

EKSPLORASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI SELULOLITIK PADA LIMBAH DADUK TEBU (*Saccharum officinarum* L)

Evy Ratnasari Ekawati¹, Ni'matuzahroh², Tini Surtiningsih², dan Agus Supriyanto²

¹Mahasiswa Pascasarjana S2 Biologi, F-Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya

E-mail: ephie.nies@gmail.com

²Staf Pengajar Departemen Biologi, F-Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya

ABSTRACT

*This study aims to determine the diversity of cellulolytic bacteria in sugarcane trash (*Saccharum officinarum* L). This study was an explorative research by observing the clear zone in the medium CMC (carboxyl methyl cellulose) with 0.1% congo red. Characterization of cellulolytic bacteria was through by observing the bacterial of colony morphology, cell shape and physiology characteristics. The research datas were analyzed descriptively. From the results of this study, it were obtained six types of isolates that grew well on CMC medium. Based on the characterization of bacteria, six kinds of these isolates belongs to *Cellulomonas* sp., *Cellvibrio* sp., *Cytophaga* sp., *Micrococcus* sp. and *Pseudomonas* sp. genera.*

Key words: Cellulolytic bacteria, Exploration, Identification, Sugarcane (*Saccharum officinarum* L), Trash

PENGANTAR

Daduk pada perkebunan tebu merupakan limbah padat dari pabrik gula, bila dibiarkan akan menjadi serasah daduk. Serasah daduk merupakan materi organik yang terdapat di lantai perkebunan tebu, sebagian besar tersusun atas tumbuhan mati dan potongan organ tumbuhan, sehingga produksi serasah dapat diidentifikasi sebagai berat material yang mati dalam luas area tertentu per satuan waktu. Serasah dapat berupa sisa-sisa tanaman termasuk dedaunan, cabang, ranting dan batang (Feliatra, 2001).

Pengolahan langsung limbah daduk secara biologi dari bahan baku lignoselulosa, secara ekonomis lebih menguntungkan (Pan *et al.*, 2005). Daun tebu pada umumnya tersusun atas selulosa dan lignin yang sulit untuk didegradasi. Selulosa membentuk komponen serat dari dinding sel tumbuhan. Secara alami proses degradasi selulosa memerlukan bantuan mikroorganisme yang mengeluarkan enzim selulase. Beberapa genus bakteri selulolitik diantaranya adalah *Cytophaga*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Cellovibrio*, dan *Sporocytophaga* (Santoso, 1997).

Kondisi lingkungan perkebunan tebu tiap daerah berbeda, karena dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik. Faktor-faktor tersebut menyebabkan perbedaan keanekaragaman bakteri selulolitik yang terdapat pada daduk di setiap daerah. Proses dekomposisi selulosa di alam secara alami berlangsung lambat sehingga diperlukan bantuan, diantaranya dengan menggunakan konsorsium bakteri selulolitik indigenus yang terdapat pada limbah daduk tersebut. Aktivitas selulolitik diuji menggunakan

berbagai media selektif. Kemampuan bakteri dalam menghidrolisis selulosa diindikasikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni pada media selektif agar (Perez *et al.*, 2002).

Berdasarkan hal yang telah disebutkan di atas, perlu dilakukan eksplorasi dan identifikasi bakteri selulolitik dari serasah daduk, yang nantinya dapat dimanfaatkan sebagai bakteri pendegradasi limbah daduk tebu. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui Genus bakteri selulolitik yang didapatkan dari hasil isolasi serasah daduk yang terdapat pada lahan perkebunan tebu. Bakteri selulolitik tersebut selanjutnya diformulasikan untuk digunakan dalam uji biodegradasi limbah daduk.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel serasah tebu (daduk), alkohol 70%, mikroskop olympus, media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) Agar, media NA (*Nutrient Agar*), akuades, congo red 0,1%, NaCl 1%, *microbact identification kits*.

Cara Kerja Penelitian

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik

Pemilihan Sampel Serasah

Sampel serasah diambil dari 5 titik secara random/acak pada lahan perkebunan tebu Puslit Gula PTPN X Djengkol Kabupaten Kediri, Jawa Timur. Serasah merupakan daduk tebu yang berjatuhan di lantai tanah perkebunan tebu.

Penanganan Sampel Daduk

Seresah daduk dipotong-potong dan dihomogenkan. Diambil sebanyak 1 kg seresah yang telah dipotong-potong, kemudian diblender sampai halus.

Isolasi Bakteri Selulolitik

Berdasarkan prosedur Cappucino dan Sherman (2006), seresah yang telah dihaluskan menggunakan alat *blender* diambil sebanyak 50 g, kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* 500 ml. Selanjutnya dibuat suspensi dengan cara menambahkan akuades steril sampai mencapai volume 450 ml, kemudian dihomogenkan, didiamkan sesaat sekitar 15 menit supaya seresah mengendap. Pengenceran seresah tebu tersebut adalah 10^{-1} . Dari Pengenceran 10^{-1} , diambil sebanyak 1 ml dengan pipet, kemudian diencerkan dengan pengenceran seri 10^{-2} dan 10^{-3} dalam 2 tabung reaksi yang masing-masing berisi 9 ml akuades steril. Masing-masing pengenceran dibiakkan pada media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) agar dalam cawan petri dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Diinkubasi selama 72 jam pada suhu 35°C . Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dimurnikan dengan membuat sub biakan ke media NAS (*Nutrient Agar Slant*) dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 35°C . Sub biakan ini digunakan sebagai bahan untuk identifikasi bakteri selulolitik dan sebagai stok kultur.

Identifikasi Bakteri Selulolitik

Pengamatan Makroskopis Koloni Bakteri

Untuk melihat karakteristik koloni bakteri, maka dilakukan pengamatan koloni secara makroskopis koloni dengan cara setiap isolat murni ditumbuhkan pada cawan petri berisi media NA dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 35°C untuk menampilkan karakter dari masing-masing isolat meliputi: warna, bentuk, tepian, elevasi, permukaan, karakteristik optik, ukuran koloni, dan diameter koloni. Setiap cawan petri berisi satu jenis isolat hasil dari pemurnian pada NAS (*Nutrient Agar Slant*).

Pengamatan Mikroskopis Sel Bakteri

Untuk melihat karakteristik sel bakteri, maka dilakukan pengamatan secara mikroskopis yang meliputi: bentuk sel dan pengamatan hasil pewarnaan Gram (Gram positif dan Gram negatif).

Pengamatan Fisiologis Bakteri

Karakteristik fisiologis bakteri selulolitik diamati dengan cara menumbuhkan pada berbagai media uji. Pada penelitian ini, uji dilakukan dengan menggunakan *Microbact Identification Kits*. Masing-masing isolat bakteri selulolitik

terpilih yang telah murni dalam NAS (*Nutrient Agar Slant*), diambil 1–3 koloni dan disuspensikan dengan 10 ml air fisiologis. Suspensi bakteri diambil sebanyak 100 μl kemudian dimasukkan pada masing-masing sumuran *Microbact Identification Kits*, diinkubasi pada suhu optimum pertumbuhan bakteri selulolitik (35°C) selama 24 jam dan diamati perubahan warna yang terbentuk.

Hasil uji fisiologis dicocokkan dengan karakteristik fisiologi bakteri selulolitik yang terdapat pada buku panduan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* edisi 9 (Holt, *et al.*, 2000).

Uji Skrining Bakteri Selulolitik

Peremajaan Isolat Bakteri Selulolitik

Isolat murni diremajakan dengan cara diambil 1–3 koloni dari stok kultur pada NAS (*Nutrient Agar Slant*). Ditumbuhkan pada media NAS (*Nutrient Agar Slant*) diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

Uji Potensi Bakteri Selulolitik

Isolat bakteri potensial selulolitik dipindahkan pada media CMC agar *plate* dengan cara ditutul pada 3 titik. Masing-masing cawan petri berisi 1 isolat. Pemberian tutulan pada media selektif diupayakan sama. Inkubasi selama 4–7 hari dalam suhu 35°C . Setelah itu dilakukan pengujian ada tidaknya zona bening yang terbentuk pada media CMC agar.

Pengamatan Uji Potensi Selulolitik

Pengujian zona bening dilakukan dengan menggunakan larutan *congo red* 0,1% sebagai larutan penguji dan NaCl 1% sebagai larutan pencuci. Sebanyak 2 ml larutan *congo red* 0,1% dituangkan ke dalam media yang berisi isolat, kemudian didiamkan selama 20–30 menit. Larutan dibuang dan dibilas dengan larutan NaCl 1%, kemudian diamati keberadaan zona bening (*Clear zone*). Hasil positif dinyatakan dengan adanya zona bening (*clear zone*) di sekitar koloni.

HASIL

Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis Bakteri Selulolitik

Hasil pengamatan makroskopis bakteri didapatkan dengan cara mencandra koloni bakteri pada medium *Nutrient Agar Plate* (NAP). Pengamatan mikroskopis bakteri dilakukan dengan cara mengamati bentuk sel dan warna sel bakteri yang telah diwarnai dengan pewarnaan Gram. Hasil karakteristik makroskopis dan mikroskopis bakteri selulolitik disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik makroskopis dan mikroskopis bakteri selulolitik dari medium NAP umur 48 jam

No	Kode Isolat Bakteri	Karakteristik Makroskopis				Karakteristik Mikroskopis	
		Bentuk Koloni	Warna Koloni	Tepi	Elevasi	Bentuk sel	Gram
1	UV1	Bulat	Kuning	Rata	Konveks	Batang pendek	Negatif
2	UV2	Bulat	Putih kekuningan	Rata	Konveks	Kokoid	Positif
3	UV3	Bulat	Kuning	Rata	Konveks	Batang	Negatif
4	UV4	Bulat	Putih kekuningan	Rata	Konveks	Kokoid	Negatif
5	UV5	Bulat	Kuning jernih	Rata	Konveks	Batang gemuk pendek	Negatif
6	UV6	Bulat	Kuning jernih	Rata	Konveks	Kokoid	Positif

Uji Skrining

Uji skrining untuk mengetahui kemampuan selulolitik dari isolat bakteri dilakukan pada medium spesifik CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) sebagai media selektif untuk pertumbuhan bakteri selulolitik. Skrining untuk mengetahui potensi bakteri sebagai dekomposer selulosa adalah dengan terbentuknya zona bening (*clear zone*) di sekitar koloni bakteri pada medium CMC Agar. Hasil uji skrining bakteri selulolitik disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji skrining bakteri selulolitik pada medium CMC Agar umur 7 hari

No	Isolat bakteri selulolitik	Zona bening (clear zone)
1	UV 1	+
2	UV 2	+
3	UV 3	+
4	UV 4	+
5	UV 5	+
6	UV 6	+

Tabel 3. Daftar uji fisiologi bakteri selulolitik dengan *microbact kit* 12A dan 12B

No	Uji fisiologi	Kode isolat bakteri					
		UV 1	UV 2	UV 3	UV 4	UV 5	UV 6
1	Lysin	-	-	+	+	+	+
2	Ornithine	-	-	+	-	-	-
3	H ₂ S	-	-	-	-	-	+
4	Glucose	-	-	-	-	-	-
5	Manitol	-	-	-	-	-	-
6	Xylose	+	+	+	+	-	-
7	ONPG	+	+	+	+	+	-
8	Indol	-	-	-	-	-	-
9	Urease	+	-	-	+	-	+
10	VP	-	-	-	+	-	-
11	Citrat	-	-	+	+	-	-
12	TDA	-	-	-	-	-	-
13	Gelatin	-	-	-	-	-	-
14	Malonate	-	-	-	-	-	-
15	Inositol	-	-	-	+	-	-
16	Sorbitol	-	-	-	+	-	-
17	Rhamnose	-	-	-	-	-	-
18	Sucrose	-	-	-	+	-	-
19	Lactose	-	-	-	+	-	-
20	Arabinose	+	+	+	+	+	+
21	Adonitol	-	-	-	-	+	-
22	Raffinose	-	-	-	+	-	-
23	Salicin	-	-	-	+	-	-
24	Arginin	+	+	+	+	+	+
25	Motilitas	+	+	+	+	+	+
26	Oksidase	+	+	+	+	+	+
27	Katalase	+	+	+	+	+	+
Genus	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp. <i>Cellvibrio</i> sp.	<i>Cellvibrio</i> sp.	<i>Cytophaga</i> sp.	<i>Cytophaga</i> sp.	<i>Cytophaga</i> sp.	
Probabilitas genus (%)	77,6	84,1	74	83,1	70,5	78,6	

Identifikasi Bakteri Selulolitik

Bakteri selulolitik dari limbah daduk yang tumbuh pada media selektif CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*), diisolasi ulang dan diremajakan menggunakan medium NAS (*Nutrient Agar Slant*). Pada masing-masing isolat menunjukkan beberapa kesamaan karakter, yaitu bersifat motil, katalase dan oksidase positif. Hasil uji fisiologis disajikan dalam tabel 3.

Berdasarkan dari hasil isolasi dan identifikasi dari limbah daduk diperoleh 6 jenis isolat dengan karakteristik yang beraneka ragam. Enam isolat tersebut tergolong dalam genus *Pseudomonas* sp. UV1 dengan probabilitas genus sebesar 77,6%, *Micrococcus* sp. UV2 dengan probabilitas genus sebesar 84,1%, *Cellvibrio* sp1. UV3 dengan probabilitas genus sebesar 74%, *Cellvibrio* sp2. UV4 dengan probabilitas genus sebesar 83,1%, *Cytophaga* sp1. UV5 dengan probabilitas genus sebesar 70,5% dan *Cytophaga* sp2. UV5 dengan probabilitas genus sebesar 78,6%.

PEMBAHASAN

Kemampuan bakteri untuk tumbuh pada medium spesifik CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) Agar menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu memanfaatkan selulosa sebagai salah satu sumber nutrisi terutama sebagai sumber karbon. Zona bening (*clear zone*) merupakan indikasi awal untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mendekomposisi selulosa. Semakin luas zona bening (*clear zone*) yang terbentuk, secara kualitatif, dianggap potensi bakteri selulolitik semakin besar. Isolat bakteri selulolitik potensial diperoleh dengan indikasi membentuk zona halo terluas dan kecerahan *clear zone* yang terbentuk (Irwanto, 2000; Meryandini *et al.*, 2009).

Dari hasil isolasi dan identifikasi limbah daduk, didapatkan 6 jenis isolat dari 5 genus bakteri, yaitu

Cellulomonas sp., *Cellvibrio* sp., *Cytophaga* sp., *Micrococcus* sp. dan *Pseudomonas* sp. Pada beberapa penelitian, kelima genus bakteri tersebut merupakan pendegradasi selulosa yang handal. Hal ini perlu dikaji lebih lanjut lagi kemampuannya dalam mendegradasi selulosa. Enam jenis bakteri selulolitik yang telah didapatkan, selanjutnya dimanfaatkan sebagai bakteri uji untuk mendegradasi limbah daduk tebu yang sejauh ini belum mendapatkan perhatian dalam pengelolaannya selain dibakar. Uji enzimatis dari 6 jenis isolat bakteri selulolitik sedang diteliti.

KEPUSTAKAAN

- Cappuccino, J.G., dan Sherman, N. 2006. *Microbiology a Laboratory Manual*. Benjamin Cumming Publisher, New York.
- Feliatra. 2001. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Heterotrof yang terdapat di daun Mangrove (*Avicennia* sp. dan *Sonneratia* sp) Dari Kawasan Stasiun Dumai. *Jurnal Nature Indonesia*. 3(2): 104–112.
- Holt, J.G., Noel, R.K., Peter, H.A.S., James, T.S., dan Stanley, T.W. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Irwanto, R. 2000. Diversitas Bakteri yang Berasosiasi dengan Kompetisi Seresah Mangrove di Pantai Utara Surabaya. *Skripsi*, Biologi FMIPA, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T.C., Rahmania, N., dan Satria, H. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Sains* 13(1).
- Pan, X., Xie, D., Gilkes, N.R., Gregg, D., Mabee, W., dan Pye, K. 2005. Biorefining of Softwood using Ethanol Oranosolv Pulping Preliminary Evaluation of Process Streams for Manufacture of Fuel-grade Ethanol Co-products. *Biotech Bioeng.* 90: 473–481.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., dan Martinez, J. 2002. Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin. *Int Microbiol.* 5: 53–63.
- Santoso, A. 1997. Isolasi dan Estimasi Aktivitas Bakteri Selulolitik yang berasosiasi dengan Wood-Barer. Fakultas Perikanan dan Kelautan, UNDIP, Semarang.