

# Eksplorasi Bakteri Selulolitik yang Berpotensi Sebagai Agen *Biofertilizer* dari Tanah Perkebunan Apel Kota Batu, Jawa Timur

Restu Nugraha<sup>1)</sup>, Tri Ardyati<sup>2)</sup>, Suharjono<sup>3)</sup>

<sup>1),2),3)</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

<sup>1)</sup>[restunugraha10@gmail.com](mailto:restunugraha10@gmail.com), <sup>2)</sup>[tri\\_ardvati@yahoo.com](mailto:tri_ardvati@yahoo.com) dan <sup>3)</sup>[calitus@ub.ac.id](mailto:calitus@ub.ac.id)

## ABSTRAK

*Biofertilizer* adalah pupuk yang berasal dari biomassa berbagai mikroorganisme tanah, berfungsi sebagai penyedia hara dalam tanah, sehingga mudah diserap oleh tanaman. Bakteri selulolitik telah banyak dimanfaatkan sebagai salah satu agen *biofertilizer*. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas bakteri selulolitik yang berasal dari tanah perkebunan apel di Kota Batu, Jawa Timur yang berpotensi sebagai *biofertilizer* didasarkan pada kemampuan selulolitik, fiksasi nitrogen, dan pelarut fosfat. Sampel tanah diambil dari tanah perkebunan apel yang terletak di Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu. Isolasi dilakukan dengan metode *serial dilution* kemudian ditumbuhkan pada media C-NFMM (*Cellulose Nitrogen Free Mineral Media*) agar. Uji aktivitas selulolitik isolat bakteri menggunakan pewarnaan *Congo red* 0,1% yang ditandai dengan terbentuknya zona bening. Uji kuantitatif aktivitas selulolitik dilakukan dengan DNS (*dinitrosaly-cylic acid*). Uji kemampuan pemfiksasi nitrogen menggunakan media *N-Free Semisolid Malate* dilanjutkan dengan *Visocolor Alpha Ammonium Detection Kit*. Deteksi aktivitas pelarut fosfat menggunakan media *Pikovskaya agar*. Hasil isolasi didapatkan 13 isolat kemudian dilakukan *screening* hingga didapatkan 3 isolat bakteri yang potensial, yaitu isolat SL4, SL5, dan SL7. Aktivitas selulolitik tertinggi adalah isolat SL4 pada jam ke-24 yaitu sebesar  $0,05 \pm 0,002$  U/ml, sedangkan isolat SL7 pada jam ke-72 sebesar  $0,05 \pm 0,001$  U/ml. Uji potensi sebagai agen *biofertilizer* berdasarkan kemampuan selulolitik, pemfiksasi nitrogen, dan pelarut fosfat didapatkan 3 isolat potensial yaitu SL4, SL5, dan SL7.

Kata kunci : *biofertilizer*, fosfat, nitrogen, selulolitik, tanah

## ABSTRACT

*Biofertilizer* is one kind of fertilizer that is derived from biomass of various microorganisms soil that provide nutrient in the soil. Cellulolytic bacteria has been widely utilized as a *biofertilizer* agent. The objective of this study was used cellulolytic bacteria from soil of apple plantations in Batu City, East Java which potentially as *biofertilizer* based on cellulolytic activity, nitrogen fixation, and phosphate solubility. Soil samples taken from the apple plantation land in the Junggo, Tulungrejo Village, Bumiaji, Batu City. Isolation was performed with serial dilution method then grown on C-NFMM (*Cellulose Nitrogen Free Mineral Media*) agar. Cellulolytic activity of isolated bacteria was assayed using *Congo red* 0.1 % staining, then characterized by the formation of a clear zone. Quantitative assay of cellulolytic activity performed by DNS (*dinitrosaly-cylic acid*) method. Nitrogen fixation ability was assayed using *Nitrogen-Free Semisolid Malate* media continued by *Visocolor Ammonium Alpha Detection Kit*. Detection phosphate solubility activity was done using *Pikovskaya agar*. The highest cellulolytic activity was isolate SL4 at 24 hours was  $0.05 \pm 0.002$  U/ml and isolates SL7 at 72 hours  $0.05 \pm 0.001$  U/ml. Three isolates, SL4, SL5 and SL7 possible to be used as *biofertilizer* agent based on cellulolytic activity, nitrogen-fixing, and phosphate solubility.

Keywords : *biofertilizer*, cellulolytic, nitrogen, phosphate, soil

## PENDAHULUAN

Bidang pertanian merupakan salah satu bidang yang menjadi tumpuan Indonesia sebagai negara agraris. Berbagai usaha telah dilakukan pemerintah dan masyarakat untuk meningkatkan pertanian di Indonesia baik dari segi kuantitas

maupun kualitas produk. Salah satu upaya yang dilakukan adalah pembuatan *biofertilizer*. *Biofertilizer* adalah pupuk yang berasal dari biomassa berbagai mikroorganisme tanah yang berfungsi sebagai penyedia hara dalam tanah, sehingga mudah diserap oleh tanaman [1].

Untuk dapat menciptakan *biofertilizer* yang bersumber dari mikroorganisme, harus digunakan kelompok mikroorganisme unggul yang dapat berperan baik bagi tumbuhan. Sumber yang potensial sebagai penyedia *biofertilizer* adalah bakteri selulolitik atau bakteri pemecah selulosa yang mampu mengikat nitrogen serta melarutkan fosfat. Kombinasi kemampuan bakteri ini dapat membuat unsur-unsur hara penting bagi tanaman dapat diserap lebih mudah.

Bakteri selulolitik mampu menghidrolisis kompleks senyawa selulosa menjadi oligosakarida yang lebih sederhana misalnya glukosa yang digunakan sebagai sumber karbon dan nutrisi bagi pertumbuhannya [2]. Bakteri selulolitik juga banyak dimanfaatkan sebagai *biofertilizer* karena kemampuannya dalam memecah selulosa. Bersamaan dengan semakin berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi, bakteri selulolitik telah banyak dimanfaatkan salah satunya sebagai *biofertilizer* dalam bidang pertanian. Penelitian ini akan menguji aktivitas bakteri selulolitik yang berasal dari tanah perkebunan apel di Batu, Malang, Jawa Timur yang berpotensi sebagai agen *biofertilizer* didasarkan kemampuan selulolitik, fiksasi nitrogen, dan pelarut fosfat.

## METODE PENELITIAN

**Pengambilan sampel tanah.** Sampel tanah diambil dari tanah perkebunan apel Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu, Jawa Timur. Tanah diambil pada kedalaman  $\pm$  0-10 cm dari permukaan tanah pada beberapa titik yang berbeda dengan metode komposit, dan hanya digunakan tanah dari pertanian organik. Pada waktu yang sama, dilakukan juga pengukuran faktor fisik dan kimia tanah seperti temperatur tanah, ketinggian, letak koordinat, kecerahan, dan pH tanah.

**Isolasi bakteri.** Sampel tanah seberat 25 gram dimasukkan dalam larutan garam fisiologis 225 ml. Setelah itu dilakukan metode dilusi hingga didapatkan seri pengenceran  $10^{-7}$ . Selanjutnya, media *Cellulose-Nitrogen Free Mineral Medium* (C-NFMM) agar dituang ke dalam masing-masing cawan petri yang berisi sampel dari masing-masing seri pengenceran.

Media tersebut kemudian diinkubasi dalam suhu  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 5 hari. Setelah isolat tumbuh, dilakukan inokulasi koloni tunggal pada dalam media C-NFMM baru dengan metode *quadrant streak* untuk mendapatkan isolat murni. Stok bakteri disimpan pada media *Nutrient Agar* pada suhu  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Uji kualitatif aktivitas selulolitik.** Isolat bakteri yang telah disubkultur pada media agar miring diinokulasikan ke dalam media CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) agar dengan metode totol dan diinkubasi selama 4-5 hari ( $\pm$  96 jam) pada  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zona bening di sekitar koloni dideteksi dengan menggenangkan reagen *Congo red* (0.1 %) selama 15 menit, kemudian dibilas dengan larutan NaCl 1 M. Hasil (+) ditunjukkan dengan adanya zona bening akibat adanya degradasi selulosa oleh bakteri selulolitik. Indeks zona bening merupakan rasio antara diameter zona bening dengan diameter koloni.

**Uji kuantitatif aktivitas selulolitik.** Uji kuantitatif dilakukan dengan metode DNS (*Dinitrosalicylic Acid*). Sebelumnya dibuat kurva standar glukosa, sebagai dasar perhitungan aktivitas enzim. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda$  540 nm. Perhitungan aktivitas didasarkan pada rumus yang didapat dari kurva standar glukosa.

**Uji kemampuan fiksasi nitrogen.** Kultur bakteri ditumbuhkan dalam media *N-Free Semisolid Malate* dengan metode dilusi hingga pengenceran  $10^{-3}$ . Isolat diinkubasi pada suhu ruang selama 2-5 hari. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna dari pada media. Uji lanjut kemampuan bakteri pemfiksasi nitrogen, digunakan *Visicolor Alpha Ammonium Detection Kit*. Perubahan warna yang terjadi pada sampel dapat menjadi acuan adanya kandungan unsur nitrogen dalam bentuk Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ).

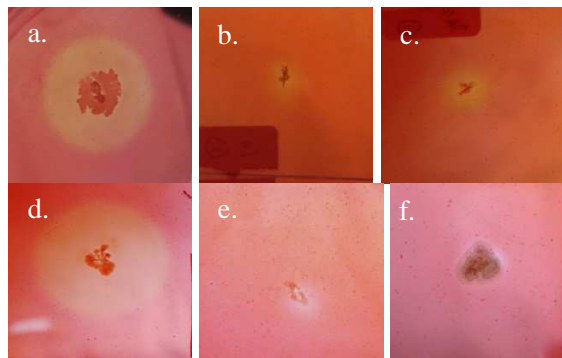
**Uji kemampuan pelarut fosfat.** Isolat murni dalam media NA ditumbuhkan dalam media *Pikovskaya* agar dengan metode totol dan diinkubasi pada suhu  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Hasil (+) ditunjukkan dengan adanya zona bening yang mengindikasikan bahwa isolat

bakteri mampu melarutkan fosfat. Indeks zona bening kemudian diukur.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi dan Seleksi Bakteri Selulolitik.

Isolasi bakteri selulolitik dari sampel tanah didapatkan 13 isolat yaitu SL1, SL2, SL3, SL4, SL5, SL6, SL7, SL8, SL9, SL10, SL11, SL12, dan SL13. Ketigabelas isolat tersebut dibedakan berdasarkan morfologi koloninya. Isolat kemudian dilakukan *screening* aktivitas selulolitik secara kualitatif dengan pewarnaan *Congo red* 0,1 % pada media CMC, kemudian dibilas dengan larutan NaCl 1M.

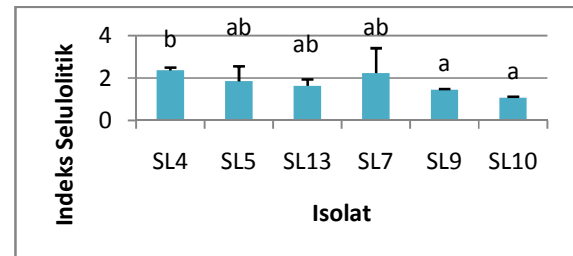


**Gambar 1.** Hasil pewarnaan dengan *Congo red* isolat bakteri selulolitik (inkubasi 30 °C 96 jam) a. SL4, b. SL5, c. SL13, d. SL 7, e. SL9, f. SL10

Selulosa yang terhidrolisis pada medium agar jika digenangi oleh *Congo red* akan menghasilkan zona bening karena adanya reaksi antara *Congo red* dan ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik yang terkandung dalam polimer selulosa. Selulosa sendiri terhidrolisis karena aktivitas enzim selulolitik yang dihasilkan oleh bakteri [3]. Pembilasan dengan larutan NaCl 1 M bertujuan untuk melunturkan pewarna *Congo red* yang terdapat di daerah sekitar koloni yang sehingga zona bening lebih terlihat [4].

Isolat bakteri selulolitik menghasilkan diameter zona bening yang berbeda antara isolat satu dengan lainnya. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah karena ukuran koloni yang berbeda antara satu isolat dengan yang lainnya. Hal ini merupakan kelemahan metode total dimana koloni isolat bakteri yang dihasilkan tidak sama besarnya. Uji

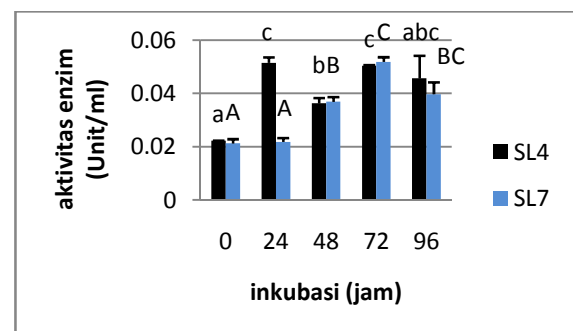
dengan pengamatan diameter zona bening dapat juga dilakukan dengan metode lain seperti menggunakan sumuran maupun metode dengan menggunakan kertas cakram [5].



**Gambar 2.** Indeks selulolitik isolat dengan pewarnaan *Congo red*

Berdasarkan hasil perhitungan indeks selulolitik yang dihasilkan oleh masing-masing isolat, didapatkan bahwa isolat SL4 mempunyai aktivitas selulolitik tertinggi, diikuti oleh isolat SL7. Semakin besar indeks selulolitik yang terbentuk, semakin tinggi pula aktivitas selulolitik yang dihasilkan [6]. Indeks selulolitik terbesar adalah isolat SL4 sebesar 2,36 dan SL7 sebesar 2,23.

**Uji kuantitatif aktivitas selulolitik.** Uji kuantitatif dipilih berdasarkan isolat yang mempunyai indeks selulolitik terbesar berdasarkan uji kualitatif, yaitu isolat SL4 dan SL7. Aktivitas selulolitik dihitung dengan satuan Unit/ml. Hasil uji menunjukkan bahwa aktivitas selulolitik tertinggi isolat SL4 dengan aktivitas terbesar pada jam ke-24 sebesar  $0,051 \pm 0,002$  U/ml, sedangkan isolat SL7 sebesar  $0,051 \pm 0,001$  U/ml pada jam ke-72.



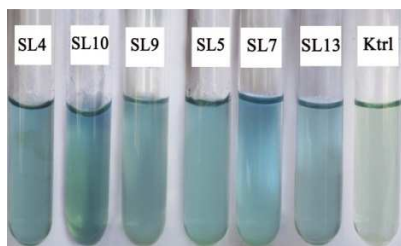
**Gambar 3.** Aktivitas selulolitik isolat SL4 dan SL7 pada media CMC broth

Aktivitas selulolitik dalam satuan unit per milliliter (U/ml) didefinisikan sebagai aktivitas

isolat bakteri yang menghasilkan glukosa, sebagai monomer selulosa, tiap menit [6].

Aktivitas selulolitik kedua isolat, termasuk dalam kategori kecil. Hal ini dapat dibandingkan dengan penelitian lain tentang aktivitas selulolitik. Berdasarkan penelitian oleh Garg & Neelakantan (1982) didapatkan aktivitas selulolitik yang cukup tinggi yaitu 1,1 dan 0,09 U/ml pada isolat uji *Aspergillus terreus* [7]. Aktivitas selulolitik pada *Cellvibrio japonicas* berdasarkan penelitian oleh Jarallah dan Ali (2013) adalah sebesar 0.152 U/ml [8].

**Uji kemampuan fiksasi nitrogen.** Isolat SL4, SL5, SL7, SL9, SL10, SL13 diuji kemampuan fiksasi nitrogennya. Uji dilakukan pada media *N-Free Semisolid Malate*. Berdasarkan hasil yang didapat, semua isolat mempunyai kemampuan fiksasi nitrogen, ditunjukkan dengan perubahan warna dari hijau menjadi kebiruan.



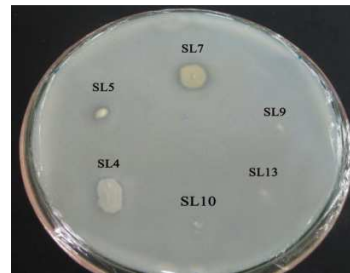
**Gambar 4.** Uji kemampuan fiksasi nitrogen

Perubahan warna yang terjadi pada media *N-Free Semisolid Malate* terjadi karena adanya indikator berupa *Bromothymol blue* yang berubah menjadi biru pada pH yang lebih tinggi, akibat aktivitas nitrogenase [9].

Uji dilanjutkan menggunakan *Visicolor Alpha Ammonium Detection Kit* untuk mendapatkan kisaran kemampuan isolat bakteri fiksasi nitrogen. Uji dilakukan pada 3 isolat yang mempunyai aktivitas selulolitik yaitu isolat SL4, SL5, dan SL7. Berdasarkan pengamatan, isolat SL5 mempunyai kandungan ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) tertinggi yaitu sebesar 2 mg/L, isolat SL4 sebesar 1 mg/L, dan isolat SL7 sebesar 0,5 mg/L. Unsur nitrogen di udara ( $\text{N}_2$ ) tidak dapat langsung diserap oleh tanaman, sehingga tanaman memanfaatkan ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dalam proses yang disebut fiksasi nitrogen. Fiksasi nitrogen terjadi karena aktivitas enzim nitrogenase mempunyai

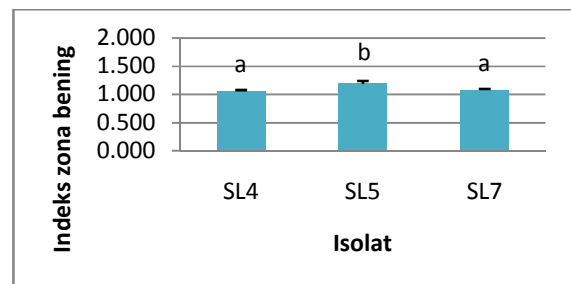
keefektifan yang berbeda-beda antara satu isolat dengan isolat lainnya.

**Uji kemampuan pelarut fosfat.** Uji dilakukan pada 6 isolat yang mempunyai kemampuan selulolitik yaitu SL4, SL5, SL7, SL9, SL10, dan SL13.



**Gambar 5.** Uji kemampuan pelarut fosfat dengan medium *Pikovskaya* agar

Hasil menunjukkan bahwa hanya terdapat tiga isolat yang menghasilkan zona bening pada media *Pikovskaya* agar setelah inkubasi 48 jam, yaitu isolat SL4, SL5, dan SL7. Terbentuknya zona bening dapat terjadi karena isolat bakteri yang tumbuh pada media *Pikovskaya* mampu melarutkan fosfat, yang terdapat dalam media yaitu  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ . Kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat pada media *Pikovskaya* agar dapat dilihat dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri, akibat aktivitas enzim fosfatase [10].



**Gambar 6.** Indeks zona bening isolat bakteri pelarut fosfat

Analisis indeks zona bening yang dihasilkan oleh ketiga isolat didapatkan bahwa isolat SL5 mempunyai indeks zona bening terbesar yaitu sebesar  $1,18 \pm 0,04$ , isolat SL7 sebesar  $1,08 \pm 0,01$ , dan isolat SL4 sebesar  $1,06 \pm 0,01$ . Zona bening yang terbentuk menunjukkan besar kecilnya kemampuan bakteri

dalam melarutkan unsur fosfor [11]. Bakteri pelarut fosfat mampu mengubah unsur fosfor (P) menjadi  $H_2PO_4^-$ , agar dapat diserap oleh tanaman dalam bentuk fosfat terlarut.

### KESIMPULAN

Hasil isolasi bakteri selulolitik menunjukkan bahwa isolat SL4 dan SL7 mempunyai kemampuan selulolitik terbesar didasarkan pada indeks zona bening yang dihasilkan, SL4 sebesar 2,36 dan SL7 sebesar 2,23. Aktivitas selulolitik tertinggi pada isolat SL4 berada pada jam ke-24 yaitu sebesar  $0,05 \pm 0,002$  U/ml, sedangkan isolat SL7 pada jam ke-72 sebesar  $0,05 \pm 0,001$  U/ml. Uji potensi sebagai agen *biofertilizer*, didapatkan isolat SL4, SL7, dan SL5 yang mempunyai potensi sebagai agen *biofertilizer* karena ketiganya mempunyai kemampuan selulolitik, fiksasi nitrogen, dan pelarut fosfat.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diucapkan kepada Dr. Suharjono, dalam proyek penelitian yang didanai oleh DPP/SPP, sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik.

### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Simanungkalit, R.D.M., D.A. Suriadikarta., R. Saraswati., D. Setyorini & W. Hartatik. 2006. Pupuk Organik dan Pupuk hayati. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian. Bogor.
- [2] Ibrahim, A.S.S., & El-diwany. 2007. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *J Appl Sci* 1:473-478.
- [3] Steensma, D.P. 2001. Congo red out of Africa: *archives of pathology and laboratory medicine* 125:250-252.
- [4] Sumardi. 2004. Isolasi, Karakterisasi, dan Produksi  $\beta$ -mannanase Ekstraseluler dari *Geobacillusstrearothermophilus*. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [5] Mulyadi, M., Wuryanti & P.S. Ria. 2013. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) dalam Etanol melalui Metode Difusi Cakram. Universitas Diponegoro, Kimia. Semarang.
- [6] Apun, K., B.C. Jong & M.A. Salleh. 2000. Screening and Isolation of A Cellulolytic and Amylolytic *Bacillus* from Sago Pith Waste. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46: 263-267.
- [7] Garg, S.K. & Neelakantan. 1982. Effect of Nutritional Factors on Cellulase Enzyme and Microbial Protein Production by *Aspergillus terreus* and Its Evaluation. Dairy Microbiology Division, National Dairy Research Institute. India.
- [8] Jarallah, E. M. & Ali. 2013. Cellulolytic Activity of *Cellvibrio japonicus* and Complete Cellulase System. Biology Department, College of Science, University of Babylon. Iraq.
- [9] Haran, S. & N. Ansori. 1992. Bioteknologi Pertanian. Bogor. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [10] Purwaningsih, S. 2003. Isolasi, Populasi, dan Karakterisasi Bakteri Pelarut Fosfat pada Tanah dari Taman Nasional Bogani Nani Wartabone. Sulawesi Utara.
- [11] Rachmiati, Y. 1995. Bakteri Pelarut Fosfat dari Rizozfer Tanaman dan Kemampuannya dalam Melarutkan Fosfat. Proseding Kongres Nasional VI HITI. Jakarta.