

Isolasi Bakteri Selulolitik dari Limbah Kulit Pisang

Sukmawati^{1*}

¹Fakultas Perikanan Universitas Muhammadiyah Sorong Papua Barat Indonesia

*e-mail: sukumawati.sw91@gmail.com

ABSTRACT

Cellulose can be found in whole parts of plants. Cellulose can be degraded by cellulose enzyme. Cellulose enzyme is produced by cellulolytic bacteria which has ability to degrade the cellulose and fiber. Cellulose enzyme is extremely important in industry sector. This research aims to isolate the cellulosic bacteria of peel waste of Banana in Sorong, West Papua. This research used isolation and purification method by using 1 gram of Banana peel. It was isolated in CMC (Carboxymethyl cellulose) selective media and morphology characteristic test using 400X-1000X microscope and zone index test. The result showed that the cellulosic ability was found in isolate B with pure zone index 3mm and the smallest pure zone index was in isolate H with pure zone index 0,8 mm. while, the isolate C had zone pure index 1,5 mm, isolate D 1,625 mm, isolate E 1 mm, isolate F 0,714mm, and isolate G 2 mm.

Keywords: *isolation, celulolitic bacteria, banana peel waste*

ABSTRAK

Selulosa dapat ditemukan pada semua tanaman, mulai dari akar, batang, daun, dan buah tanaman. Selulosa dapat didegradasi oleh enzim selulase, enzim selulase adalah enzim yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi serat ataupun selulosa. Enzim selulase sangat diperlukan dalam bidang industri. Tujuan dari penelitian ini ialah isolasi bakteri selulolitik dari limbah kulit pisang di kota Sorong Papua Barat. Metode yang digunakan dalam penelitian ini ialah isolasi dan pemurnian meliputi 1 g sampel limbah kulit pisang yang diisolasi pada media selektif CMC (Carboxymethyl cellulose), dan uji karakteristik morfologi berupa pengamatan ciri-ciri koloni; bentuk sel bakteri dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400X-1000X; dan uji indeks zona bening. Berdasarkan hasil yang didapatkan kemampuan selulolitik terdapat pada isolate B dengan indeks zona bening 3mm dan indeks zona bening terkecil terdapat pada isolat H sebesar 0,8 mm. Sedangkan isolat C indeks zona beningnya 1,5 mm, isolat D 1,625 mm, isolat E 1 mm, isolat F 0,714mm, dan isolat G indeks zona beningnya sebesar 2 mm.

Kata Kunci: isolasi, bakteri selulolitik, limbah kulit pisang

PENDAHULUAN

Selulosa adalah komponen struktural yang banyak ditemukan pada dinding sel tanaman terrestrial dan laut, juga diproduksi oleh beberapa tanaman laut. Selulosa merupakan polisakarida yang mempunyai fungsi sebagai unsur struktural pada dinding sel tumbuhan tingkat tinggi. Selulosa berbentuk serabut, liat, tidak larut di dalam air, dan ditemukan terutama pada bagian berkayu pada tumbuhan. Selulosa termasuk polisakarida terbanyak yang ditemukan pada tanaman, untuk mendegradasi selulosa perlu dengan bantuan enzim selulase, dengan bantuan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim selulase. Contoh mikroorganisme tersebut ialah bakteri selulolitik.

Bakteri selulolitik bisa didapatkan melalui dari hasil isolasi tanah antara lain *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Actinomycetes* (Lederbeg, 2014). Selain dari tanah juga dapat diperoleh dari isolasi ampas tebu, misalnya *Bacillus pumilis*, *B cereus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Chaudhary *et al.* 2015 ;Ashwani *at al.* 2014).

Mikroorganisme yang bersifat selulolitik mampu menghasilkan enzim

selulase. Enzim selulase dapat dijadikan sebaga biokatalisator dalam bidang industri non pangan dan industri bidang pangan. Misalnya enzim selulase yang digunakan dalam pembuatan etanol dan asam-asam organik lainnya (Riyanti, 2009). Tentunya dengan menggunakan enzim selulase sebagai biokatalisator maka lebih praktis dan ekonomis, selain itu termasuk bahan yang ramah lingkungan.

Selain daripada itu enzim selulase juga dapat digunakan pada industri pertanian misalnya, peranannya dalam pendukung pertumbuhan tanaman terong (Subowo, 2010).

Tujuan dari penelitian ini ialah untuk mengisolasi bakteri selulolitik dari limbah kulit pisang di kota Sorong Papua Barat. Melalui penelitian ini maka dapat diketahui potensi bakteri yang berasosiasi pada limbah kulit pisang, sehingga bisa dijadikan rujukan untuk penelitian terkait.

METODE

Isolasi dan Pemurnian

Sebanyak 1 g sampel limbah kulit pisang diambil dari areal warung kota Sorong Papua Barat, dilarutkan dalam 9 ml NaCl 0,85%. Selanjutnya 1 ml larutan hasil suspensi dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl 0,85% dan dilakukan

pengenceran berseri sampai 10^{-5} . Dari dua seri pengenceran terakhir (10^{-4} dan 10^{-5}) masing-masing dicawakan sebanyak 0,1 ml ke dalam cawan petri yang telah berisi media agar CMC (Carboxymethyl cellulose) (10 g CMC, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,75 g KNO_3 ,

0,5 g K₂HPO₄, 0,02 g FeSO₄.7H₂O, 0,04 g CaCl₂, 2 g pepton, dan 15 g agar dalam 1000 ml akuades) dan disebarakan secara merata dengan batang segitiga. Inkubasi dilakukan pada suhu 37^o C selama 48 jam.

Setelah didapatkan beberapa koloni bakteri yang tumbuh dalam media agar CMC setelah inkubasi, kemudian dipilih 2 koloni untuk dicawakan dalam dua buah media agar CMC dalam cawan petri dengan

Uji Karakteristik Morfologi

Pembentukan zona bening

Satu cawan petri yang berisi koloni tunggal kemudian dilanjutkan ke uji pembentukan zona bening dengan metode Congo Red yang diusulkan oleh (Wood et al. 1988; Hatami et al., 2008). Beberapa tetes larutan Congo Red (0,1 % w/v) ditambahkan ke dalam cawan petri yang berisi koloni tunggal sampai merata dan Pewarnaan Gram.

Sebanyak satu ose isolat murni dalam agar CMC miring dipindahkan ke permukaan kaca objek yang telah ditetesi dua tetes akuades dan dikeringanginkan. Setelah kering kemudian difiksasi di atas api Bunsen dan dilanjutkan dengan pewarnaan Gram. Hasil fiksasi ditambahkan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik bakteri selulolitik yang diisolasi dari sampel limbah kulit pisang termasuk bakteri yang bersifat gram negatif ditandai dengan pewarnaan selnya

teknik gores kuadran dan totol (media untuk uji zona bening), Inkubasi dilakukan selama 72 jam pada suhu 37^oC. Koloni yang tumbuh dengan teknik gores dimurnikan sampai didapatkan koloni tunggal sebanyak 2 replika dalam cawan petri (*replika plating*). Dari masing-masing cawan petri yang telah berisi koloni tunggal kemudian dipindahkan ke dalam media agar CMC miring.

diinkubasi selama 15 menit. Selanjutnya dicuci sebanyak 2 kali dengan larutan NaCl 2 M tiap 15 menit. Zona bening yang terbentuk kemudian diamati dan dihitung indeks zona beningnya dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rumus Indeks Selulolitik (IS)} = \frac{a-b}{b}$$

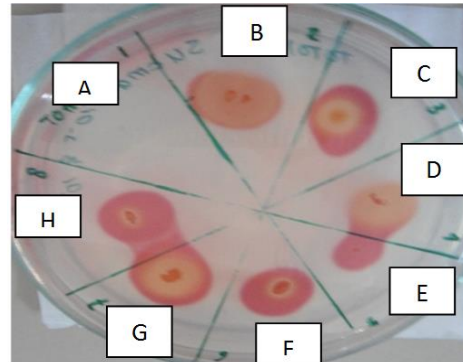
beberapa tetes larutan ungu kristal selama 1 menit, dibilas dengan H₂O, iodin 2 menit, dibilas dengan H₂O, alkohol 96% beberapa detik, safranin 30 detik, dibilas dengan H₂O. Kaca objek kemudian dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 400X-1000X.

berwarna merah, dan bentuk selnya berbentuk batang. Karakteristik tiap isolate dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1 Karakter morfologi bakteri selulolitik

NO	Jenis Isolat	Uji Gram	Bentuk Sel
1	Isolat A	Negatif	Batang
2	Isolat B	Negatif	Batang
3	Isolat C	Negatif	Batang
4	Isolat D	Negatif	Batang
5	Isolat E	Negatif	Batang
6	Isolat F	Negatif	Batang
7	Isolat G	Negatif	Batang
8	Isolat H	Negatif	Batang

Gambar hasil uji zona bening bakteri selulolitik pada media CMC dapat dilihat pada Gambar 1, dan indeks zona bening dapat dilihat pada tabel 2.



Gambar 1. Hasil uji zona bening bakteri selulolitik

Tabel 2. Indeks zona bening bakteri selulolitik

Isolat	a1(mm)	a2(mm)	b1(mm)	b2(mm)	rata-rata a(mm)	rata-rata b(mm)	IS (mm)
A	-	-	-	-	-	-	-
B	14	10	3	3	12	3	3
C	8	7	3	3	7,5	3	1,5
D	11	10	4	4	10,5	4	1,625
E	2	0	1	0	1	0,5	1
F	6	6	4	3	6	3,5	0,714
G	10	11	3	4	10,5	3,5	2
H	5	4	3	2	4,5	2,5	0,8

Sampel limbah kulit pisang yang digunakan sebagai sumber isolasi bakteri selulolitik berasal dari limbah warung di distrik Malaimsimsa, Kota Sorong Papua Barat. Bakteri yang berhasil diisolasi dari sampel tersebut memiliki bentuk koloni bulat pinggiran koloni rata, klevasi koloni datar, isolat ini diduga bakteri selulolitik karena

mampu tumbuh pada media CMC yang merupakan media selektif bagi pertumbuhan bakteri pendegradasi selulosa, selain itu 7 isolat dari 8 isolat terbentuk zona bening dan yang paling tertinggi indeks zona beningnya adalah isolat B dengan indeks zona bening 3 mm, isolat C sebesar 1,5 mm, isolat D 1,625 mm,

isolat E 1 mm, isolat F 0,714 mm, isolat G 2 mm, dan isolat H sebesar 0,8 mm sedangkan isolat A tidak terbentuk zona bening, perbedaan indeks zona bening tiap isolat disebabkan karena tiap spesies bakteri memiliki kemampuan menghasilkan selulase yang berbeda dalam menghidrolisis substrat CMC (Sari *et al.* 2012).

Setiap bakteri mempunyai strategi yang berbeda-beda. 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, konsentrasi produk, (Ambriyanto, 2010). Potensi selulolitik juga dapat diketahui dalam mensekresikan enzim selulase melalui pengujian indeks selulolitik berdasarkan zona bening yang terlihat disekitar koloni bakteri yang tumbuh pada medium (*Carboxy methyl cellulose*) CMC, (Zahidah dan Shovitri, 2013).

Uji degradasi dengan menggunakan metode zona bening adalah uji semi karena data hanya berupa perbandingan antara diameter zona bening dan dengan diameter koloni. Kesulitan metode ini adalah apabila bentuk koloni atau zona bening yang dihasilkan tidak benar-benar berbentuk bulat, atau bahkan tidak bulat sama sekali. (Zverlova *et al.* 2003) juga menyebutkan zona bening yang terbentuk terkait dengan kelarutan dari enzim selulase. Semakin tinggi tingkat kelarutan suatu enzim maka akan semakin besar zona bening yang terbentuk. Diameter zona bening umumnya

berukuran lebih besar dibandingkan dengan diameter koloni, karena enzim selulase disekresikan ke lingkungan sekitarnya oleh bakteri pendegradasi selulosa. Bakteri tidak dapat memasukkan molekul selulosa, karena ukuran selulosa lebih besar daripada ukuran sel bakteri.

Isolat A, B, C, D, E, F, G, dan isolate H selanjutnya diuji dengan pewarnaan gram yang menghasilkan koloni yang berbentuk batang berwarna merah muda. Hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan gram negatif karena dapat mengikat zat warna safranin, perbedaan pengikatan warna pada bakteri gram negatif dan positif disebabkan adanya perbedaan titik isoelektrik dari protoplasma dan permeabilitas membran sitoplasma dinding sel. Titik isoelektrik gram positif pada pH ± 2 sedangkan gram negatif pH ± 5 , karena itu gram positif akan menahan zat warna basa jauh lebih kuat dari gram negatif, rendahnya titik isoelektrik dari bakteri gram positif disebabkan adanya asam ribonukleat dan asam teikoat (Ali, 2005).

Sel bakteri bermuatan mendekati negatif kalau dalam keadaan pH mendekati netral. Dinding sel bakteri gram negatif umumnya dindingnya lebih tipis dari dinding sel gram positif. Yang mengandung persentase lipid atau lemak yang lebih banyak dari dinding sel bakteri gram positif. Selama perlakuan dengan alkohol, lemak ini tertarik keluar sehingga memperbanyak porositas atau menaikkan permeabilitas

dinding sel akibatnya kristal violet iodine (CV-I) tertarik keluar sehingga bakterinya kehilangan warna. Pada bakteri golongan gram positif yang dinding selnya lebih sedikit mengandung lemak akan mengalami dehidrasi karena perlakuan dengan alkohol, sehingga ukuran pori-pori dan permeabilitas dinding sel menjadi berkurang dan CV-I tidak tercuci, inilah yang menyebabkan bakteri golongan positif tetap berwarna ungu (Rahman, 2010). Beberapa bakteri selulolitik yang berbentuk

batang dengan tipe dinding sel Gram-negatif diantaranya *Fibrobacter (Bacteroides) succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium lochheadii*, *B. Succinogenes*, dan *B. Fibrisolvens*. (Thalib *et al.* 2001). Dengan adanya penelitian ini maka dapat dilanjutkan dengan menguji sifat fisiologis, mengukur kadar enzim selulase yang dimiliki bakteri selulolitik yang berasal dari limbah kulit pisang.

KESIMPULAN

Limbah kulit pisang yang berada disekitar distrik Malaimsimsa kota Sorong Papua Barat mengandung beberapa bakteri yang mampu menghidrolisis selulosa. Indeks zona bening tertinggi terdapat pada isolat B sebesar 3 mm dan indeks zona

bening terendah terdapat pada isolat H dengan indeks zona bening 0,8 mm. sedangkan pada isolat A bakteri tersebut tidak mailiki kemampuan dalam menghidrolisis selulosa.

DAFTAR PUSTAKA

Ali, A. 2005. *Mikrobiologi dasar*. State University of Makassar Press. Makassar.

Aswani, K., Saida, L dan Reddy, K. V. 2014. Isolation, Screening, and Characterization of Cellulolytic Bacteria from Forest Soil Sample. *International Journal of Current Microbiology*. 3(10): 679-685.

Ambriyanto, S K. 2010. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Pendegradasi Selulosa dari Serasah*

Daun Rumput Gajah (Pennisetum Purpureum Schaum). Jurusan Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Rahman, F.A. 2010. *Pewarnaan Gram*. <http://fatma.student.umm.ac.id/2010/11/15/pewarnaan-gram>. Diakses tanggal 02 November 2013.

Sari, M., Agustien, U dan Nurmiati, A. 2012. Screening and characterization of cellulolytic thermophylic bacteria

- from Sungai Medang hot spring, Kerinci, Jambi. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. 1(2): 166-171.
- Chaudary, N., Qazi, J L dan Irfan M. 2015. Isolation and Identifiacation of Cellulolytic and Ethanologenic Bacteria from Soil. Iranian Journal of Science and Technolgy. Article in Press.
http://ijsts.shirazu.ac.ir/article_3254.html
- Hatami, S. 2008. Investigation in Aerobic Cellulolitic Bacteria in some of North Forest and Farming Soil. *Amercan-eurasian Journal Agricultural and Enviromental Science*. 3(5) :713-716.
- Lederbeg, J. 2014. *Encyclopedia of Microbiology*, Four-Volume Set. Academic Press. New York.
- Riyanti, E I. 2009. Biomassa Sebagai Bahan Baku Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*. 28(3): 101-110
- Shovitri, M dan Zahidah D. 2013. Isolasi, Karakterisasi dan potensi Bakteri Aerob sebagai Pendegradasi Limbah Organik. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2(1):2337-3520.
- Subowo, Y B. 2010. Uji Aktivitas Selulase dan Ligniselulase dari Beberapa Jamur dan Potensinya Sebagai Pendukung Pertumbuhan. *Berita Biologi* 10(1): 1-6.
- Thalib, A., Haryanto, B., Kuswandi., Hamid, H dan Mulyani. 2001. *Teknik Penyiapan Sediaan Mikroba Anaerobik: Bakteri Selulolitik Batang*. Balai Penelitian Ternak.
- Wood, T M and Bhat, K M. 1988. Methods for Measuring Cellulase Activities. Academic Press. 160: 87-112.
- Zverlova, V V., Holl, W., and Schwarz, H. 2003. Enzymes for digestion of cellulose and other polysaccharides in the gut of longhorn beetle larvae, *Rhagium inquisitor* L. (Col., Cerambycidae). *International biodeterioration & biodegradation*. 51(2):175-179.