

## Uji Aktivitas Pertumbuhan *Enterobacter cloacae* Selulolitik Aerob Rumen-1 Isolat Asal Limbah Cairan Rumen Sapi Peranakan Ongole

(GROWTH ACTIVITY ASSAY OF CELLULOLYTIC BACTERIA *ENTEROBACTER CLOACAE*  
SAR 1 (CELLULOLYTIC AEROB RUMEN 1) ISOLATED FROM ONGOLE CROSSBREED  
BOVINE RUMEN FLUID WASTE)

Tri Nurhajati<sup>1</sup>, Koesnoto Soepranianondo<sup>1</sup>,  
Widya Paramita Lokapirnasari<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Peternakan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga,  
Kampus-C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia 60115  
Telpon 031-5992785; Email: tri\_nurhajati@yahoo.com

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas pertumbuhan bakteri selulolitik *Enterobacter cloacae* Selulolitik Aerob Rumen-1 (SAR-1) yang berasal dari limbah cairan rumen sapi. Isolat yang telah dikultur diambil sebanyak 10 mL kemudian dipindahkan ke dalam media pertumbuhan Luria Bertani 100 mL dalam labu Erlenmeyer. Suspensi biakan diinkubasi dalam *shaker incubator* (37°C, 120 rpm). Dilakukan pengukuran *optical density* pada panjang gelombang 600 nm, dengan cara mengambil sampel sebanyak 1 mL setiap selang waktu dua jam selama 24 jam (jam ke 0; 2; 4; 6; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22; 24). Sampling pertama dilakukan pada jam ke-0 dilanjutkan sampai nilai OD menunjukkan penurunan yang jelas. Nilai OD diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Kurva pertumbuhan diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi terhadap waktu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *E. cloacae* SAR-1 memiliki kurva pertumbuhan dengan waktu optimum pada jam ke-12 masa inkubasi, serta mempunyai aktivitas pada suhu optimum 35°C dan pH optimum 6.

Kata-kata kunci: kurva pertumbuhan; suhu; pH optimum; selulolitik bakteri

### Abstract

This study aimed to know the growth activity of cellulolytic bacteria *Enterobacter cloacae* SAR 1 isolated from bovine rumen fluid waste. Isolates that had been cultured were taken as much as 10 mL and then transferred to 100 mL growth medium in Erlenmeyer flask. Culture suspensions were incubated in a *shaker incubator* (37°C, 120 rpm). Optical density was measured at 600 nm by taking as much as 1 mL sampling with interval of two hours for 24 hours (hour 0; 2; 4; 6; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22; 24). The first sampling was done at 0<sup>th</sup> hour and continued until OD values showed a clear decline. Optical density was measured with a UV-Vis spectrophotometer at wave length 600 nm. Growth curve was obtained from the result of absorbance measurement on the time. Optimum growth production of *E. cloacae* SAR 1 occurred at the 12<sup>th</sup> hours of incubation, optimum temperature of 35°C and optimum pH 6.

Key words: growth curve; temperature; pH optimum; cellulolytic bacteria

### PENDAHULUAN

Mikrob di dalam rumen dan retikulum terdiri dari bakteri, jamur, serta protozoa yang mempunyai peranan penting dalam proses fermentasi pakan. Rumen merupakan lingkungan yang sangat baik untuk pertumbuhan mikrob-mikrob tersebut. Ekosistem mikrob

rumen antara lain terdiri dari bakteri  $10^{10}$ - $10^{11}$  sel/mL, protozoa  $10^4$ - $10^6$  sel/mL, jamur anaerob  $10^3$ - $10^5$  zoospora/mL (Kamra, 2005). Selanjutnya menurut Stiverson *et al.* (2011), kompleks mikrob rumen memiliki peranan essential untuk mendegradasi pakan dan menyuplai nutrisi pada inangnya. Penggunaan enzim pendegradasi serat untuk ternak ruminansia

seperti sapi dan domba, dapat meningkatkan penggunaan pakan, produksi susu dan pertambahan bobot badan. Pada sapi yang ditambahkan campuran enzim yang mengandung xylanase dan selulase menunjukkan peningkatan pertambahan bobot badan sekitar 30-36% (Howard *et al.*, 2003).

Bakteri rumen aktif melakukan fermentasi selulosa dengan menghasilkan enzim selulase yang berperan menghidrolisis selulosa dan menghasilkan *volatile fatty acid* (VFA) (Hungate, 2013). Bakteri selulolitik pada umumnya didapatkan di dalam rumen antara lain *Bacteroides strain A*, *Ruminococcus strain A*, *Clostridiales strain A*. Jenis bakteri yang ada di rumen di antaranya mempunyai kemampuan untuk mendegradasi selulosa (Howard *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2014). Hasil yang sama diperoleh oleh Lokapirnasari *et al.* (2015), dari cairan rumen sapi peranakan ongole (PO) juga berhasil diidentifikasi bakteri selulolitik *E. cloacae* WPL 214 yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim endoselulase, eksoselulase, dan  $\alpha$ -glukosidase. Selain bakteri selulolitik tersebut, dari cairan rumen juga telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi oleh penulis, jenis bakteri selulolitik yang lain yaitu *E. cloacae* Selulolitik Aerob Rumen-1 (*E. cloacae* SAR-1). Bakteri tersebut digolongkan sebagai bakteri selulolitik didasarkan pada kemampuannya tumbuh pada media selektif *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC). Kemampuan tumbuh tersebut menunjukkan bahwa bakteri *E. cloacae* SAR-1 mampu memanfaatkan selulosa sebagai sumber nutriennya. Menurut Hatami (2008), adanya *clear zone* pada media padat selektif CMC menunjukkan kemampuan mikrob untuk mendegradasi selulosa.

Beberapa penelitian telah dilakukan oleh peneliti lain yaitu *E. cloacae* NCIB 11836, diisolasi dari jerami; *Enterobacter* spp. aktif dalam fiksasi nitrogen pada limbah kayu dan dalam rizosfer; juga dapat berkontribusi untuk fiksasi nitrogen di jerami (Harper dan Lynch, 1986). Borji *et al.* (2003) juga telah mengisolasi dan mengidentifikasi *Enterobacter* dari rayap yang memiliki kemampuan mendegradasi lignin dan polisakarida pada jerami.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan *E. cloacae* SAR-1 yang telah diisolasi dari cairan rumen sapi PO, terhadap aktivitas pertumbuhan, suhu optimum serta pH optimum untuk pertumbuhannya sebagai bakteri selulolitik. Biodegradasi oleh bakteri selulolitik rumen *E. cloacae* SAR-1 diharapkan

dapat digunakan sebagai sumber bakteri selulolitik yang berperan mendegradasi bahan pakan berserat sehingga dapat meningkatkan kualitas nutrisi dan pencernaan bahan pakan dengan harga lebih murah dibandingkan penggunaan enzim selulase komersial.

## METODE PENELITIAN

### Pengukuran Kurva Pertumbuhan

Isolat *E. cloacae* SAR-1 yang telah dikultur diambil sebanyak 10 mL kemudian dipindahkan ke dalam media pertumbuhan Luria Bertani 100 mL dalam labu Erlenmeyer. Suspensi biakan diinkubasi dalam *shaker incubator* (37°C, 120 rpm). Dilakukan pengukuran *optical density* pada panjang gelombang  $\lambda$  600 nm dengan mengambil sampling sebanyak 1 mL setiap selang waktu dua jam selama 24 jam (jam ke 0; 2; 4; 6; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22; 24). Sampling pertama dilakukan pada jam ke-0 dilanjutkan sampai nilai OD menunjukkan penurunan yang jelas. Densitas optik diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Kurva pertumbuhan diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi terhadap waktu (Lokapirnasari *et al.*, 2015).

### Pengukuran Suhu dan pH Optimum *E. cloacae* SAR-1

Isolat bakteri selulolitik *E. cloacae* SAR-1 diambil sebanyak 1 mL untuk dibiakan kembali ke dalam media pertumbuhan Luria Bertani 10 mL, selanjutnya suspensi biakan tersebut diinkubasi selama 24 jam dalam *shaker incubator* dengan penggoyangan 120 rpm pada beberapa perlakuan suhu (30°C, 35°C, 40°C, dan 45°C) dan beberapa perlakuan pH (pH 6, 7, dan 8). Setelah masa inkubasi masing-masing perlakuan selesai, sampel diambil sebanyak 1 mL serta dilakukan pengukuran densitas optik pada panjang gelombang  $\lambda$  600 nm dengan spektrofotometer UV-Vis (Lokapirnasari *et al.*, 2015).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kurva Pertumbuhan *E. cloacae* SAR-1

Pertumbuhan inokulan bakteri selulolitik *E. cloacae* SAR-1 disajikan pada Gambar 1 dan Tabel 1. Fase logaritmik pertumbuhan tertinggi ditemukan pada jam ke-12. Menurut Rolfe *et al.* (2012), kurva pertumbuhan menggambar-

Tabel 1. Data kurva pertumbuhan *E.cloacae* SAR-1 diukur *optical density* dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm

Jam ke-	Absorbansi (A)
0	0,133
2	0,668
4	0,758
6	0,797
8	0,895
10	0,907
12	0,925
14	0,779
16	0,771
18	0,782
20	0,762
22	0,449
24	0,129

kan adanya proses pembelahan sel maupun pertumbuhan bertahap suatu mikroorganisme dimulai dari awal pertumbuhan sampai dengan berakhirnya aktivitas, terdiri atas empat fase utama yaitu: lag, eksponensial, stasioner, dan kematian.

Fase lag atau fase adaptasi merupakan fase paling awal atau merupakan fase penyesuaian/pengaturan suatu aktivitas mikrob dalam lingkungan barunya (Rolfe *et al.*, 2012). Pada fase ini pertambahan massa atau pertambahan jumlah sel belum begitu terjadi, sehingga kurva pertumbuhan pada fase ini pada umumnya mendatar. Selang waktu fase lag tergantung kepada kesesuaian pengaturan aktivitas dan lingkungannya. Pada isolat *E. cloacae* SAR 1, fase lag ini terjadi pada dua jam pertama masa awal pertumbuhannya, setelah itu pada dua jam berikutnya telah terjadi fase eksponensial.

Fase eksponensial atau logaritmik merupakan fase peningkatan aktivitas perubahan bentuk maupun pertambahan jumlah mencapai kecepatan maksimum sehingga kurvanya dalam bentuk eksponensial. Peningkatan aktivitas tersebut harus diimbangi oleh banyak faktor, antara lain faktor biologi dan non biologi. Termasuk faktor biologi seperti bentuk dan sifat mikroorganisme terhadap lingkungan yang ada, asosiasi kehidupan di antara organisme yang bersangkutan, sedangkan yang termasuk faktor non-biologi seperti kandungan nutrisi di dalam medium pertumbuhan, suhu, dan pH (Rolfe *et al.*, 2012).

Fase eksponensial isolat *E. cloacae* SAR-1 terjadi pada jam ke-12 dengan absorbansi sebesar 0,925. Menurut Lokapirnasari *et al.* (2015), fase eksponensial tertinggi pada isolat *E. cloacae* WPL 214 terjadi pada jam ke-16 dengan absorbansi sebesar 3,122.

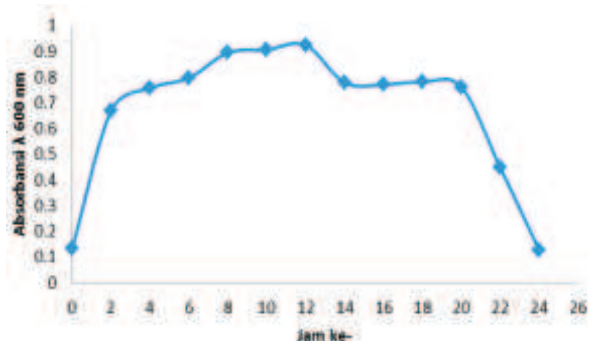
Fase stasioner merupakan fase terjadinya keseimbangan penambahan aktivitas dan penurunan aktivitas atau dalam pertumbuhan koloni terjadi keseimbangan antara yang mati dengan penambahan individu. Oleh karena itu fase ini membentuk kurva datar. Fase ini juga diakibatkan karena sumber nutrisi yang semakin berkurang, terbentuknya senyawa penghambat, dan faktor lingkungan yang mulai tidak menguntungkan. Fase stasioner isolat *E. cloacae* kode SAR-1 terjadi setelah jam ke-12 masa inkubasi.

Fase kematian merupakan fase mulai terhentinya aktivitas atau dalam pertumbuhan koloni terjadi kematian yang mulai melebihi bertambahnya individu. Fase kematian isolat *E. cloacae* kode SAR-1 terjadi setelah jam ke-24 masa inkubasi.

**Suhu Optimum Enzim Selulase *E. cloacae* SAR-1**

Kondisi suhu inkubasi dalam penelitian ini ditentukan pada suhu 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, dan 50°C. Data karakterisasi suhu enzim selulase *E. cloacae* SAR-1 disajikan pada Tabel 2.

Suhu turut memengaruhi aktivitas mikrob selulolitik dalam proses degradasi selulosa. Perlekatan mikrob selulolitik rumen *Ruminococcus albus* dan *Fibrobacter succinogenes* pada selulosa dihambat pada suhu di bawah 4°C dan di atas 50°C (Gong dan Forsberg, 1989; Morris dan Cole, 1987). Demikian pula dengan bakteri selulolitik asal cairan rumen *E. cloacae* SAR-1



Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat *E. cloacae* SAR-1 pada medium pertumbuhan Luria Bertani.

Tabel 2. Data karakterisasi suhu enzim selulase *E. cloacae* SAR-1

Suhu (°C)	Absorbansi $\lambda$ 550 nm	Aktivitas (U/mL)
30	0,394	0,94
<b>35</b>	<b>0,413</b>	<b>1,00</b>
40	0,334	0,76
45	0,330	0,75
50	0,318	0,71

juga menunjukkan aktivitas pada suhu 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, dan 50°C yaitu berturut-turut sebesar 0,94 U/mL, 1,00 U/mL; 0,76 U/mL; 0,75 U/mL, dan 0,71 U/mL. Walaupun isolat *E. cloacae* SAR-1 mampu menunjukkan aktivitas selulolitiknya pada kisaran suhu 30-50°C, namun aktivitas tertinggi dihasilkan pada suhu 35°C. Aktivitas *E. cloacae* SAR-1 tersebut dalam kisaran yang sama seperti mikrob selulolitik rumen lainnya *R. albus* and *F. succinogenes* yang menunjukkan aktivitas pada suhu optimum 30-38°C (Pell dan Schofield, 1993; Roger et al., 1990).

### Tingkat Keasaman/pH Optimum Enzim Selulase *E. cloacae* SAR 1

Kondisi pH inkubasi enzim selulase dalam penelitian ini dilakukan pada berbagai pH. Data karakterisasi pH enzim selulase *E. cloacae* SAR I disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Penentuan pH optimum enzim selulase *E. cloacae* SAR-1

pH	Absorbansi panjang gelombang $\lambda$ 550 nm	Aktivitas (U/mL)
Buffer Fosfat Sitrat pH 5	0,330	0,746
Buffer Fosfat Sitrat pH 6	0,349	0,805
Buffer Fosfat pH 6	0,348	0,800
Buffer Fosfat pH 7	0,328	0,739
Buffer Fosfat pH 8	0,322	0,722
Buffer Tris HCl pH 8	0,319	0,712
Buffer Tris HCl pH 9	0,317	0,706
Buffer Glisin pH 9	0,300	0,652
Buffer Glisin pH 10	0,294	0,635

Berdasarkan hasil penelitian dengan berbagai kondisi tingkat keasaman, isolat *E. cloacae* SAR-1 mampu tumbuh pada kisaran pH 5-10. Namun, aktivitas tertinggi didapatkan pada pH 6 (Tabel 3). Kondisi pertumbuhan yang demikian masih sesuai dengan habitat alaminya, karena mikrob selulolitik rumen memiliki aktivitas maksimum pada pH 7, sedangkan apabila pH rumen menurun menjadi pH 6 maka terjadi penurunan aktivitas. Hal tersebut dibuktikan pada penelitian dimana sejumlah bakteri selulolitik pendegradasi kertas saring menurun dari  $10^6$ /mL pada pH 6,9 menjadi  $10^3$ /mL pada pH 6. Berdasarkan pengamatan, tampak bahwa pencernaan selulosa juga didasarkan ukuran zona bening yang terbentuk pada medium. Pada saat konsentrasi selobiosa ditingkatkan, maka ukuran zona bening relatif berkurang (Hiltner dan Dehority, 1983).

Ramin et al. (2008) dan Ramin et al. (2009), berhasil mengisolasi *Enterobacteriaceae* dari rayap, dan bakteri tersebut memiliki kemampuan untuk mendegradasi selulosa sebesar 34-62%, hemiselulosa 14-32%, dan lignin 18-39% *Enterobacter cloacae* menghasilkan enzim selulase yang dapat mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan 1,4  $\alpha$ -glycoside dalam selulosa, yaitu *endoglucanases* yang berperan memotong secara acak internal amorf pada rantai 1,4- $\alpha$  polisaccharides cellulose menjadi *cello-oligosaccharides*, enzim *exoglucanases* serta  $\alpha$ -glucosidases yang menghidrolisis *cellobiose* menjadi *glucose* (Ahmed et al., 2010; Lynd et al., 2002).

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa isolat selulolitik *E. cloacae* SAR-1 memiliki aktivitas sebagai bakteri selulolitik pada waktu optimum jam ke-12 masa inkubasi serta mempunyai aktivitas pada suhu optimum 35°C, dan pH optimum 6.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan isolat selulolitik *E. cloacae* SAR-1 pada berbagai bahan pakan ternak yang memiliki kandungan serat tinggi untuk mengetahui kemampuan degradasinya terhadap kandungan serat kasar.



## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga, Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Pimpinan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, serta Rektor Universitas Airlangga, yang telah mendanai penelitian Desentralisasi, Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT), sesuai SK Rektor Nomor 1349/UN3/2014 tanggal 9 Mei 2014. Terima kasih pula kami sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu atas segala bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

## AFTAR PUSTAKA

- Ahmed I, Zia MA, Iqbal HMN. 2010. Bioprocessing of Proximally Analyzed Wheat Straw for Enhanced Cellulase Production through Process Optimization with *Trichoderma viridae* under SSF. *Inter J Biol Life Sci* 6: 3.
- Borji M, Rahimi S, Ghorbani GJV, Yoosefi, Fazaeli H. 2003. Isolation and identification of some bacteria from termites gut capable in degrading straw lignin and polysaccharides. *Journal of Veterinary Research* 58(3): 249-256.
- Gong J, Forsberg CW. 1989. Factors affecting adhesion of *Fibrobacter succinogenes* S85 and adherence defective mutants to cellulose. *Appl Environ Microbiol* 55: 3039-3044.
- Harper SHT, Lynch JM. 1986. Dinitrogen Fixation by Obligate and Facultative Anaerobic Bacteria in Association with Cellulolytic Fungi. *Current Microbiology* 14: 127-131
- Hatami S, Alikhani HA, Besharati H, Salehrastin N, Afrousheh M, Yazdani JZ. 2008. Investigation on Aerobic Cellulolytic Bacteria in Some of North Forest and Farming Soils. *American-Eurasian J Agric & Environ Sci* 3(5): 713-716.
- Hiltner P, Dehority BA. 1983. Effect of Soluble Carbohydrates on Digestion of Cellulose by Pure Cultures of Rumen Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 46(3): 642-648.
- Howard RL, Abotsi E, Van Rensburg ELJ and Howard S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr J Biotechnol* 2(12): 602-619.
- Hungate RE. 2013. *The rumen and its microbes..* New York. Elsevier-Academic Press. Hlm. 3-4.
- Lynd LR, Weimer PJ, Pretorius IS. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3): 506-577.
- Kamra DN. 2005. Rumen microbial ecosystem. Special Section: Microbial Diversity *Curr. Sci..* Microbiology Section, Centre of Advanced Studies in Animal Nutrition. *Indian Vet Res Inst Izatnagar* 89(1): 122-243.
- Lokapirnasari W P, Nazar DS, Nurhajati T, Supranianondo K, Yulianto AB. 2015. Production and assay of cellulolytic enzyme activity of *Enterobacter cloacae* WPL 214 isolated from bovine rumen fluid waste of Surabaya Abattoir, Indonesia. *Veterinary World* 8(3): 367-371.
- Moon C, Gagic D, Ciric M, Noel S, Summers E, Li D, Atua R, Perry R, Sang C, Zhang Y, Schofield L. 2014. Exploring rumen microbe-derived fibre-degrading activities for improving feed digestibility. In Proceedings of the 5<sup>th</sup> Australasian Dairy Science Symposium. Hlm. 377.
- Morris EJ, Cole OJ. 1987. Relationship between cellulolytic activity and adhesion to cellulose in *Ruminococcus albus*. *J Gen Microbiol* 133: 1023-1032.
- Pell AN, Schofield P. 1993. Microbial adhesion and degradation of plant cell walls. Dalam: Hatfield RD, Jung HG, Ralph J, Buxton DR, Mertens DR, Weimer PJ (Eds). *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Madison WI. ASA-CSSASSSA. Hlm.397-423
- Ramin M, Alimon AR, Panandam JM, Sijam K, Javanmard A, Abdullah N. 2008. Digestion of rice straw and oil palm fronds by microflora from rumen and termite bacteria, in vitro. *Pakistan Journal Biol Sci* 11(4): 583-588.

- Ramin M, Alimon N, Abdullah. 2009. Identification of cellulolytic bacteria isolated from the termite *Coptotermes curvignathus* (Holmgren). *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 17(1): 103-116.
- Roger V, Fonty G, Komisarczuk-BS, Gouet P. 1990. Effects of physiochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes*. *Appl Environ Microbiol* 56: 3081-3087
- Rolfe MD, Rice CJ, Lucchini S, Pin C, Thompson A, Cameron AD, Alston M, Stringer MF, Betts RP, Baranyi J, Peck MW. 2012. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology* 194(3): 686-701.
- Stiverson J, Morrison M, Yu Z. 2011. Populations of select cultured and uncultured bacteria in the rumen of sheep and the effect of diets and ruminal fractions. *International Journal of Microbiology* 21: 8.