

Isolasi dan Uji Degradasi Bakteri Selulolitik dari Sampah Organik di TPST-3R Kertalangu dan TPST-3R Nangun Resik terhadap Bunga Jepun Bali

MAHARDHIKA DWI PUTRA WIJAYA
WAYAN ADIARTAYASA *)
I NYOMAN WIJAYA

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman Denpasar 80362 Bali
)Email: adiartayasawayan@yahoo.co.id

ABSTRACT

Isolation and Degradation Test of Cellulolytic Bacteria from Organic Waste at TPST-3R Kertalangu and TPST-3R Nangun Resik Against Jepun Bali Flowers

Cellulolytic bacteria are microorganisms that produce cellulase enzymes that can synergistically hydrolyze crystalline cellulose into smaller oligosaccharides and eventually become glucose which can be used by these microorganisms as a source of nutrients for their growth. Cellulose acts as an inducer in cellulase synthesis which has two functions, namely as an inducer in enzyme synthesis and as a carbon source for cell growth. This study aims to obtain bacteria that are able to degrade organic waste samples using several methods, namely bacterial isolation, selective media, identification of bacterial colony morphology and qualitative bacterial degradation test. The results of this study indicated the presence of bacterial growth in selective CMC media and showed the ability of bacteria to degrade organic waste samples on Gelatine media. The results of bacterial isolation on CMC media with a dilution level of 10^{-8} were found 14 bacterial isolates in the TPST-3R Kertalangu sample and 16 bacterial isolates in the TPST-3R Nangun Resik sample. Each isolate was classified based on colony morphology, obtained three different isolates. Isolates taken from TPS Kertalangu were coded A, B, and C while isolates taken from TPST-3R Nangun Resik were coded E, F, and G. Most of the surface is convex, and flat. Based on the results of the calculation of the cellulolytic index, it was found that only isolate G was in the medium category and the other isolates had a high category value. The formation of a clear zone around the colonies that grew on CMC media showed that the isolate had cellulolytic activity measured qualitatively. The results of the analysis of the degradation ability of the Bali Jepun flower samples showed that isolate F was the fastest degraded isolate with an average of 3.5 days.

Keywords: organic waste, cellulose and cellulolytic bacteria

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Sampah menjadi salah satu masalah yang ada di perkotaan, karena timbulan sampah yang ada di perkotaan akan terus meningkat sejalan dengan pertumbuhan penduduk dan meningkatnya kegiatan pembangunan (Thrihadiningrum, 2010). Sampah dihasilkan dari bermacam sumber kegiatan rumah tangga, pertanian, industri, maupun kegiatan yang lainnya. Timbulan sampah kota Denpasar pada tahun 2019 adalah 47.028 m³/hari. Total dari sampah yang dihasilkan di Kota Denpasar 70% merupakan sampah organik (Data Statistik Dinas Lingkungan Hidup dan Kebersihan Kota Denpasar, 2019). Sedangkan menurut data statistik dinas lingkungan hidup dan kebersihan Klungkung pada tahun 2019 menyebutkan, jumlah sampah terbanyak di Kecamatan Klungkung sebanyak 34.141 kg/hari (255 m³) dengan komposisi sampah terbanyak adalah organik 68%, disusul debu, batu, dan sejenisnya 8%, gelas dan botol plastik 7%, plastik lembaran 5%, dan kresek 4%. Sampah organik apabila tidak dikelola dengan baik maka akan menimbulkan pencemaran lingkungan dan kesehatan masyarakat terancam, terutama bagi masyarakat yang tinggal di sekitar tempat pembuangan sampah. Tumpukan sampah organik yang membusuk dan menimbulkan aroma tidak sedap, sehingga mengundang beberapa vektor penyakit seperti nyamuk, lalat dan tikus.

Program TPST-3R bertujuan untuk mengurangi kuantitas dan/atau memperbaiki karakteristik sampah, yang akan diolah secara lebih lanjut di Tempat Pemrosesan Akhir (TPA). Penyelenggaraan Tempat Pengolahan Sampah *Reduce-Reuse-Recycle* (TPST-3R) merupakan pola pendekatan pengelolaan persampahan pada skala komunal atau kawasan, dengan lebih menekankan kepada cara pengurangan, pemanfaatan dan pengolahan sejak dari sumbernya pada area permukiman, area komersial, area perkantoran, area pendidikan, area wisata, dan lain-lain.

Di Bali secara khususnya, pohon jepun Bali merupakan tanaman yang berperan penting dalam kegiatan keagamaan, bunga jepun Bali banyak digunakan untuk melakukan upacara persembahyangan maupun sebagai campuran pengharum dupa apabila sudah diolah lebih lanjut, selain itu pohon jepun Bali ini memiliki nilai ekonomis yang cukup tinggi, karena bentuk batangnya yang unik dan sering di tanam di tempat-tempat wisata, villa dan hotel-hotel di Bali (Anonim, 2002). Dengan banyaknya pohon tersebut, tentu akan menghasilkan limbah daun maupun bunga dengan jumlah yang besar.

Sampah organik mempunyai komponen primer lignoselulosa yang terdiri atas tiga polimer yaitu, selulosa, hemiselulosa dan lignin. Selulosa merupakan komponen penyusun dinding sel tanaman. Selulosa memiliki degradasi yang rendah sehingga memerlukan waktu yang cukup lama untuk dapat didegradasi. Degradasi selulosa dipengaruhi oleh jenis mikroorganisme. Menurut Schwarz (2001), tidak semua mikroorganisme dapat mendegradasi selulosa, hanya mikroorganisme yang menghasilkan enzim selulase yang dapat mendegradasi selulosa yang sering disebut

mikroorganisme selulolitik. Enzim selulase adalah enzim yang dapat mengkatalisis dan menghidrolisis ikatan β 1-4 glukosidik pada selulosa atau ikatan yang paling banyak di selulosa (Sabaya, 2012).

Selulosa merupakan polimer alam yang paling melimpah, biokompatibel dan ramah lingkungan karena mudah terdegradasi, tidak beracun, serta dapat diperbarui. Selulosa belakangan ini digunakan sebagai bahan baku alternatif dalam industri dan menyebabkan permintaan selulosa terus meningkat (Song *et al.*, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan dan melakukan identifikasi morfologi bakteri selulolitik yang diisolasi dari sampah organik TPST-3R Kertalangu dan TPST-3R Nangun Resik. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang bakteri selulolitik yang diisolasi dari sampah organik Kota Denpasar.

2. Bahan dan Metode

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2020 sampai bulan Januari 2021. Pengambilan sampel sampah dilakukan di Tempat Pengolahan Sampah Terpadu, Desa Kesiman Kertalangu, Kecamatan Denpasar Timur, Kota Denpasar dan TPST-3R Nangun Resik Desa Paksebali, Kecamatan Dawan, Kabupten Klungkung. Isolasi bakteri selulolitik dilakukan di Laboratorium Sumber Daya Genetika dan Biologi Molekuler Pascasarjana Universitas Udayana.

2.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel sampah organik pada TPST-3R Kertalangu dan TPST-3R Nangun Resik, media Carboxil Methyl Cellulase (CMC), $MgSO_4$, K_2HPO_4 , $CaCl_2$, $MnSO_4$, NaCl, amonium nitrat, NaCl 1%, akuades, alkohol teknis, congo red 0.1%, alkohol 70%, kristal violet 2 gram, amonium oksalat 0,8 gram, idodium 1 g, kalium iodida 2 g, safranin o 0,25 g dan bunga jepun Bali. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: Laminar Air Flow Cabinet, autoklaf, jarum ose, inkubator, blender, penggerus, vortex mixer, timbangan, pipet tetes, pipet mikro, erlenmeyer, petridish, rotary shaker, tabung reaksi, pemanas, rak tabung reaksi, kertas label, aluminium foil, kapas penutup tabung reaksi, hand spray, nyala api lampu spiritus, sarung tangan, tas plastik, plastic warp, masker, kertas timbang, kaca preparat, dan mikroskop binokuler.

2.3 Pelaksanaan Penelitian

2.3.1 Pengambilan sampel

Pengambilan sampel sampah organik dilakukan di masing-masing sudut TPST-3R Kertalangu Desa Kesiman dan TPST-3R Nangun Resik Desa Paksebali (utara, selatan, pusat, barat, dan timur). Setiap sampel sampah organik diambil seberat 10-20 gram, Sampel yang sudah diambil kemudian disimpan di plastik klip lalu disimpan di dalam kulkas dengan suhu $-15^{\circ}C$, Sampel disimpan pada suhu $-15^{\circ}C$ bertujuan agar menjamin konsistensinya jumlah mikroorganisme pada sampel pengujian. Sampel

TPST-3R Kertalangu diberi kode A, B, dan C. Sedangkan sampel TPST-3R Nangun Resik diberi kode E, F, dan G.

2.3.2 Isolasi bakteri selulolitik

Isolasi bakteri, sebanyak 10 gram sampel sampah organik dimasukkan kedalam beaker glass lalu ditambahkan larutan fisiologis sebanyak 90 ml kemudian dihomogenkan dan didiamkan sesaat agar terjadi endapan (Ekawati, 2012). Pengenceran dilakukan dari 10^{-1} sampai pada pengenceran 10^{-8} . Suspensi sampel pada pengenceran 10^{-6} sampai 10^{-8} masing-masing diambil sebanyak 0,1 ml dimasukkan pada cawan yang berisi Medium CMC (Carboxly methyl cellulose) padat lalu ditebar dengan menggunakan metode gores kuadran dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 2 hari sampai ditemukan koloni bakteri yang tumbuh.

2.3.3 Seleksi bakteri selulolitik secara kualitatif

Isolat bakteri stok diinokulasi menggunakan metode titik ke media CMC agar dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 3×24 jam. Seleksi dilakukan dengan mengukur indeks selulolitik berdasarkan zona bening yang terbentuk menggunakan pewarna congo red. Setelah inkubasi, pewarna congo red 0.1% dituang ke dalam media cawan hingga menutupi seluruh permukaannya dan didiamkan selama 15 menit. Hasil pewarnaan dibilas menggunakan NaCl 1%. Diameter koloni dan zona bening yang terbentuk diukur triplo menggunakan penggaris. Secara kualitatif, semakin besar nilai indeks selulolitik maka semakin besar enzim yang dihasilkan oleh bakteri. Daya degradasi selulosa diklasifikasikan berdasarkan nilai indeks selulolitik dengan kategori rendah apabila nilai $IS \leq 1$, sedang apabila nilai IS antara 1 sampai 2 dan tinggi apabila nilai $IS \geq 2$ (Choi *et al.*, 2005).

Menurut Kasana *et al.* (2008), indeks selulolitik (IS) diperoleh dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan: DB = Diameter zona bening (mm)

DK = Diameter koloni (mm)

2.3.4 Pewarnaan Gram

Tahap persiapan untuk melakukan teknik pewarnaan gram yang pertama sterilkan jarum ose pada bunsen hingga memerah, kemudian tunggu 30 detik agar suhu pada jarum ose menurun. Sterilkan kaca objek yang akan digunakan dengan cara dipanaskan di atas api bunsen, lalu letakkan bakteri di tengah kaca objek. Panaskan kaca objek dengan melewatkannya diatas api bunsen sebanyak 2-3 kali agar terfiksasi (Moyes, 2009).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Isolasi Bakteri Pada Media CMC

Hasil pertumbuhan koloni dari sampel TPST-3R Kertalangu dan hasil pertumbuhan koloni dari sampel TPST-3R Nangun Resik setelah 3 x 24 jam pada media CMC di kelompokkan berdasarkan warna, permukaan koloni, bentuk koloni, dan tepi koloni. Masing-masing pengenceran yaitu 10^{-6} , 10^{-7} , dan 10^{-8} terdapat jumlah koloni pada sampel TPST-3R Kertalangu berturut-turut 26 koloni, 17 koloni, dan 14 koloni. Sedangkan jumlah koloni pada sampel TPST-3R Nangun Resik dari masing-masing pengenceran yaitu 10^{-6} , 10^{-7} , dan 10^{-8} terdapat jumlah koloni berturut-turut sebanyak 86 koloni, 56 koloni, dan 16 koloni.

Pengamatan makroskopis meliputi bentuk, warna, tepian, dan elevasi atau permukaan koloni bakteri. Permukaan koloni dapat dilihat dari samping, dan tepi koloni dapat dilihat dari atas cawan (Hadioetomo, 1993). Isolat bakteri A memiliki bentuk koloni tak beraturan dengan permukaan cembung dan tepi yang berombak. Isolat bakteri B memiliki bentuk koloni bulat memanjang dengan permukaan cembung dan tepi yang licin. Isolat bakteri C memiliki bentuk koloni bulat dengan permukaan datar dan tepi yang rata (Tabel 1). Isolat bakteri E memiliki bentuk koloni tak beraturan dengan permukaan cembung dan tepi yang bergerigi. Isolat F bakteri memiliki bentuk koloni bulat dengan permukaan datar dan tepi yang berombak. Isolat bakteri G memiliki bentuk koloni bulat bergerigi dengan permukaan rata dan tepi yang bergerigi (Tabel 1).

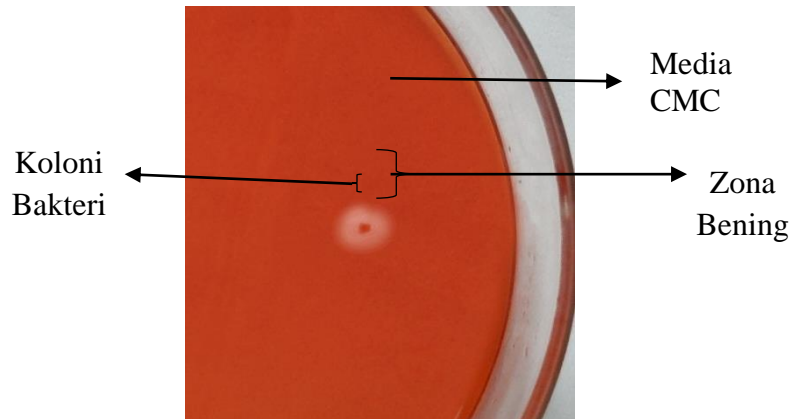
Tabel 1. Morfologi Koloni Bakteri

Kode		Morfologi Koloni Bakteri			
Isolat	Jumlah	Bentuk	Permukaan	Tepian	Warna
A	2	Tak beraturan	Cembung	Berombak	Putih
B	3	Bulat memanjang	Cembung	Licin	Putih
C	9	Bulat	Datar	Rata	Putih
E	3	Tak beraturan	Cembung	Bergerigi	Bening
F	2	Bulat	Datar	Berombak	Bening
G	11	Bulat bergerigi	Datar	Bergerigi	Putih

Bakteri yang tumbuh dalam media CMC memiliki aktivitas selulolitik berdasarkan pertumbuhan koloni dalam menyerap nutrisi dengan baik. Beberapa bakteri dapat memperbanyak diri pada berbagai jenis nutrisi, sedangkan yang lain mempunyai kekhususan dan hanya membutuhkan jenis nutrisi tertentu untuk pertumbuhannya (Selpani, 2015).

Uji indeks selulolitik menggunakan isolat bakteri yang telah dimurnikan. Pengukuran aktivitas enzim secara kuantitatif dilakukan pada keenam isolat bakteri

dengan cara mengukur indeks zona bening yang dihasilkan pengukuran dilakukan dengan meneteskan larutan congo red 0.1%. Setelah 24 x 2 jam akan terlihat koloni dikelilingi zona bening (Gambar 1).



Gambar 1. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri isolat F

Berdasarkan hasil perhitungan indeks selulolitik, Isolat bakteri A memiliki diameter koloni 1,6 mm dengan diameter zona bening 8,1 mm dan nilai indeks selulolitik (IS) sebesar 4. Isolat bakteri B memiliki diameter koloni 1,9 dengan diameter zona bening 8,3 dan nilai IS 3,3. Isolat bakteri C memiliki diameter koloni 1,9 mm dengan diameter zona bening 6,6 mm dan nilai IS 2,4 (Tabel 2). sedangkan hasil uji indeks selulolitik isolat bakteri E memiliki diameter koloni 2 mm dengan diameter zona bening 7,4 mm dan nilai indeks selulolitik (IS) sebesar 2,7. Isolat bakteri F memiliki diameter koloni 1,2 dengan diameter zona bening 7,3 dan nilai IS 5. Isolat bakteri G memiliki diameter koloni 1,1 mm dengan diameter zona bening 3,3 mm dan nilai IS 1,8 (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Pengukuran Zona Bening Isolat Bakteri KL dan NR

No	Lokasi	Kode Isolat	Diameter (mm)		IS	Keterangan
			Koloni	Zona Bening		
1	Kertalangu	A	1,6	8,1	4	T
2	Kertalangu	B	1,9	8,3	3,3	T
3	Kertalangu	C	1,9	6,6	2,4	T
4	Nangun Resik	E	2	7,4	2,7	T
5	Nangun Resik	F	1,2	7,3	5	T
6	Nangun Resik	G	1,1	3,3	1,8	S

Keterangan: T = Tinggi S = Sedang

Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan. Setiap bakteri memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam mendegradasi selulosa, tergantung dari jenis bakteri tersebut. Perbedaan indeks selulolitik yang didapatkan

dapat disebabkan oleh perbedaan isolat bakteri selulolitik yang ditemukan serta perbedaan dalam aktivitas enzimnya (Meryandini, 2009). Berdasarkan hasil uji indeks selulolitik yang didapatkan bahwa hanya isolat bakteri G yang mempunyai klasifikasi indeks selulolitik sedang, sedangkan isolat bakteri yang lain mempunyai klasifikasi indeks selulolitik tinggi dan memiliki potensi menghasilkan enzim selulase.

4. Kesimpulan

Berdasarkan isolasi dan uji kemampuan bakteri selulolitik pada TPST-3R kertalangu dan TPST-3R Nangun Resik dapat disimpulkan bahwa sampel TPST-3R kertalangu terdapat 14 koloni bakteri dan dikelompokkan menjadi 3 isolat bakteri yaitu A, B, & C. Sedangkan pada sampel TPST-3R Nangun Resik terdapat 16 koloni bakteri dan dikelompokkan menjadi 3 isolat bakteri yaitu E, F, & G. Jenis masing-masing isolat bakteri dengan ciri isolat bakteri A koloni berbentuk tak beraturan, berwarna putih, gram negatif, sel berbentuk batang, dan nilai Indeks Selulolitik (IS) 4 kategori tinggi. Isolat bakteri B koloni berbentuk bulat memanjang, berwarna putih, gram positif, sel berbentuk batang, dan nilai IS 3,3 kategori tinggi. Isolat bakteri C koloni berbentuk bulat, berwarna putih, gram positif, sel berbentuk batang, dan nilai IS 2,4 kategori tinggi. Isolat bakteri E koloni berbentuk tak beraturan, berwarna bening, gram positif, sel berbentuk batang, dan nilai Indeks Selulolitik (IS) 2,7 kategori tinggi. Isolat bakteri F koloni berbentuk bulat, berwarna bening, gram negatif, sel berbentuk oval, dan nilai IS 5 kategori tinggi. Isolat bakteri G koloni berbentuk bulat bergerigi, berwarna putih, gram positif, sel berbentuk oval, dan nilai IS 1,8 kategori sedang.

Daftar Pustaka

- Anonim. 2008. Teknik Metode Dasar Mikrobiologi. UMM Press, Malang.
- Anonim. 2019. Data Statistik Dinas Lingkungan Hidup dan Kebersihan Kota Denpasar. 2019. Lampiran Rekapitulasi Volume Sampah Kota Denpasar Tahun 2017, 2018, dan 2019.
- Choi, Y. W., H. Justin., and D. Kevin. 2005. Enzyme Production by Endophytes of *Brucea Javanica*. *J Agric Tech*, 1: 55-66.
- Ekawati, E. R., Ni'matuzahroh, S. Tini., dan S. Achmad. 2012. Eksplorasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik pada Limbah Daduk Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Berk. Penel. Hayati*: 18(31-34).
- Hadioetomo, R. S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek : Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Lymar, E.S., B. Li and V. Renganathan. 1995. Purification and characterization of a cellulose-binding β -glucosidase from cellulose degrading culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:2976-2980.
- Meryandini, A., W. Widosari, B. Maranatha, T. C. Sunarti, & H. Satria. 2009. Isolasi bakteri sellulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara Sains* 13(1):33-38.

- Moyes R. B., J. Reynolds., & D. P. Breakwell. 2009. Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. *Current Protocols in Microbiology*. doi:10.1002/9780471729259.mca03cs15.
- Sabaya, D. 2012. potensi isolat bakteri selulolitik untuk produksi dekomposer. skripsi universitas pakuan.
- Saha, B.C. 2004. Lignocellulose Biodegradation and Application in Biotechnology. US Government Work. American Chemical Society. 2-14.
- Selpani, B. N. 2015. Identifikas Bakteri Selulolitik Asal Tanah Situ Gede Dengan Teknik Genetika Molekuler [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Schwarz, W. 2001. The Cellulosome and Cellulose Degradation by Anaerobic Bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 56: 634-649.
- Smith, A. C., & M. A. Hussey. 2005. Gram Stain Protocols. American Society for Microbiology, <https://www.asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>
- Song, Y., J. Zhou., L. Zhang., X. Wu. 2008. Homogenous modification of cellulose with acrylamide in NaOH/urea aqueous solutions. *Carbohydraten Polymers* 73:18-25.
- Thrihadiningrum, Yulinah. 2010. MDGs Sebentar Lagi Sanggupkah Kita Menghapus Kemiskinan di Dunia. Jakarta: PT Gramedia.