

KEMAMPUAN BIODEGRADASI BAKTERI SELULOLITIK PADA EKOSISTEM MANGROVE

BIODEGRADATION ABILITY OF CELLULOLITIC BACTERIA IN MANGROVE ECOSYSTEM

Fiki Harjuni¹, Nursyirwan², Irwan Effendi²

1. Mahasiswa Pascasarjana Ilmu Kelautan Universitas Riau
 2. Dosen Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau
- E-mail: fikiharjuni21@gmail.com

ABSTRAK

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang memiliki kemampuan menghidrolisis kompleks selulosa menjadi oligosakarida yang lebih kecil dan akhirnya menjadi glukosa. Bakteri selulolitik telah banyak dikaji potensinya dalam memproduksi enzim selulase dan telah dimanfaatkan dalam berbagai bidang, seperti pada bidang pertanian, perikanan, industri dan kedokteran. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan mikroba selulolitik, mengetahui waktu optimum produksi enzim selulolitik dan bagaimana kemampuan degradasi bakteri selulolitik terpilih terhadap serasah mangrove. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juni 2019 di Laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau. Penelitian ini menggunakan metode survei dan dilanjutkan dengan analisis di laboratorium. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolasi, seleksi (Identifikasi mikroba pada sedimen hutan mangrove Stasiun Kelautan Dumai), diperoleh 24 isolat yang memiliki kemampuan tumbuh dalam media yang mengandung CMC dengan aktifitas selulolitik tertinggi terdapat pada isolat BS.ST2.8. Hasil karakteristik isolat bakteri selulolitik secara fenotip dan genotip diketahui bahwa ketiga isolat tersebut adalah *B. toyonensis*. Enzim selulase terbanyak dihasilkan oleh isolat bakteri BS.ST2.8 terjadi pada jam ke -78 setelah inkubasi. Dari hasil uji lebih lanjut dengan menggunakan beberapa dosis enzim selulase isolat BS.ST2.8 terhadap substrat serasah mangrove diketahui bahwa secara umum dapat mendegradasi serat kasar pada serasah mangrove pada dosis 50% penurunan fraksi serat NDF, ADF, selulosa dan hemiselulosa.

Kata kunci: Kemampuan biodegradasi, bakteri selulolitik

ABSTRACT

Cellulolytic bacteria are bacteria that have the ability to hydrolyze cellulose complexes into smaller oligosaccharides and ultimately to glucose where cellulolytic bacteria have been studied for their potential in producing cellulase enzymes that have been utilized in various fields, such as agriculture, fisheries, industry and medicine. The purposes of this study were to obtain cellulolytic microba, determine the optimum time of cellulolytic enzyme production and how the degradation ability of selected cellulolytic bacteria to mangrove litter. This research was carried out on February to June 2019 at the Marine Myrobiology Laboratory of the Faculty of Fisheries and Marine, Riau University. This study used survey method and was followed by analyzing in the laboratory. The results showed that isolation, selection (identification of microbes in mangrove forest sediments in the Dumai Marine Station), obtained 24 isolates that have the ability to grow in media containing CMC with activity. The highest cellulolite was found in isolates BS.ST2.8. The results of the phenotype and genotype isolates of cellulolytic bacteria were known that the three isolates were *B. toyonensis*. Most cellulase enzymes produced by bacterial isolate BS.ST2.8 occurred at the 78th hour after incubation. From the results of further tests using several doses of cellulase enzyme isolate BS.ST2.8 against mangrove litter substrate, it is known that generally can degrade coarse fibers in mangrove litter at a dose of 50% decrease in NDF, ADF, cellulose and hemicellulose fiber fractions.

Keywords: biodegradation ability, cellulolytic bacteria

1. Pendahuluan

Pemanfaatan senyawa biologi seperti enzim yang berasal dari mikroorganisme seperti bakteri dan fungi saat ini terus meningkat, sejalan perkembangan dan kebutuhannya di dalam berbagai industri. Enzim banyak dimanfaatkan dalam kehidupan manusia mulai dari bidang pertanian hingga kedokteran (Lageiro *et al.*, 2007). Enzim selulase (selulolitik), misalnya, banyak digunakan dalam berbagai jenis industri, antara lain industri makanan dan minuman, industri pulp dan kertas, industri tekstil, industri deterjen, industri pakan ternak dan pertanian. Di bidang perikanan, enzim selulase diketahui pula dapat digunakan dalam mengolah limbah organik pada budidaya tambak udang (Setiyati dan Subagyo, 2012), dan limbah dari pengolahan rumput laut (Dini dan Munifah, 2014).

Mikroorganisme penghasil enzim banyak dijumpai di alam, seperti dari air, tanah dan biota, termasuk pada ekosistem mangrove. Enzim ekstraseluler (proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulase) merupakan enzim yang diproduksi oleh bakteri yang ditemukan pada sedimen dari ekosistem mangrove (Setiyati dan Subagyo, 2012). Bakteri selulolitik, yaitu bakteri pengurai selulosa, banyak dijumpai dari berbagai sumber. Sumber alami bakteri ini telah diisolasi dari tanah (Irfan *et al.*, 2012; Gunavathy dan Boominathan, 2015), dan dari tanah mangrove (Maulani *et al.*, 2016).

Mangrove merupakan ekosistem pesisir yang sangat produktif dimana bakteri yang terdapat di kawasan ini berperan aktif dalam biomineralisasi dan biotransformasi mineral. Serasah yang berasal dari daun mangrove yang jatuh ke tanah merupakan tempat hidup bagi bakteri, jamur dan mikroorganisme lainnya. Selain itu serasah merupakan sumber utama selulosa, sehingga memungkinkan kandungan selulosa di tanah mangrove tinggi. Proses penguraian selulosa sangat bergantung kepada keberadaan enzim selulase yang dimiliki oleh mikroorganisme pengurai yaitu bakteri selulolitik. Adanya aktivitas bakteri pengurai inilah yang menyebabkan produktivitas ekosistem mangrove menjadi tinggi. Pada penelitian yang dilakukan terhadap dekomposisi serasah di kawasan pesisir Kuala Indragiri Kabupaten Indragiri Hilir Provinsi Riau didapatkan tiga genus bakteri yang berperan, yaitu *Pseudomonas*, *Xanthomonas* dan *Bacillus* (Simanjuntak *et al.*, 2015).

Stasiun Kelautan Dumai Provinsi Riau memiliki areal konservasi hutan mangrove yang cukup luas, dan memiliki beragam jenis mangrove. Beberapa jenis mangrove yang banyak dijumpai antara lain adalah *Avicennia* sp., *Rhizophora* sp., *Sonneratia* sp. dan *Nypa* sp. Berbagai penelitian telah banyak dilakukan pada ekosistem mangrove tersebut, antara lain mengenai makrobiota, nutrien dan analisis logam berat. Namun penelitian mikrobiologi masih belum

banyak dilakukan. Mengingat pentingnya keberadaan bakteri khususnya bakteri selulolitik sebagai pendaur zat hara pada ekosistem mangrove, dan pemanfaatannya dalam bidang bioteknologi, maka perlu dilakukan penelitian mikrobiologi pada ekosistem mangrove di Stasiun Kelautan Dumai.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan mikroba selulolitik, mengetahui waktu optimum produksi enzim selulolitik dan bagaimana kemampuan degradasi bakteri selulolitik terpilih terhadap serasah mangrove.

2. Metode Penelitian

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juni 2019 di Laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode survei dan dilanjutkan dengan analisis di laboratorium. Pengumpulan data melalui pengamatan dan pengukuran parameter lingkungan di lapangan, dan analisis sampel di laboratorium.

Prosedur Penelitian

Penentuan Lokasi Penelitian

Lokasi pengambilan sampel ditetapkan pada satu lokasi tiga titik stasiun dalam wilayah konservasi mangrove Stasiun Kelautan Dumai. Sampel sedimen diambil secara komposit pada lapisan permukaan dengan menggunakan sekop, dan diambil pada saat surut pada zona yang ditumbuhi mangrove. Sampel sedimen dimasukkan ke dalam kantong plastik steril, dan disimpan di dalam *ice box* selama transportasi ke laboratorium.

Pengukuran Kondisi Fisika-Kimia Lingkungan Lokasi Pengambilan Sampel

Parameter fisika-kimia lingkungan yang diukur adalah suhu tanah, dengan menggunakan *soil tester*, kelembaban tanah, dan pH tanah

Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah mangrove sebanyak 10gram dengan menggunakan *cylinder crop* pada kedalaman 10-30 cm di bawah permukaan tanah. Sampel tanah yang telah diambil, disimpan ke dalam plastik dan diberi label sesuai dengan lokasi stasiun.

Isolasi, Seleksi (Identifikasi Mikroba Selulolitik Pada Sedimen Di Kawasan Hutan Mangrove Stasiun Kelautan Dumai).

Isolasi bakteri selulolitik

Sebanyak 10gram sampel sedimen dimasukkan ke dalam erlenmeyer, dan disuspensi dengan cara menambahkan air laut steril hingga mencapai volume 100 mL. Selanjutnya dibuat seri pengenceran dari 10^{-1} hingga 10^{-3} dengan ulangan masing-masing tiga kali. Sebanyak satu mL dari tiap-tiap pengenceran diambil dan dibiakkan di dalam medium CMC dengan teknik *pour plate*, dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh diidentifikasi berdasarkan perbedaan warna, bentuk dan ukurannya. Setiap jenis koloni yang didapat dimurnikan dengan metode penggoresan kuadran sampai didapatkan koloni bakteri yang tunggal dan seragam untuk selanjutnya diseleksi secara kualitatif

Seleksi bakteri selulolitik secara kualitatif.

Seleksi bakteri selulolitik dilakukan dengan cara pengujian aktifitas selulase secara kualitatif. Tujuan dari percobaan ini adalah untuk mengetahui ada atau tidaknya aktifitas selulolitik dari suatu isolat bakteri. Uji kualitatif mikroba selulolitik dilakukan dengan cara melihat adanya zona bening pada media padat selektif CMC 1% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 78 jam. Semakin besar indeks selulolitik yang dihasilkan maka semakin besar enzim yang dihasilkan oleh isolat bakteri tersebut. Indeks selulolitik atau indeks aktifitas selulase (IAS) diperoleh dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Kader dan Omar 1998):

$$\text{Indeks Selulolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening (mm)} - \text{Diameter koloni (mm)}}{\text{Diameter Koloni (mm)}}$$

Karakteristik Isolat Bakteri

Karakter isolat bakteri selulolitik secara fenotip.

Identifikasi bakteri pada pengamatan makroskopis dilakukan terhadap morfologi koloni seperti bentuk, warna, tepi, elevasi, dan ukuran koloni. Pengamatan secara mikroskopis meliputi pengamatan morfologi dan warna sel, uji sifat fisik dan biokimia yang meliputi uji pewarnaan Gram, motilitas, uji katalase, oksidase, gelatinase, uji oksidatif-fermentatif (OF), uji sitrat, uji urease dan katabolisme karbohidrat.

Karakter Isolat Bakteri Selulolitik Secara Genotip.

Identifikasi isolat bakteri secara molekuler dilakukan berdasarkan sekuen gen penyandi 16S-rDNA (Suwanto *et al.* 2000). Identifikasi isolat dilakukan dengan menentukan sekuen gen penyandi 16S-rRNA melalui PCR dan membandingkan dengan data sekuen yang tersedia di *Gene Bank*. Tahap-tahap analisis isolasi bakteri secara molekuler meliputi a) amplifikasi gen penyandi 16S-rRNA dengan PCR, b) *sequencing* hasil PCR. Hasil sekuensing yang diperoleh berupa data mentah yang diolah menggunakan program bioedit. Data yang diperoleh

dari hasil program bioedit kemudian dimasukkan kedalam program NCBI BLAST sehingga diketahui jenis bakteri yang didapat.

Produksi Enzim Selulolitik dari Isolat Bakteri

Penentuan Waktu Optimum Produksi Enzim Selulase

Uji Penentuan Waktu Optimum Produksi Enzim Selulase didasarkan pada metode yang digunakan Melati (2014). Penentuan waktu optimum produksi enzim selulase diawali dengan penentuan waktu pertumbuhan bakteri pada inokulum yang akan digunakan. Penentuan waktu pertumbuhan eksponensial bakteri dilakukan dengan mengkultur 2 lup isolat ke dalam 50 mL media cair *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC). Kultur diinkubasi pada suhu 50°C di dalam penangas goyang dengan kecepatan agitasi 150 rpm. Pengambilan sampel dilakukan pada jam ke 24, 48, 72, 78 dan 96 untuk diukur nilai *optical density* (OD) pada λ 600 nm dan setiap kali pengukuran dilakukan juga pengujian aktifitas enzim selulase pada λ 550 nm. Setelah itu, dibuat kurva pertumbuhan bakteri untuk menentukan waktu pertumbuhan bakteri tersebut. Waktu pertumbuhan dengan aktifitas enzim selulase tertinggi digunakan sebagai waktu optimum produksi enzim selulase

Produksi Enzim

Produksi enzim selulase dilakukan berdasarkan prosedur dan waktu inkubasi yang telah diketahui aktifitas selulase tertinggi dilihat dari uji aktifitas selulase pada waktu 78 jam menggunakan metode Melati (2014) yang telah dimodifikasi. Media pertumbuhan produksi diinkubasi pada suhu 50°C di dalam penangas goyang dengan kecepatan agitasi 150 rpm, kemudian enzim selulase dipanen selama waktu produksi tertinggi yang telah didapatkan sebelumnya. Kultur sel pada media produksi yang mengandung enzim selulase ekstraseluler disentrifugasi pada kecepatan 9.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan larutan enzim dengan pelet bakteri. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian disimpan pada suhu 10°C sebagai ekstrak kasar.

Kemampuan Degradasi Bakteri Selulolitik pada Serasah Mangrove

Pengambilan dan pengumpulan serasah mangrove

Metode yang digunakan untuk pengumpulan serasah adalah metode *litter-trap* (jaring penampung serasah) (Brown dalam Yulma, 2017). Jaring penampung serasah berbentuk bujur sangkar dengan luas jaring 1×1 m, tinggi 0,75 m dan ukuran mata jaring (*mesh size*) 0,5 cm. Sampel diambil secara acak pada 3 lokasi yang berbeda. Pengambilan serasah dilakukan selama tujuh hari, hal ini dianggap bahwa daun mangrove dari awal tumbuh sampai tua dan gugur selama tujuh hari.

Uji Kemampuan Isolat Bakteri dalam Mendegradasi Serasah Mangrove

Untuk mengetahui apakah bakteri uji dapat mendegradasi serasah mangrove, dilakukan percobaan yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri atas tiga perlakuan dan tiga kali ulangan. Perlakuan yang diberikan adalah dosis enzim selulase dari mikroba terpilih yaitu: 0, 25 dan 50 %. Preparasi substrat (daun mangrove) dilakukan dengan cara merendam substrat di dalam air selama 24 jam dan dikeringkan pada suhu 70 °C dalam oven selama 3 hari. Kemudian substrat dihaluskan menggunakan alat blender dan diayak dengan saringan 100 mesh. Sebanyak 50 g substrat dimasukkan ke dalam wadah plastik, kemudian ditambahkan air sebanyak 150 % dan dikukus selama 30 menit. Setelah dingin ditambahkan enzim kasar selulase sesuai perlakuan, dan kemudian diinkubasi selama 2 hari pada suhu 50 °C. Parameter yang diamati adalah fraksi serat yang terdiri atas neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), lignin, selulosa, dan hemiselulosa, kadar gula pereduksi dan protein terlarut. Parameter tersebut dianalisis menggunakan SPSS 16.0.

2.4. Analisis Data

Data pertumbuhan koloni dan karakterisasi bakteri disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Selanjutnya data dianalisis secara deskriptif. Data pertumbuhan dan koloni bakteri juga dilihat hubungannya dengan faktor lingkungan sedimen. Untuk melihat isolat bakteri yang telah diuji kemampuan mendegradasi selulosa digunakan Uji ANOVA, Jika nilai uji menunjukkan perbedaan yang signifikan dilakukan uji lanjut.

3. Hasil dan Pembahasan

Kondisi Fisika-Kimia Lingkungan Serta Titik Koordinat Lokasi Pengambilan Sampel

Tabel 1. Kondisi Fisika-Kimia Lingkungan berdasarkan Titik koordinat Lokasi Pengambilan Sampel

Lokasi	Ph	Kelembapan Tanah (%)	Koordinat
ST1.P1.P1	7	80	N = 01 0 41' 50,57 " E = 101 0 23' 19,17 "
ST1.P1.P2	7	95	
ST1.P1.P3	7	85	
ST2.P1.P1	7	95	N = 01 0 42' 54,39 " E = 101 0 23' 15,31 "
ST2.P1.P2	7	95	
ST2.P1.P3	7	95	
ST3.P1.P1	7	95	N = 01 0 42' 54,39 " E = 101 0 23' 15,31 "
ST3.P1.P2	7	95	
ST3.P1.P3	7	95	

Kordinat dan lokasi pengambilan sampel, faktor lingkungan yang diukur (faktor fisika dan kimia) disajikan pada Tabel 1. Faktor fisika tanah hutan mangrove yang diukur adalah kelembapan tanah, sedangkan faktor kimia tanah mangrov yang diukur adalah derajat keasaman (pH).

Isolasi, Seleksi (Identifikasi Mikroba Selulolitik pada Sedimen dari Kawasan Hutan Mangrove Stasiun Kelautan Dumai).

Hasil isolasi dari mikroba pada sedimen dari hutan mangrove Stasiun Kelautan Dumai diperoleh 24 isolat yang memiliki kemampuan tumbuh dalam media yang mengandung CMC, yaitu suatu polisakarida yang berfungsi sebagai indikator selulosa. Selulase mempunyai potensi yang cukup besar dalam proses sakarifikasi lignoselulosa menjadi gula yang dapat digunakan untuk produksi bioetanol, asam laktat, dan *single cell* protein (Maki *et al.*, 2009). Ciri morfologi dari koloni ke 24 isolat tersebut dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 2. Ciri Morfologi Koloni isolate berdasarkan sampling asal stasiun pengambilan sampel

Stasiun Sampling	Kode	Warna	Bentuk Koloni	Pinggiran/ Tepian	Permukaan/ Elevasi
ST1	B.S. ST1.1	Putih kngn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST1.2	Putih kngn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST1.3	Putih kmrhn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST1.4	Putih kmrhn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST1.5	Putih kngn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST1.6	Putih kngn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST1.7	Putih kmrhn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST1.8	Putih Kmrhn	Bundar	Licin	Timbul
ST2	B.S. ST2.1	Putih Kngn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST2.2	Putih Kngn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST2.3	Kuning	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST2.4	Kuning	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST2.5	Merah	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST2.6	Merah	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST2.7	Putih	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST2.8	Putih	Bundar	Licin	Timbul
ST3	B.S. ST3.1	Putih kngn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST3.2	Putih kngn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST3.3	Putih Kmrhn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST3.4	Putih Kmrhn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST3.5	Putih	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST3.6	Putih	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST3.7	Putih kngn	Bundar	Licin	Timbul
	B.S. ST3.8	Putih kngn	Bundar	Licin	Timbul

Dua puluh empat isolat yang tumbuh dalam media CMC 1 % kemudian diuji lebih lanjut untuk mengetahui aktifitas enzim selulolitiknya dengan mengukur zona bening.

Berdasarkan uji kualitatif enzim selulolitik menggunakan metode pewarnaan Congo red 0,1 %, diperoleh 21 isolat yang menghasilkan zona bening. Besar zona bening yang terbentuk dan indeks selulolitik dari masing-masing isolat disajikan pada Gambar 1.

Hasil uji aktifitas selulolitik (zona bening) dan indeks selulolitik, hasil hidrolisis CMC 1% dari bakteri asal sedimen mangrove pada setiap stasiun diperoleh 3 isolat bakteri yang mempunyai aktifitas selulolitik (zona bening) yang tertinggi (Tabel 3).

Tabel 3. Aktifitas selulolitik (zona bening) dan indeks selulolitik hasil hidrolisis CMC 1% dari bakteri asal sedimen mangrove pada setiap stasiun.

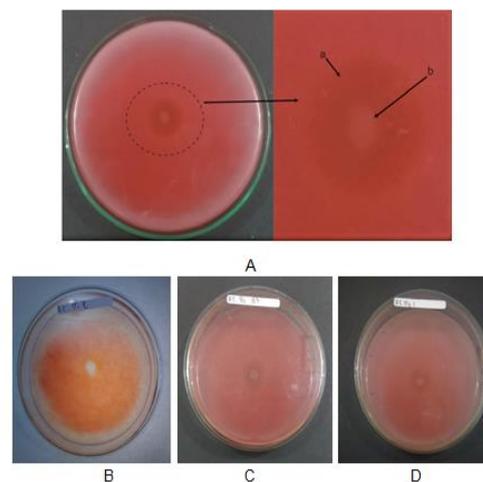
Stasiun Sampling	Kode	Aktifitas Zona Hambat (mm)	Diameter Koloni (mm)	Indeks Selulolitik
Stasiun 1	BS.ST1.2	20.42	8.68	1.36±0.23
	BS.ST1.6	19.05	11.42	0.67±0.29
	BS.ST1.7	22.58	9.28	1.46±0.35
Stasiun 2	BS.ST2.3	15.98	9.38	0.79±0.44
	BS.ST2.6	20.98	12.85	0.69±0.38
	BS.ST2.8	21.15	7.38	2.12±1.04
Stasiun 3	BS.ST3.1	19.15	8.05	1.38±0.33
	BS.ST3.4	19.32	7.22	1.76±0.59
	BS.ST3.8	19.25	9.28	1.10±0.34

Keterangan : BS = Bakteri Selulolitik

Dari hasil uji aktifitas enzim secara kualitatif menunjukkan bahwa aktifitas enzim selulolitik tertinggi adalah pada isolat BS.ST2.8 yaitu 2.21 ± 1.04 dan aktifitas enzim selulolitik terendah pada isolat BS.ST1.6 yaitu 0.67 ± 0.29 . Indeks selulolitik ini menunjukkan kemampuan isolat tersebut dalam mendegradasi selulosa.

Pada proses penapisan, pembentukan zona bening diproduksi oleh mikroorganisme selulolitik (Saini *et al.*, 2012). Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan (Meryandini *et al.*, 2009; Sunarti *et al.*, 2010). Hal ini dikarenakan perubahan struktur selulosa yang berserat menjadi glukosa dengan struktur menjadi non serat. Media CMC yang terhidrolisis oleh enzim selulase jika digenangi oleh pewarna *congo red* tidak akan terwarnai. Interaksi ini berlangsung secara non-kovalen. *Congo red* dijadikan indikator terjadinya degradasi β -D-glukan dalam media agar (Hartanti, 2010).

Besarnya zona bening yang dihasilkan oleh setiap isolat bakteri yang memiliki perbedaan berhubungan dengan kemampuan masing-masing isolat bakteri yang menghasilkan enzim selulase. Isolat bakteri yang memiliki aktivitas enzim selulase yang tinggi dapat menghidrolisis selulosa menjadi glukosa dan menunjukkan zona bening yang besar disekitar koloni. Zona bening dari isolat terpilih (ST1-3) disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Zona bening hasil hidrolisis cmc 1%: A (a. zona bening; b. koloni bakteri) B. isolate B.S.ST1.7 (stasiun 1), C. isolate B.S.ST2.8.3 (stasiun 2), D. isolate B.S.St3.1 (stasiun 3).

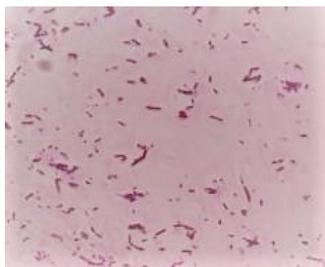
Karakteristik Isolat Bakteri

Karakter Fenotif

Kesembilan isolat bakteri yang memiliki zona bening yang paling tinggi kemudian diidentifikasi secara morfologi dan biokimia dan hasilnya disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 2.

Tabel 4. Hasil identifikasi biokimia isolat bakteri selulolitik asal pada sedimen dari kawasan hutan mangrove Stasiun Kelautan Dumai

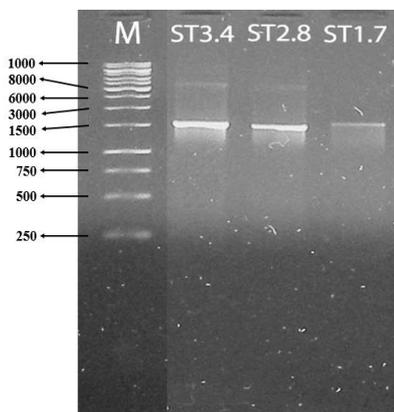
Jenis Uji	Kode Isolat Bakteri								
	BS.ST1.2	BS.ST1.6	BS.ST1.7	BS.ST2.3	BS.ST2.6	BS.ST2.8	BS.ST3.4	BS.ST3.4	BS.ST3.8
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bentuk	Batang Rantai Pendek								
Citrat	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2S	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Motilitas	Motil	Motil	Motil	Motil	Motil	Motil	Inmotil	Inmotil	Motil
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSIA	Kuning								



Gambar 2. Morfologi sel Isolat bakteri BS.ST2.8

Karakter Genotif

Dari Sembilan isolat bakteri hasil uji aktifitas selulolitik, karakteristik isolat bakteri, dipilih tiga isolat bakteri yang menghasilkan zona bening yang paling tinggi (BS.ST1.7, BS.ST2.8 dan BS.ST3.4). Kemudian dilanjutkan ke proses amplifikasi gen 16S rRNA (Elektroforesis DNA). Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 3. Tampak pita amplikon berada pada ukuran 1500 bp.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis DNA Isolat Uji. Keterangan: Marker = 10000 pasang basa, ST1.7 = Isolat bakteri BS.ST1.7, ST2.8 = Isolat bakteri BS.ST2.8, ST3.4 = Isolat bakteri BS.ST3.4

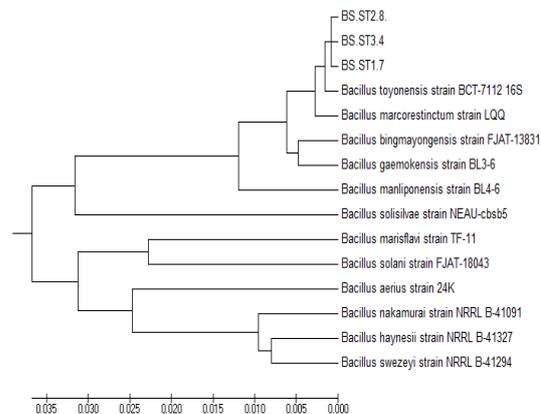
Amplifikasi isolat bakteri yang memiliki pita tunggal menunjukkan bahwa primer yang digunakan adalah primer spesifik untuk mengaplifikasi gen 16S rRNA pada bakteri. Amplifikasi 16S rRNA telah menjadi standart untuk mempelajari filogenetik dan keanekaragaman dari mikroorganisme laut.

Hasil dari pembacaan pada program BLAST dapat dilihat pada Tabel. 5.

Tabel 5. Hasil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

Isolat	Spesies	Strain	Kode akses	Referensi	Homolog	Stasiun
BS.ST1.7	<i>Bacillus toyonensis</i>	BCT-7112	NR_121761.1	Jimenez (2013)	99.60%	1
BS.ST2.8	<i>Bacillus toyonensis</i>	BCT-7112	NR_121761.1	Jimenez (2013)	99.44%	2
BS.ST 3.4	<i>Bacillus toyonensis</i>	BCT-7112	NR_121761.1	Jimenez (2013)	99.53%	3

Tampilan dalam bentuk pohon filogenetik menggunakan aplikasi UPGMA, diketahui bahwa kekerabatan yang dekat akan membentuk satu cabang dengan isolat sampel, sebagaimana terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pohon Filogenetik sampel Isolat (BS.ST1.7, BS.ST2.8 dan BS.ST3.4) Menggunakan UPGMA

Hasil filogenetik menggunakan aplikasi UPGMA, kekerabatan yang dekat dengan membentuk satu cabang dengan ketiga isolat sampel ialah (*Bacillus toyonensis*) dengan tingkat homolog 99,50–99,60%. Menurut Hagstrom *et al.* dalam Feliatra *et al.* (2015) menyatakan bahwa isolat yang mempunyai persamaan homolog antara lebih dari 97% dapat mewakili pada tingkat spesies yang sama.

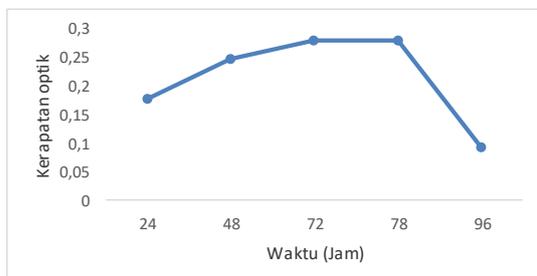
Bacillus toyonensis adalah bakteri gram positif berbentuk batang, bakteri ini dapat membentuk cabang independen homogen dalam genus *Bacillus* dan dapat membentuk spora. Berdasarkan penelitian Casanovas *et al.* (2014), bakteri *B. toyonensis* yang membentuk spora yang layak digunakan sebagai bahan aktif dari TOYOCERIN pakan aditif. Hal ini didukung dalam penelitian Jimenez *et al.*, (2013), yang menyatakan bahwa TOYOCERIN telah menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri patogen.

Produksi Enzim Selulase yang Dihasilkan dari Mikroba Terpilih

Dari hasil tahap satu diketahui isolat BS.ST2.8 (*Bacillus toyonensis*) mempunyai aktifitas enzim selulase yang tinggi, sehingga isolat ini digunakan untuk percobaan tahap selanjutnya. Pada percobaan penentuan waktu optimum produksi enzim selulase, isolat BS.ST2.8 ditumbuhkan pada media CMC 1 % pada suhu inkubasi 28 °C. pertumbuhan bakteri dilihat dari nilai kerapatan optik yang dihasilkan pada setiap 24 jam, pengukuran selama 96 jam pada panjang gelombang 600 nm. Selain dilihat dari kerapatan optiknya, optimasi produksi enzim selulase dilihat dengan terbentuknya aktifitas selulase

tertinggi pada waktu inkubasi yang telah dilakukan sebelumnya yakni pada waktu 78 jam. Kurva pertumbuhan isolat bakteri BS.ST2.8 disajikan dalam bentuk Gambar 5.

Gambar 5. Pertumbuhan Isolat BS.ST2.8



Puncak waktu optimum untuk produksi enzim selulase terjadi pada jam ke 78 yaitu sebesar 0,281 μ /mL dengan kadar glukosa yang dilepaskan sebesar 0,06276 mg/L (Tabel. 7). Pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang cepat. Madigan *et al.*, (2009) menyatakan bahwa fase logaritmik merupakan fase pertumbuhan bakteri yang berlangsung sangat cepat karena terjadi penggandaan sel bakteri secara cepat.

Waktu ini akan digunakan untuk tahap selanjutnya. Isolat BS.ST2.8 mengalami fase eksponensial pada waktu inkubasi 24 jam sampai dengan jam ke 72. Pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang cepat.

Tabel 7. Konsentrasi gula pereduksi pada berbagai waktu inkubasi

Periode Inkubasi (Jam)	Konsentrasi Gula Pereduksi (mg/mL)
24	0.0446 \pm 0.0056
48	0.0452 \pm 0.0067
72	0.0475 \pm 0.0054
78	0.0628 \pm 0.0129
96	0.0493 \pm 0.0053

Uji Kemampuan Degradasi Bakteri Selulolitik Terhadap Serasah Mangrove.

Dari hasil uji aktifitas selulase secara kualitatif, bakteri BS.ST2.8 diketahui bahwa mempunyai aktifitas selulolitik yang tinggi sehingga efektif dalam mendegradasi serasah daun mangrove. Dalam tahap ini dilihat lebih lanjut bagai mana pengaruh enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri uji dalam mendegradasi kualitas nutrisi pada serasah daun mangrove. Hasil pengukuran parameter fraksi serat (NDF, ADF, selulosa, hemiselulosa, dan lignin) serasah daun mangrove dengan pemberian dosis enzim selulase yang berbeda dapat dilihat pada Tabel. 6.

Tabel 6. Kadar Fraksi Serat Serasah Mangrove pada Berbagai Dosis Enzim Selulase Isolat BS.ST2.8

Dosis(%)	Kadar Fraksi Serat (%)				
	NDF	ADF	Lignin	Selulosa	Hemiselulosa
0	30.78 \pm 0.83a	19.82 \pm 0.83a	5.55 \pm 0.15a	12.15 \pm 0.53a	18.48 \pm 0.18a
25	18.94 \pm 1.38b	12.30 \pm 1.15b	7.48 \pm 0.15b	10.53 \pm 0.14b	17.29 \pm 0.23b
30	12.13 \pm 4.56b	7.44 \pm 1.02c	8.13 \pm 0.27b	9.87 \pm 0.49b	16.90 \pm 0.24b

Keterangan : Angka-angka pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (P>0.05)

Berdasarkan hasil analisis ragam, penambahan enzim selulase memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap penurunan kadar NDF dan ADF pada serasah mangrove dibandingkan kontrol (P<0,05). Kadar NDF tertinggi diperoleh pada perlakuan tanpa pemberian enzim (0%) yaitu sebesar 30,78 % sedangkan kadar NDF terendah diperoleh pada perlakuan pemberian enzim 50 % yaitu sebesar 12,13 % hal yang serupa terjadi pada kadar ADF pada serasah mangrove. Kadar ADF relative tertinggi pada perlakuan tanpa perlakuan enzim 0% yaitu sebesar 19,81 % dan relative terendah pada perlakuan pemberian enzim 50 % yaitu sebesar 7,44 %. Penelitian Alemawor *et al.*, (2009) menunjukkan terjadinya penurunan kadar ADF dan NDF pada kulit coklat (*cocoa pod husk*) yang diberikan enzim fibrolitik. Penurunan kadar NDF dan ADF disebabkan karena adanya pemutusan ikatan lignoselulosa (Akhmal, 1994).

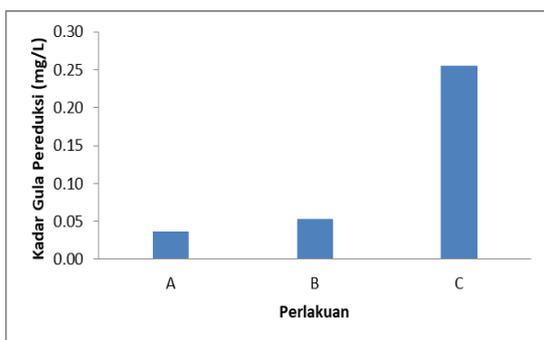
Kadar selulosa tertinggi diperoleh pada perlakuan tanpa pemberian enzim (0%) yaitu sebesar 12,14 % sedangkan kadar selulosa terendah diperoleh pada perlakuan pemberian enzim 50 % yaitu sebesar 9,86 % hal yang serupa terjadi pada kadar hemiselulosa pada serasah mangrove. Kadar hemiselulosa relative tertinggi pada perlakuan tanpa perlakuan enzim 0% yaitu sebesar 18,47 % dan relative terendah pada perlakuan pemberian enzim 50 % yaitu sebesar 16,90 %. Enzim selulase dapat digunakan sebagai biokatalis untuk mendegradasi pakan berserat yang kaya akan hemiselulosa dan selulosa (Lamid, 2008).

Hal yang sedikit berbeda diperoleh pada kandungan lignin serasah mangrove. Kandungan lignin serasah mangrove yang diberikan perlakuan enzim lebih tinggi dibandingkan dengan serasah mangrove tanpa pemberian enzim (0%). Kadar lignin terendah diperoleh pada perlakuan tanpa pemberian enzim (0%) yaitu sebesar 5,55 % sedangkan kadar lignin tertinggi diperoleh pada perlakuan pemberian enzim 50 % yaitu sebesar 8,13 %.

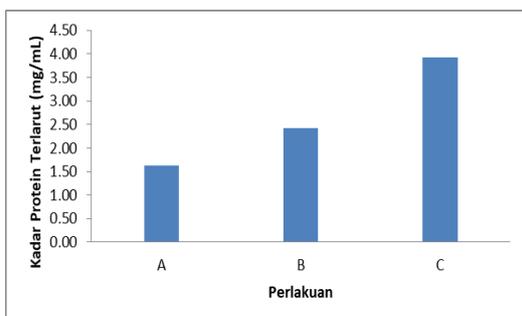
Hal ini terjadi karena diduga enzim selulase yang dihasilkan dari bakteri BS.ST2.8 tidak mempunyai aktifitas lignase sehingga penambahan enzim ini tidak mampu menurunkan kadar lignin pada serasah daun mangrove. Terdapat dua sistem

kerja enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh mikroba: 1) sistem hidrolitik, yaitu sistem kerja enzim ekstraseluler yang menghasilkan enzim hidrolase yang bekerja merombak selulosa dan hemiselulosa, dan 2) sistem oksidatif dan sekresi lignase ekstraseluler dengan cara depolimerisasi lignin (Perez *et al.*, 2002).

Penggunaan berbagai dosis enzim selulase secara keseluruhan mengakibatkan penurunan kandungan komponen serat kecuali kandungan lignin. Penambahan enzim selulase mempengaruhi kadar gula pereduksi. Kadar gula pereduksi tertinggi diperoleh pada perlakuan dosis 50 % yaitu sebesar 0,25 mg/L dan terendah pada perlakuan 0 % (Kontrol) sebesar 0,04 mg/L (Gambar 6).



Gambar 6. Kadar Gula Pereduksi pada serasah daun Mangrove yang dihidrolisis enzim selulase isolat BS.ST2.8 dengan dosis 0 (A), 25 (B) dan 50 % (C)



Gambar 7. Kadar Protein Terlarut pada serasah daun Mangrove yang dihidrolisis enzim selulase isolat BS.ST2.8 dengan dosis 0 (A), 25 (B) dan 50 % (C).

Peningkatan kadar gula pereduksi berkorelasi positif dengan penurunan kadar serat kasar secara umum (NDF dan ADF). Semakin tinggi penurunan serat kasar maka semakin tinggi pula kadar gula pereduksi yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan bahwa serat kasar pada dasarnya berhasil didegradasi oleh enzim selulase menjadi bentuk yang lebih sederhana yaitu gula pereduksi. Selulosa dirubah menjadi rantai linear dan unit-unit disakarida

(selobiosa) yang selanjutnya diubah menjadi glukosa (gula pereduksi) oleh enzim selulase (Moore-Landecker, 1990).

Hasil pengukuran protein terlarut serasah daun mangrove setelah dihidrolisis dengan berbagai dosis enzim selulase disajikan pada Gambar 7. Konsentrasi enzim selulase mempengaruhi kadar protein terlarut. Kadar protein terlarut tertinggi terdapat pada perlakuan dosis 50%. Protein terlarut adalah jenis protein yang dapat dicerna oleh benih ikan (Tonheim *et al.*, 2007). Peningkatan protein terlarut pada penelitian ini disebabkan telah terpecahnya dinding sel serasah daun mangrove oleh enzim selulase yang menyebabkan terlepasnya protein yang semula berikatan dengan dinding sel.

4. Kesimpulan

Hasil isolasi, seleksi (Identifikasi mikroba pada sedimen hutan mangrove Stasiun Kelautan Dumai), diperoleh 24 isolat yang memiliki kemampuan tumbuh dalam media yang mengandung CMC dengan aktifitas selulolitik tertinggi terdapat pada isolat BS.ST2.8. Hasil karakteristik isolat bakteri selulolitik secara fenotip dan genotip diketahui bahwa ketiga isolat tersebut adalah *B. toyonensis*. Enzim selulase terbanyak dihasilkan oleh isolat bakteri BS.ST2.8 terjadi pada jam ke -78 setelah inkubasi. Dari hasil uji lebih lanjut dengan menggunakan beberapa dosis enzim selulase isolat BS.ST2.8 terhadap substrat serasah mangrove, diketahui bahwa secara umum dapat mendegradasi serat kasar serasah mangrove pada dosis 50%, penurunan fraksi serat NDF, ADF, selulosa dan hemiselulosa.

Daftar Pustaka

- Alemawor, F., Dzoghbeia, V. P., Oddoye, E. O. K., Oldham, J. H. 2009. Enzyme cocktail for enhancing poultry utilisation of cocoa pod husk. *Scientific Research and Essay*, 4(6): 555–559.
- Casanovas, M. A., Sala-Comorera, L., Blanch, A. R. 2014. “Quantification of tetracycline and chloramphenicol resistance in digestive tracts of bulls and piglets fed with Toyocerin, a feed additive containing *Bacillus toyonensis* spores,” *Vet Microbiol.* 173:59–65
- Dini, I. R., Munifah, I. 2014. Produksi dan karakterisasi enzim selulase ekstrak kasar dari bakteri yang diisolasi dari limbah rumput laut. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*, 6(3): 69–75.
- Feliatra., Dessy, Y., Iesje, L. Titania, T.N., Wahid, H. 2015. The Potential of The Isolated Probiotics Bacterial From Giant Prawns’ Digestive Tract

- (*Macrobrachium Rosenbergii*, De Man) With 16s rDNA Sequencing Technique. *International Journal of Oceans and Oceanography*, 9(1):1–10.
- Gunavathy, P., Boominathan, M. 2015. Isolation and Molecular characterization of cellulase producing bacteria from soil of Sacred Grove, Puducherry, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(12):584–590.
- Irfan, M., Safdar, A., Syed, Q., Nadeem, M. 2012. Isolation and screening of Cellulolytic Bacteria from Soil and Optimization of Cellulase Production and Activity. *Turkish Journal of Biochemistry*, 37 (3) : 288–289.
- Lageiro, M. M., Moura, M. J., Reis, A., Fereira, M. J. C. 2007. Microbial proteases industry. *J. Biotechnol*, 131: S239–S240.
- Lamid, M. 2008. Optimalisasi Potensi Enzim Xilanase Produksi Mikroba Rumen dalam Biodegradasi Hemiselulosa pada Jerami padi sebagai Strategi Pemberian Pakan Ruminansia. *Disertasi*. Pascasarjana Universitas Brawijaya, Malang.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2009. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall International. London (UK) Limited. 991 pp.
- Maki, M., Leung, K. T., Qin, W. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences*, 5(5): 500–516.
- Maulani, S.H., Kusdarwati, R., Alamsjah, M.A., Pursetyo, K.T. 2016. Isolasi dan identifikasi bakteri selulolitik dari tanah mangrove Muara Sungai Gunung Anyar, Surabaya. *Journal of Marine and Coastal Science*, 5(1): 1–8.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T.C., Rachmania, N., Satria, H. 2009. Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara Sains*, 13(1):33–38.
- Moore-Landecker, E. 1990. *Fundamentals of the Fungi*. Fourth Edition. Prentice.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martinez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.*, 5:53–63.
- Saini, J. K., Arti, Tewari, L. 2012. Simultaneous Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria: Selection of Efficient Medium. *J Pure Appl Microbiol*. 6(3):1339–1344.
- Setiyati, W.A., Subagyo. 2012. Isolasi dan seleksi bakteri penghasil enzim ekstraseluler (proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik) yang berasal dari sedimen kawasan mangrove. *Ilmu Kelautan*, 17(3): 164–168.
- Simanjuntak, I.R., Nursyirwani, Yoswaty, D. 2015. Production, decomposition rate and identification of bacteria on *Avicennia alba* litter in the coastal zone of Kuala Indragiri Riau Province. *Jurnal Online Mahasiswa Universitas Riau*, 2 (2): 1–13.
- Sunarti T. C., Meryandini, A., Sofiyanto, M. E., Richana, N. 2010. Saccharification of corncob using cellulolytic bacteria for bioethanol production. *Biotropia*, 17(2): 105–114.