B, C and D.

Keywords: Organic Waste, Cellulose and Cellulolytic Bacteria

1. Pendahuluan

Sampah merupakan salah satu permasalahan yang banyak dihadapi oleh beberapa kota diseluruh dunia. Volume sampah di Bali mengalami peningkatan yang berasal dari sampah industri dan sampah rumah tangga. Peningkatan volume sampah di Bali pada tahun 2015 sampai 2017 berturut-turut sebanyak 10.266,40; 12.892 dan

13.351,13 m³/hari (Statistik Dinas Lingkungan Hidup dan Kebersihan Kota Denpasar, 2017). Berdasarkan hasil pengamatan penumpukan sampah tersebut didapatkan lebih dari 90% adalah sampah organik.

Menurut Saha (2004), sampah organik mengandung bahan lignoselulosa yang terdiri dari tiga polimer yaitu 35-50% selulosa, 20-35% hemiselulosa dan 10-25% lignin. Tidak semua mikroorganisme dapat mendegradasi selulosa, yang dapat melakukannya adalah mikroorganisme yang menghasilkan enzim selulose yaitu bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik adalah bakteri yang mampu menghidrolisis selulosa kompleks menjadi oligosakarida yang lebih sederhana menjadi glukosa. Bakteri selulolitik menggunakan glukosa sebagai sumber nutrisi dan karbon (Schwarz, 2001).

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang dapat menghidrolisis kompleks selulosa menjadi oligosakarida yang lebih kecil dan akhirnya menjadi glukosa. Glukosa tersebut digunakan sebagai sumber nutrisi dan karbon bagi pertumbuhan organisme ini. Bakteri selulolitik memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi enzim menjadi lebih cepat. Menurut Reanida (2012), bahwa daun yang gugur diatas tanah atau pembusukan daun ditempat pembuangan akhir memungkinkan kandungan selulosa tanah tinggi, maka besar kemungkinan untuk dapat menemukan bakteri pendegradasi selulosa dalam tanah yang tertimbun sampah. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri selulolitik pada tempat pembuangan sampah upacara agama di Pura Goa Lawah Klungkung.

2. Bahan dan Metode

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan pada tempat pembuangan sampah di Pura Goa Lawah, Kecamatan Dawan, Kabupaten Klungkung. Isolasi bakteri selulolitik dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai dengan bulan November 2020.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spatula, plastik, cawan petri, mikro pipet, corong, shaker, inkubator, autoklaf, hot plate, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, slide, rak slide, penjepit slide, gelas ukur, bunsen, jarum ose, mortar, pinset, objek glass, mikroskop, pipet tetes, pipet mikro, timbangan digital, vortex mixer, microtube, magnetic stirer, sendok pipih, kertas label, penggerus, *Laminar Air Flow Cabinet*, rak tabung reaksi, aluminium foil, *hand spray*, nyala api lampuspiritus, sarung tangan, masker, mikroskop.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu sampel sampah canang, janur kelapa, media Carboxy Methyl Cellulose (CMC), akuades, K₂HPO₄, CaCl₂, MgSO₄, MnSO₄, dithane M-45, agar, glukosa, alkohol 70%, Reagen Congo Red

0,1%, larutan Natrium Klorida (NaCl), aquades, nystatin, kristal violet, Amonium Oksalat, Kalium Iodida, Lugol, Alkohol 95%, safranin, minyak imersi.

2.3 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara acak dengan mengambil sampah upacara agama yang telah membusuk dan tercampur dengan tanah. Sampel diambil sebanyak 10 g kemudian dicampurkan di masing-masing titik pengambilan. Sampel dimasukkan ke dalam plastik serta diusahakan tidak terpapar sinar matahari dan diletakkan didalam kulkas.

2.4 Pembuatan Media CMC

Media *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dibuat dalam 100 ml akuades sebanyak 1 g CMC; 0,05 g K_2HPO_4 ; 0,075 gram KNO_3 ; 0,004 g $CaCl_2$; 0,02 g $MgSO_4$; 1,5 g agar; 0,1 g glukosa. Bahan yang telah homogen disterilisasi menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu $121^\circ C$.

2.5 Isolasi Bakteri

Sampel diambil sebanyak 10 g dan dihaluskan terlebih dahulu, diencerkan ke dalam 90 ml aquades steril. Pengenceran dilakukan secara bertingkat hingga diperoleh pengenceran 10^{-8} . Suspensi sampel pada pengenceran 10^{-6} sampai 10^{-8} masing-masing diambil sebanyak 0,1 ml diinokulasikan pada media selulolitik (Dar *et al.*, 2015). Inokulasi menggunakan metode sebar dengan cara koloni bakteri diambil secara aseptis sebanyak 0,1 ml ditumbuhkan pada media agar CMC. Kemudian diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 48 jam.

2.6 Pengamatan Morfologi Koloni dan Pemurnian Bakteri

Pemurnian bakteri dilakukan dengan mengambil koloni yang tumbuh terpisah dengan cara menginokulasikan isolat pada media tumbuh baru dengan metode garis kuadran sehingga diperoleh koloni tunggal. Inkubasi dilakukan pada suhu $37^\circ C$ selama 48 jam.

Pewarnaan gram bakteri dilakukan dengan mengambil 1 ose isolat bakteri ditambahkan pada objek kaca yang telah diisi aquades, dilebarkan dengan cara melingkar dan dilakukan fiksasi bakterinya. Kemudian tambahkan 3-5 tetes kristal violet dan diamkan selama 1 menit. Kemudian dibilas dengan aquades, selanjutnya tambahkan lugol dan diamkan setelah 1 menit dicuci kembali menggunakan aquades. Selanjutnya alirkan alkohol pada cetakan slide selama 5 detik dan bilas aquades. Setelah itu warnai dengan safranin sebanyak 2-3 tetes selama 1 menit kemudian bilas menggunakan aquades dan keringkan. Kemudian lihat bentuk karakter sel bakteri dengan menggunakan mikroskop pembesaran 1000X.

2.7 Seleksi Bakteri Selulolitik

Pengujian aktivitas selulolitik dilakukan dengan metode *Congo Red*. Sebanyak 0,1 g *Congo red* dilarutkan dengan 100 ml akuades. Congo red dituang pada kultur dan dibiarkan selama 15 menit, kemudian dibilas menggunakan NaCl 1% dilakukan sebanyak tiga kali. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam agar zona bening terlihat dengan jelas. Indeks selulolitik atau aktivitas selulase diperoleh dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Kader dan Oman 1998):

$$\text{Indeks Selulolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening (mm)} - \text{Diameter koloni (mm)}}{\text{Diameter koloni}}$$

2.8 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan mengukur diameter zona bening, morfologi koloni bakteri selulolitik dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk Tabel dan Gambar.

3. Hasil Dan Pembahasan

3.1 Isolasi Bakteri Pada Media CMC

Hasil pengamatan koloni bakteri setelah diinkubasi selama 48 jam pada pengenceran 10^{-8} diperoleh koloni isolat bakteri sebanyak 28 koloni yang tumbuh pada media CMC. Berdasarkan perbedaan karakter morfologis dikelompokkan menjadi 4 kelompok. Kelompok pertama terdiri dari 4 koloni isolat bakteri dengan ciri-ciri: bentuk bulat, memiliki permukaan cembung, warna bening. Kelompok kedua terdiri dari 7 koloni isolat bakteri dengan ciri-ciri: bentuk bulat, permukaan cembung memiliki warna krem, memiliki tepi licin. Kelompok ketiga terdiri dari 8 koloni isolat bakteri dengan ciri-ciri: bentuk tak beraturan, memiliki permukaan rata, warna bening, memiliki tepi licin. Kelompok keempat terdiri dari 9 koloni isolat bakteri dengan ciri-ciri: bentuk tak beraturan, permukaan cembung, memiliki warna krem memiliki tepi licin (Tabel 1)

Tabel 1. Morfologi Koloni Bakteri Pada Media CMC

| Isolat | | Morfologi Koloni Bakteri | | | |
|--------|--------|--------------------------|---------------|-----------|-------|
| Kode | Jumlah | Warna | Bentuk | Permukaan | Tepi |
| A | 4 | Bening | Bulat | Cembung | Licin |
| B | 7 | Krem | Bulat | Cembung | Licin |
| C | 8 | Bening | Tak Beraturan | Rata | Licin |
| D | 9 | Krem | Tak Beraturan | Cembung | Licin |

Keterangan : Karakterisasi berdasarkan Hadioetomo (1993)

Menurut Hadioetomo (1993), karakterisasi morfologi koloni bakteri meliputi bentuk koloni (dilihat dari atas), permukaan koloni (dilihat dari samping), tepi koloni (dilihat dari atas) dan warna koloni bakteri. Penelitian Gunam, dkk (2019) tentang

isolasi bakteri selulolitik pendegradasi selulosa dari kompos didapatkan 38 isolat bakteri yang mampu tumbuh pada medium selulolitik padat yang mengandung CMC. Kemampuan bakteri selulolitik yang tumbuh pada media agar sepesifik, menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu memanfaatkan selulosa sebagai salah satu sumber *nutrient* terutama sebagai sumber karbon Begum *et al.*, (2013).

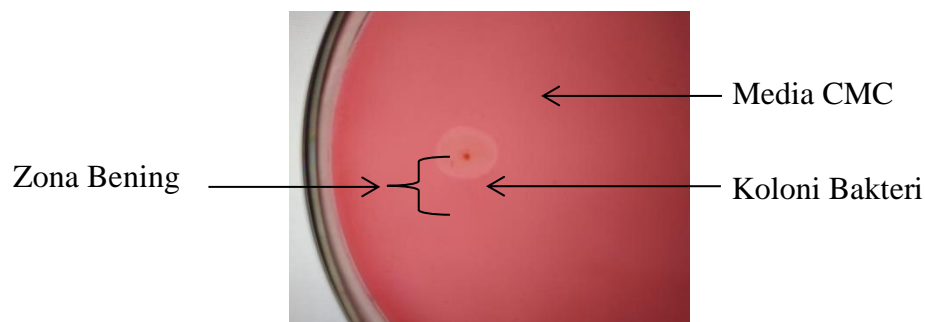
3.2 Uji Penghasil Selulase Secara Kuantitatif

Hasil uji selulase secara kuantitatif menunjukkan isolat bakteri A, B, C dan D memiliki diameter koloni secara berturut-turut sebesar 3; 2; 1 dan 1,5 mm dengan diameter zona bening secara berturut-turut sebesar 10; 5; 3 dan 4 mm. Hasil nilai indeks selulolitik isolat bakteri A, B, C dan D sebesar 2,3; 1,5; 2; dan 1,6 (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Pengujian dan Pengukuran Zona Bening Bakteri Selulolitik Sampel Pura Goa Lawah Secara Kuantitatif

| Kode Isolat Bakteri | Diameter Koloni Bakteri (mm) | Diameter Zona Bening (mm) | Indeks Selulolitik |
|---------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------|
| A | 3 | 10 | 2,3 |
| B | 2 | 5 | 1,5 |
| C | 1 | 3 | 2 |
| D | 1,5 | 4 | 1,6 |

Daya degradasi selulosa diklasifikasikan berdasarkan nilai indeks selulolitik dengan kategori rendah apabila nilai IS ≤ 1 , sedang apabila nilai IS antara 1 sampai 2 dan tinggi apabila nilai IS ≥ 2 (Choi, 2005). Secara kuantitatif semakin besar nilai indeks selulolitik maka semakin besar enzim yang telah dihasilkan oleh bakteri. Maka berdasarkan klasifikasi nilai IS dalam mendegradasi selulosa isolat bakteri A memiliki kategori tinggi, isolat bakteri B, C dan D memiliki kategori sedang. Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan. Zona bening disekitar koloni bakteri dapat dilihat pada Gambar 1.

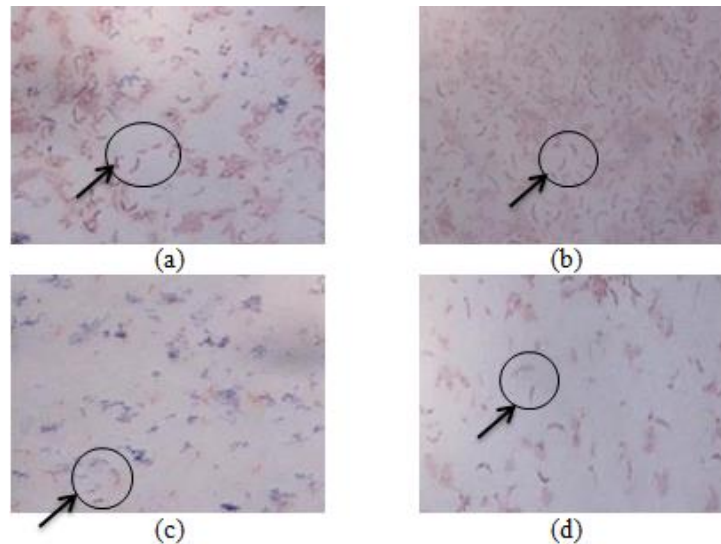


Gambar 1. Hasil Zona Bening Koloni Bakteri Pada Media CMC yang Ditambahkan Congo Red

Selulosa pada media CMC ketika kontak langsung dengan bakteri selulolitik akan diserap sehingga tidak dapat berikatan dengan congo red, sedangkan terdapat daerah yang tetap berwarna merah karena selulosa masih berikatan dengan congo red (Sinatryani, 2014). *Congo red* tersebut dapat berinteraksi dengan ikatan β -1,4 glikosidik pada media agar CMC. Berdasarkan pernyataan dari Yoo *et al.*, (2004) koloni yang positif memproduksi selulase akan dikelilingi oleh zona bening dengan warna latar merah yang tidak terdegradasi oleh selulase.

3.3 Pewarnaan Gram Bakteri Selulolitik

Berdasarkan uji pewarnaan gram pengamatan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000X isolat bakteri C tidak menunjukkan perubahan warna tetap berwarna biru keunguan dan memiliki sel berbentuk batang dikelompokkan kedalam bakteri gram positif. Isolat bakteri A, B dan D menunjukkan perubahan warna menjadi merah muda dan memiliki sel berbentuk batang dikelompokkan ke dalam bakteri gram negatif (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil pengamatan mikroskopis pada bakteri selulolitik perbesaran 1000x (↗), Isolat A gram-, bentuk sel basil (a), Isolat B gram-, bentuk sel basil (b), Isolat C gram+, bentuk sel basil(c) dan Isolat D gram-, bentuk sel basil (d)

Pewarnaan bakteri bertujuan untuk membedakan bakteri menjadi dua kelompok yaitu, bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Menurut Fardiaz (1989), Pada pewarnaan gram pengelompokkan bakteri gram positif apabila sel tetap berwarna biru- ungu seperti kristal violet, sedangkan kelompok gram negatif apabila sel mampu melepaskan kristal violet dan mengikat safranin sehingga berwarna merah muda. Kelompok bakteri gram positif memiliki kandungan peptidoglikan yang tebal pada struktur dinding sel, sedangkan dinding sel kelompok bakteri gram negatif memiliki kandungan lipid yang tinggi (Fitri dan Yasmin, 2011).

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat ditarik kesimpulan yaitu jumlah koloni bakteri yang diisolasi diperoleh sebanyak 28 koloni bakteri yang dikelompokkan menjadi 4 isolat bakteri berdasarkan bentuk dan warna morfologi disebut isolat bakteri A, B, C dan D. Isolat bakteri C termasuk kelompok gram negatif, isolat bakteri A, B dan D termasuk kelompok gram positif dan semua isolat bakteri berbentuk batang. Kemampuan degradasi berdasarkan nilai indeks selulolitik: Isolat bakteri A kategori tinggi, Isolat bakteri B, C dan D termasuk dalam kategori sedang.

Daftar Pustaka

- Begum, S., Meignanalaksmi and P. Dhevi. 2013. Isolation and Characterization of Cellulase Producing Paracoccus Pantotrophus FMR19 (JX012237) from Goat Rumen Fluid and its Effects on pH, Temperature and Carbon Sources. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 4(3): 384-390.
- Choi, Y. W., I. J. Hodgkiss, and K. D. Hyde. 2005. Enzyme Production by Endophytes of *Brucea Javanica*. *J Agric Tech*, 1: 55-66.
- Dar, M.A., K. D. Pawar., J. P. Jadhav and R. S. Pandit. 2015. Isolation of Cellulolytic Bacteria from the Gastro-intestinal 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.
- Fardiaz, S. 1989. *Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan*. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi Fakultas Teknologi Pertanian. IPB Press. Bogor
- Fitri, L. dan Y. Yasmin. 2011. Isolasi Dan Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Kitinolitik. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi*, 3(2) :20-25
- Gunam, I. B. W., A. Zainul., N. S. Antara dan Y. Setiyo. 2019. Isolasi Bakteri Selulolitik Pendegradasi Selulosa Dari Kompos. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 7(1)
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek : Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Kader, A. J. dan O. Oman. 1998. Isolation of cellulolytic Fungi From Sayap-Kinabalu Park Sabah Serawak. *J Biodiversity Bio-Century (ARBEC)* :1-6
- Reanida, P. P., A. Supriyanto dan Salamun. 2012. Eksplorasi Bakteri Selulolitik Dari Tanah Mangrove Wonorejo Surabaya. Universitas Airlangga: Surabaya.
- Saha, B. C. 2004. *Lignocellulose Biodegradation and Applications in Biotechnology*. American Chemical Society. Washington DC. P2-34.
- Schwarz, W. 2001. The Cellulosome and Cellulose Degradation by Anaerobic Bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 56: 634-649.
- Sinatriyani, D. Kelimpahan Bakteri Selulolitik di Muara Sungai Gunung Anyar Surabaya dan Bancaran Bangkalan. Universitas Airlangga
- Yoo, J. S., Y. J. Jung., Chung, S. Y., Lee, Y. C and Choi, Y. L. 2004. Molecular Cloning and Characterization of CMCCase Gene (celC) From *Salmonella yphimurium* UR, *J Microbial*. 42(3) : 204-210