

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI SELULOLITIK TANAH DI EKOSISTEM MANGROVE DI DESA NOELBAKI KECAMATAN KUPANG KABUPATEN KUPANG TENGAH

Theresia L. Boro, Amor T. Karyawati, Maria T. L. Ruma, Rony S. Mauboy, Tersiana A. Tari

Program Studi Biologi FST Undana

ABSTRAK

Bakteri selulolitik merupakan salah satu mikroorganisme pendegradasi selulosa yang diduga dapat ditemukan di ekosistem mangrove. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri selulolitik yang terkandung dalam tanah di ekosistem mangrove, untuk mengetahui aktivitas selulosa golongan bakteri selulolitik dan untuk mengetahui karakteristik golongan bakteri selulolitik yang di isolasi dari tanah ekosistem mangrove. Isolasi bakteri selulolitik dilakukan dengan menggunakan media *Nutrient Agar* (NA) dengan metode spread plate. Pengujian aktivitas selulase dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat murni terpilih pada media *Carboxy Methyl Cellulosa* (CMC), selanjutnya ditetesi *congo red* 0,1% untuk menguji potensi selulolitiknya. Hasil penelitian memperoleh 5 isolat yang berpotensi mendegradasi selulosa ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media selektif yaitu media *Carboxy Methyl Cellulosa*. Indeks aktivitas selulolitik paling besar dimiliki isolat TLA4 yaitu 3,29 mm dan indeks terendah dimiliki isolat TLB7 yaitu 1,50 mm. Karakteristik setiap isolat bakteri yang ditemukan berbeda-beda, pertama pada tanah lokasi A ditemukan 2 varian dengan bentuk yang tidak beraturan, elevasi timbul, berwarna putih bening dan putih keruh dengan tepian yang bergelombang dan pada tanah lokasi B ditemukan 3 varian dengan bentuk yang bulat, elevasi timbul, berwarna putih keruh, krem, putih bening dengan tepian yang rata dan bergelombang. Isolat terbanyak adalah bakteri gram negatif dengan bentuk sel basil.

Kata kunci: *Bakteri, tanah, selulolitik, morfologi, ekosistem, mangrove*

Ekosistem mangrove memiliki peranan secara fisik sebagai peredam gelombang laut, angin badai, penahan lumpur, penjerat sedimen dan pelindung pantai dari proses abrasi. Secara ekonomi ekosistem mangrove berpotensi sebagai tempat rekreasi dan mata pencaharian bagi masyarakat yang bermukim di sekitar kawasan hutan mangrove. Ekosistem mangrove juga diketahui berperan sebagai penghasil detritus (Dahuri, 2002; Kusmana, 2012). Detritus yang berasal dari ekosistem mangrove merupakan bahan organik yang berasal dari guguran daun mangrove yang jatuh dan mengalami dekomposisi dimana kedalaman tanah berpengaruh terhadap laju dekomposisi bahan organik. Kedalaman tanah berkaitan dengan jumlah dan jenis mikroorganisme yang berbeda-beda yang akan berperan dalam proses dekomposisi bahan organik.

Bakteri selulolitik merupakan salah satu mikroorganisme pendegradasi selulosa yang diduga dapat ditemukan di ekosistem mangrove. Bakteri selulolitik mampu mendegradasi selulosa menjadi produk sederhana yaitu glukosa (Meryandini *dkk*, 2009). Enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik dapat dimanfaatkan dalam berbagai aspek seperti pada industri pulp dan kertas untuk modifikasi serat, penghilangan warna dan peningkatan drainase, dalam industri tekstil digunakan sebagai biopolishing kain dan deterjen untuk meningkatkan kelembutan dan kecerahan kain (Shadu dan Maiti, 2013) serta produksi biofuel. Aplikasi enzim selulase dibidang peternakan yaitu untuk peningkatan kualitas bahan pakan ternak.

Selulase digunakan untuk meningkatkan kecernaan rumput raja (Prabowo *dkk*, 2013), jerami padi (Nur *dkk*, 2008), bagas tebu (Rayhan *dkk*, 2013), eceng gondok.

Desa Neolbaki terletak di Kabupaten Kupang, Kecamatan Kupang Tengah, Provinsi Nusa Tenggara Timur. Desa Neolbaki merupakan salah satu desa yang memiliki kawasan hutan mangrove yaitu seluas 10.2 Ha (Maximilianus *dkk*, 2015). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik menghasilkan enzim selulase yang bermanfaat dalam berbagai aplikasi kehidupan, sehingga diharapkan kawasan hutan mangrove Desa Neolbaki menjadi lokasi yang berpotensi untuk isolasi bakteri selulolitik.

MATERI DAN METODE

Penentuan Sampel dan Area Sampling

Sampel yang diambil adalah sampel tanah di kawasan mangrove Desa Neolbaki, Kecamatan Kupang Tengah, Kabupaten Kupang dibagi menjadi lima lokasi. Tiap lokasi ditetapkan 4 titik pengambilan sampel (sesuai arah mata angin) dari ke empat titik tersebut sampel dikompositkan menjadi satu. Jarak antar titik pengambilan sampel ditentukan sesuai arah mata angin (timur, selatan, barat dan utara). Pengambilan sampel terdiri dari tanah rizosfer. Tanah rizosfer adalah tanah yang langsung dipengaruhi oleh akar tanaman (Husen, 2007). Tiap lokasi pengambilan tanah dicatat posisi geografisnya dengan alat dan penentu posisi (GPS).

Deskripsi pengambilan sampel pada 5 lokasi yang berbeda yaitu Lokasi A berada di dekat pemukiman dan terdapat aktivitas manusia, Lokasi B berada di kawasan hutan yang didominasi oleh tumbuhan mangrove, Lokasi C berada di kawasan hutan mangrove yang telah rusak akibat penebangan, Lokasi D berada di kawasan yang didominasi oleh satu jenis tumbuhan mangrove, Lokasi E berada di daerah pasang surut air laut.

Pengambilan Sampel Tanah

Ditetapkan tanaman sebagai titik pengambilan sampel tanah, lalu diukur diameter batang dengan ketinggian 1m dari permukaan tanah. Tanaman yang menjadi pusat pengambilan sampel yaitu dilihat tanaman yang paling besar/diameter batangnya kira-kira >50 cm setiap lokasi. Kemudian dibersihkan permukaan tanah dari daun dan serasah lalu dibuat plot berukuran 20x20 cm. Tanah di bawah tajuk yang akan digali dengan jarak $\frac{1}{2}$ m dari tajuk terluar. Karena sampel yang diambil ialah sampel tanah Rhizosfer (tanah Rhizosfer merupakan tanah yang langsung dipengaruhi oleh akar tanaman (Husen, 2007). Sampel tanah diambil dengan menggali tanah pada kedalaman 10 cm pada tiap titik pengambilan sampel dimana titik pengambilannya sesuai arah mata angin lalu dikompositkan. Tiap titik pengambilan sampel diukur pH dan suhu tanah menggunakan soil tester. Tanah diambil sebanyak \pm 50g kemudian dimasukkan ke dalam plastik tanah dan diberi label lalu dimasukkan kedalam cooler box berisi es batu agar tanah tidak cepat kering dan terhindar dari suhu kering.

Sampel tanah yang telah di ambil langsung dibawa ke laboratorium hayati Provinsi NTT untuk dilakukan penelitian selanjutnya.

Isolasi dan Pemurnian Kapang

Ditimbang sampel tanah sebanyak 10 g dan disuspensikan dalam erlenmeyer yang berisi 90 ml aquades steril. Dipindahkan 1 ml suspensi ke dalam 9 ml aquades steril dalam tabung reaksi dan dihomogenkan sehingga diperoleh pengenceran 10-1. Diambil 1 ml suspensi pengenceran 10-1 dimasukan ke dalam 9 ml aquades steril dan dihomogenkan sehingga diperoleh 10-2, begitu seterusnya dilakukan sampai pada pengenceran 10-5. Dituang media Nutrient Agar (NA) \pm 20 ml ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Dipipet 1 ml pengenceran 10-4 dan 10-5 masing-masing dimasukan ke dalam cawan petri dan sebarkan secara merata ke seluruh permukaan media. Ditungkat cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam.

Pemurnian dilakukan dengan diambil koloni tunggal bakteri selulolitik menggunakan jarum ose. Diinokulasikan bakteri yang telah diambil ke cawan petri yang berisi medium Nutrient Agar (NA) menggunakan metode gores. Ditungkat cawan petri dan bagian tepinya dilapisi plastic wrap. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari.

Pembuatan Media Carboxy Methyl Cellulosa Agar

Ditimbang 1,3 gram K₂HPO₄; 1,0 gram (NH₄)₂SO₄; 0,2 gram MgSO₄.7H₂O; 2,0 gram NaCl.2H₂O; 1,0 gram yeast extract; 0,5% CMC dan 15 gram agar.

Dilarutkan bahan-bahan kedalam 1000 mL akuades sehingga diperoleh medium. Disterilisasi medium menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media Carboxy Methyl Cellulosa Agar digunakan sebagai media selektif untuk isolasi bakteri selulolitik.

Uji aktifitas Selulosa

Diambil kultur isolat bakteri hasil pemurnian kemudian ditanamkan pada media Carboxy methyl cellulosa (CMC) yang telah memadat. Diinkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama lima hari. Ditambahkan congo red 0,1% pada setiap cawan petri yang berisi media CMC yang telah diinkubasi kemudian didiamkan beberapa menit. Dicuci cawan petri menggunakan aquades untuk melunturkan congo red.

$$\text{Indeks kitinolitik} = \frac{\text{diameter zona bening (mm)}}{\text{diameter koloni (mm)}}$$

Pengamatan Karakter Morfologi Isolat Isolat Bakteri Selulolitik

Pengamatan dilakukan pada kultur kapang yang ditumbuhkan kembali pada media PDA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama tujuh hari. Pengamatan struktur makroskopis kapang meliputi warna koloni, warna sebalik koloni (*reverse side*), tekstur permukaankoloni, garis-garis radial (*radial forrow*), lingkaran-lingkaran konsentris dan zona pertumbuhan (*growing zone*). Sedangkan pengamatan karakter morfologi kapang kitinolitik secara mikroskopis dengan membuat *slide cultur* dan preparat meliputi bentuk konidia/sporangiospora, bentuk vesikel, bentuk fialid, konidiofor tunggal/berkelompok, konidiofor bercabang/tidak bercabang, hifa bersekat/tidak bersekat.

Data hasil karakterisasi kapang secara makroskopis dan mikroskopis yang diperoleh dibandingkan dengan buku acuan Fungi and Food Spoilage (Pitt dan Hocking, 1997) dan Pengenalan Kapang Tropik Umum (Gandjar *dkk*, 1999).

Analisis Data

Data hasil pengamatan ditampilkan dalam bentuk gambar maupun tabel yang selanjutnya dianalisis secara deksriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Pemurnian Bakteri

Hasil isolasi bakteri pada setiap kode pengambilan memperlihatkan isolat yang tumbuh memiliki jumlah koloni dan karakter morfologi yang beragam. Hal ini dikarenakan tanah yang digunakan sebagai sampel diambil dari tumbuhan yang berbeda-beda lokasinya. Setiap tumbuhan akan beradaptasi dengan lingkungan tempat tumbuhnya dan menciptakan komunitas mikroba masing-masing. Zhuang *dkk* (2013) menyatakan bahwa interaksi tumbuhan dengan mikroba dimediasi oleh eksudat akar. Selanjutnya Broeckling *dkk* (2008) menyatakan bahwa eksudat akar dapat berfungsi sebagai agen selektif sehingga tumbuhan dapat mengatur komunitas bakteri di lingkungannya. Selanjutnya dilakukan proses pemurnian untuk memisahkan masing-masing koloni berdasarkan perbedaan karakteristik secara makroskopis. Hasil pemurnian didapatkan 12 isolat bakteri.

Aktivitas Selulase Bakteri Selulolitik

Dua belas isolat bakteri melewati pengujian aktivitas selulase dan diperoleh lima isolat bakteri selulolitik yang dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Selulase

Kode isolat	Diameter		Indeks Selulolitik
	Zona bening (mm)	Koloni (mm)	
TLA2	1,10	0,50	2,20
TLA4	1,22	0,37	3,29
TLB2	1,80	0,70	2,57
TLB3	1,50	0,70	3,14
TLB7	1,20	0,80	1,50

Berdasarkan data pada tabel 1 Isolat TLA4 memiliki nilai indeks selulolitik terbesar yakni 3,29. Nilai indeks selulolitik terkecil yakni 1,50 dihasilkan oleh isolat TLB7. Indeks selulolitik menunjukkan kemampuan degradasi selulase terhadap substrat agar. Isolat TLA4 diduga mampu memanfaatkan selulosa sebagai sumber karbon tinggi, Sebaliknya rendahnya kemampuan isolat TLB7 dalam memanfaatkan selulosa pada media menyebabkan rendahnya enzim selulase kecil. Zona bening yang terbentuk dari masing-masing isolat dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Zona bening yang terbentuk dari kelima bakteri selulolitik (Keterangan: TLA2, TLA4, TLB2, TLB3, dan TLB7 adalah kode isolat, — Adalah diameter koloni, — diameter zona bening)

Karakteristik Morfologi Bakteri Selulolitik

Karakteristik kelima isolat bakteri selulolitik adalah sebagai berikut:

1. Isolat TLA2

Berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara makroskopis isolat TLA2 pada media CMC berumur 5 hari yang diinkubasi pada suhu 37°C, isolat TLA2 memiliki karakteristik koloni berwarna putih bening seiring bertambahnya waktu inkubasi terjadi perubahan warna koloni menjadi merah terang sebalik koloni berwarna kuning, permukaan koloni timbul, tepi koloni bergelombang. Berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara mikroskopis pada perbesaran 1000 kali, isolat TLA2 memiliki sel berbentuk basil.

2. Isolat TLA4

Berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara makroskopis isolat TLA4 pada media Carboxy Methyl Cellulosa berumur 5 hari yang diinkubasi pada suhu 37°C, isolat TLA2 memiliki karakteristik koloni berwarna putih keruh seiring bertambahnya waktu inkubasi terjadi perubahan warna koloni menjadi light orange/orange berbentuk tidak beraturan, permukaan koloni timbul, tepi koloni bergelombang. Berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara mikroskopis pada perbesaran 1000 kali, isolat TLA4 memiliki sel berbentuk basil.

3. Isolat TB2

Berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara makroskopis isolat TLB2 pada media Carboxy Methyl Cellulosa berumur 5 hari yang diinkubasi pada suhu 37°C, isolat TLB2

memiliki karakteristik koloni berwarna putih keruh seiring bertambahnya waktu inkubasi terjadi perubahan warna koloni menjadi cream berbentuk bulat, permukaan koloni timbul, tepi koloni rata. Berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara mikroskopis pada perbesaran 1000 kali, isolat TLB2 memiliki sel berbentuk basil.

4. Isolat TB3

Berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara makroskopis isolat TLB3 pada media Carboxy Methyl Cellulosa berumur 5 hari yang diinkubasi pada suhu 37°C, isolat TLB3 memiliki karakteristik koloni berwarna krem seiring bertambahnya waktu inkubasi terjadi perubahan warna koloni menjadi vermilion/merah terang berbentuk bulat, permukaan koloni bergelombang, tepi koloni rata. Berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara mikroskopis pada perbesaran 1000 kali, isolat TLB3 memiliki sel berbentuk basil.

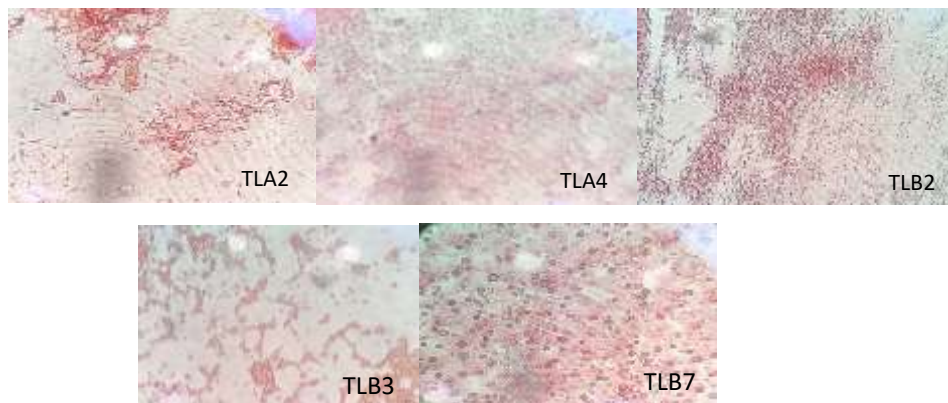
5. Isolat TLB7

Berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara makroskopis isolat TLB7 pada media Carboxy Methyl Cellulosa berumur 5 hari yang diinkubasi pada suhu 37°C, isolat TLB7 memiliki karakteristik koloni berwarna putih bening seiring bertambahnya waktu inkubasi terjadi perubahan warna koloni menjadi dark camine/camin gelap berbentuk bulat, permukaan koloni timbul, tepi koloni rata. Berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara mikroskopis pada perbesaran 1000 kali, isolat TLB7 memiliki sel berbentuk coccus.

Pewarnaan Gram

Selain pengamatan morfologi koloni, dilakukan juga pewarnaan gram untuk mengetahui karakter sel isolat berdasarkan perbedaan struktur dari dinding sel bakteri. Ada dua macam yaitu dinding sel bakteri gram positif dan negatif. Berdasarkan data pada tabel 1, kelima isolat memiliki sifat gram yang berbeda yaitu 1 isolat tergolong gram positif yang ditunjukkan dengan kenampakan warna ungu pada sel dan

4 isolat tergolong gram negatif yang ditunjukkan dengan kenampakan warna merah pada hasil pewarnaan gram. Pada pengamatan bentuk sel bakteri, isolat TLA2, TLA4, TLB2 dan TLB3 memiliki bentuk sel bacill sedangkan TLB7 memiliki bentuk sel coccus. Hasil pewarnaan gram setelah diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Pewarnaan gram kelima isolat bakteri yang diisolasi dari tanah (Ket: TLA2, TLA4, TLB2, TLB3 dan TLB7 adalah kode isolat)

Pewarnaan gram bertujuan untuk membedakan bakteri menjadi dua kelompok yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Menurut Fardiaz (1989), pada pewarnaan gram pengelompokkan bakteri gram positif apabila sel tetap berwarna ungu seperti kristal violet, sedangkan kelompok gram negatif apabila sel mampu melepaskan kristal violet dan mengikat safranin sehingga berwarna merah. Kelompok bakteri gram positif memiliki kandungan peptidoglikan yang tebal pada struktur dinding sel berkisar 15-80 mm, sedangkan

dinding sel kelompok bakteri gram negatif memiliki kandungan lipid yang tinggi (Fitri dan Yasmin, 2011). Bakteri selulolitik dengan kode isolat TLB7 tergolong bakteri gram positif berdasarkan hasil pewarnaan gram. Hal ini dikarenakan bakteri ini memiliki dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan sehingga zat warna kristal violet dipertahankan. Sedangkan berdasarkan hasil pewarnaan gram bakteri selulolitik dengan kode isolat TLA2, TLA4, TLB2 dan TLB3 adalah bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan

lipida yang tinggi sehingga tidak dapat mengikat zat warna kristal violet.

PENUTUP

Simpulan

Tanah di Ekosistem Mangrove Desa Noelbaki Kecamatan Kupang Tengah mengandung bakteri selulolitik dimana aktivitas selulase berdasarkan nilai indeks selulolitik berkisar antara 1,50-3,29. Karakteristik morfologi isolat bakteri selulolitik TLA2, TLA4, TLB2, TLB3 dan TLB7 secara makroskopis dan mikroskopis bervariasi dan tergolong gram positif dan negatif, sel koloni berbentuk *basil* dan *coccus*, koloni berbentuk bulat dan tidak beraturan.

Saran

1. Dilakukan uji biokimia dan fisiologis terhadap lima isolat bakteri selulolitik untuk identifikasi lebih lanjut hingga tingkat spesies.
2. Dilakukan pengujian aktivitas selulosa berdasarkan perlakuan suhu, pH dan lama inkubasi yang berbeda untuk kemampuan selulolitik dari kelima isolat bakteri.
3. Dilakukan Isolasi golongan bakteri selulolitik dari jenis tanah yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

Anggraini, B. Z. (2012). Pengaruh suhu dan konsentrasi *Carboxymethyl cellulosa* (CMC) terhadap perumbuhan tiga isolat bakteri selulolitik yang diisolasi dari usus Rayap Kasta pekerja dan Prajurit. *Skripsi*. UNY. Yogyakarta.

Broeckling, C.D., A.K. Broz., J. Bergelson., D.K. Manter dan J.M. Vivanco. (1974). Root Exudates Regulate Soil Fungal Community Composition and Diversity. *Environmental Microbiology*: **74**(3): 738-744.

Dahuri, R. (2002). Interaksi kebijakan pengelolaan sumber daya pesisir dan pulau-pulau kecil. *Makalah disampaikan pada Lokakarya Nasional Pengelolaan Ekosistem mangrove*. Jakarta.

Fardiaz. (1989). *Fisiologi Fermentasi*. Pusat Antar Universitas-LSI. IPB. Bogor

Fitri Lenni dan Yasmin Yekki. (2011). The potential of local chitinolytic bacteria isolates as larvacide of *Aedes aegypti* L. *Makara Journal Health Res.* 1:1-6.

Gandjar, F.P., Pearce, R.B., Mitchell, R.L. (1999). *Physiology of Crop Plants*. (Susilo H, Penerjemah). UI. Jakarta.

Husen, Edi. (2007). *Pengambilan Contoh Tanah untuk Analisis Mikroba. Dalam Buku: Metode Analisis Biologi Tanah*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya. Bogor.

Kusmana, C.S., Wilarso, I., Hilwan, P., Pamoengkas, C., Wibowo, T., Tiryani, A., Triswanto, Y., Hamzah. (2012). *Teknik Rehabilitas Mangrove*. IPB. Bogor.

Maximilianus, A., Leonardus, B., Eduardus, J.E. (2015). Struktur Vertikal Komunitas Mangrove di Pantai Noelbaki, Kupang Tengah. *Jurnal Enggano*. Kupang.

- Meryandini, A., Widosari, W., Sunarti, T.C., Maranatha, B., Rachmania, N., Satria, H. (2009). Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakter Enzimnya. *Jurnal Makar Sains*. 13 (1): 33-38.
- Nur, D. (2008). *Isolasi dan uji potensi mikroorganisme selulolitik asal tanah gambut dan kayu sedang melapuk dalam mendekomposisikan kayu*. Skripsi. USU. Medan.
- Pitt, J.I dan A.D. Hocking. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Profesional. London.
- Prabowo, R.S., T.E. Susanto., Y.A.K. Wardhani dan A. Sutrisno. (2013). Enzim Kitinase dan Aplikasi di Bidang Industri. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*: 3(3): 878-887.
- Rayhan, F., Saratale, R.G., Oh, S.E. (2013). Production and Characterization Of Multiple Cellulolytic Enzymes By Isolated *Streptomyces* sp. MDS. Biomassa and Bioenergy.47: 302-315.
- Sadhu, S., Saha, P., Sen, S.K., Mayilraj, S., Maiti, T. (2013). Production, Purification and Characterization of Novel Thermotolerant Endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* Strain Isolated from Cow Dung. *Springerplus SpringerPlus Journal*. India. 2:10.
- Zhuang, Y.H.P., Himmel, M.E dan Mielenz, J. R. (2013). 'Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Slection Strategies. *Biotech*, 24(5): 452-481.