

EKPLORASI BAKTERI SELULOLITIK DARI CAIRAN RUMEN SAPI PERANAKAN FRIES HOLLAND (PFH) DAN LIMOUSINE PERANAKAN ONGOLE (LIMPO)

Sekar Ayoe Yogyaswari*, **MG. Isworo Rukmi****, **Budi Raharjo****

*Program Studi Biologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

**Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Email: syogyaswari@gmail.com, isworo.rukmi@gmail.com, budi206@yahoo.com

ABSTRACT

Cellulose is the largest component of plant materials which is the most abundant organic compound in nature. The degradation of cellulose carried out by cellulase enzymes which is consisting of three components, i.e. , endoglucanase, exoglucanase, and α -glucosidase with glucose as the end product. Cellulase is very useful in industry and agriculture, such as paper, beer and brewing industries, for improving the quality of forages, organic material decomposer, and play an important role in the bioconversion of cellulose into various chemical commodities. The aims of this study was to get cellulolytic bacteria from cow's rumen fluid which has high cellulolytic activity. Isolation of cellulolytic bacteria from cow's rumen fluid were done by direct plating on CMC media. The cellulolytic activity values of the bacterial isolates were examined by determining cellulolytic index. The determination of cellulase activity were carried out by DNS method while the total protein contents by Lowry method. Identification of the bacteria isolates were done by observation of colony morphology, microscopic observation, and biochemical tests. Six potential cellulolytic bacterias were obtained in this study and all isolates identified as *Bacillus*. The highest cellulase specific activity shown by Fh-9 and Lo-8 isolates in 8 hours incubation.

Keywords: cellulolytic bacteria, cellulose, cellulase.

ABSTRAK

Selulosa adalah komponen terbesar dari tumbuhan yang merupakan senyawa organik paling melimpah di alam. Degradasi selulosa dilakukan oleh enzim selulase yang terdiri dari tiga komponen, yaitu, endoglukanase, eksoglukanase, dan enzim α -glukosidase dengan glukosa sebagai produk akhir. Selulase sangat bermanfaat dalam bidang industri dan peternakan, seperti industri kertas, industri tekstil, pembuatan *beer* dan *wine*, meningkatkan kualitas pada pakan ternak, dekomposer bahan-bahan organik, dan berperan penting dalam biokonversi selulosa menjadi berbagai komoditas senyawa kimia. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri selulolitik asal cairan rumen sapi yang memiliki aktivitas selulolitik yang tinggi. Isolasi bakteri selulolitik dari cairan rumen sapi dilakukan dengan *direct plating* pada media CMC agar. Nilai aktivitas selulolitik didapat dengan menentukan indeks selulolitik. Penentuan aktivitas selulase dilakukan dengan metode DNS, sedangkan penentuan kadar protein total dengan metode Lowry. Identifikasi bakteri dilakukan dengan mengamati morfologi koloni, pengamatan mikroskopis, dan uji biokimia. Enam bakteri selulolitik potensial berhasil diperoleh dalam penelitian ini dan semua bakteri diidentifikasi sebagai bakteri *Bacillus*. Aktivitas spesifik selulase tertinggi ditunjukkan oleh isolat Fh-9 dan Lo-8 pada waktu inkubasi 8 jam.

Kata Kunci: Bakteri selulolitik, selulosa, selulase.

PENDAHULUAN

Selulosa merupakan komponen terbesar dari tumbuhan yang merupakan senyawa organik yang melimpah di bumi. Struktur kimia selulosa berupa rantai yang tidak bercabang dan tersusun atas satuan-satuan β -D-glukosa-piranos, dengan ikatan β -1,4-glikosidik (Sumardjo, 2009).

Enzim selulase merupakan enzim yang dapat mengurai selulosa. Enzim ini dapat diaplikasikan pada bidang industri untuk ekstraksi *juice* buah dan sayur, ekstraksi minyak zaitun, meningkatkan kualitas roti dan kue, pembuatan *beer* dan *wine*, memperhalus bubuk kertas pada industri kertas, menjaga warna kain agar tetap cemerlang pada industri tekstil, meningkatkan kualitas pada industri pangan, sebagai dekomposer bahan-bahan organik, meningkatkan nutrisi pakan ternak, berperan penting dalam biokonversi selulosa menjadi berbagai komoditas senyawa kimia dan dapat mengurangi dampak negatif dari polusi limbah terhadap lingkungan.

Bakteri penghasil enzim selulase yang mampu mengurai selulosa dapat diisolasi dari rumen sapi. Rumen merupakan salah satu bagian pada lambung ruminansia, tempat pencernaan makanan dengan proses fermentasi yang dilakukan oleh berbagai macam mikroorganisme seperti bakteri, protozoa, dan fungi. Bakteri selulolitik merupakan salah satu jenis bakteri yang hidup dalam rumen sapi sebagai penghasil enzim selulase untuk menghidrolisis selulosa kompleks dari pakan hijauan menjadi glukosa. Bakteri yang mempunyai aktivitas selulolitik tinggi dapat menjadi sumber enzim selulase untuk industri. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri selulolitik asal cairan rumen sapi yang memiliki aktivitas selulolitik yang tinggi sehingga dapat dijadikan informasi tentang

biodiversitas bakteri selulolitik potensial dari cairan rumen sapi yang juga dapat dimanfaatkan dalam bidang industri.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan, Provinsi Jawa Tengah. Waktu pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Mei – Agustus 2016.

Pengambilan Sampel Cairan Rumen Sapi

Sampel cairan rumen sapi diambil dari sapi yang baru saja dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH) Salatiga. Sampel diambil dari dua jenis sapi, yaitu Peranakan Fries Holland (PFH) dan Limousin Peranakan Ongole (Limpo) sebanyak 100 ml. Cairan rumen sapi ditampung menggunakan botol kaca steril dan disimpan di dalam cooler box berisi es batu, dibawa ke laboratorium untuk diteliti dalam waktu kurang dari 2 jam.

Isolasi dan Skrining Bakteri Selulolitik

Sampel cairan rumen sapi diinokulasikan pada media CMC agar dengan metode spread plate, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 x 24 jam. Larutan congo red 0,1% sebanyak 5 ml dituangkan pada cawan petri hingga seluruh permukaan media dan koloni bakteri terendam, didiamkan selama 15 menit, kemudian dicuci dengan NaCl 0,1%.

Pemurnian Isolat Bakteri

Koloni bakteri yang memperlihatkan zona bening dimurnikan secara *quadrant streak* pada media CMC agar 1% (w/v), diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Isolat bakteri selanjutnya diuji kemurniannya menggunakan metode pewarnaan gram.

Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

Pengamatan dilakukan dengan mengamati morfologi koloni bakteri meliputi bentuk koloni, tepi koloni, warna koloni, dan ketinggian permukaan koloni pada media Nutrient Agar (NA).

Penentuan Nilai Indeks Selulolitik

Larutan congo red 0,1% sebanyak 5 ml dituangkan pada biakan bakteri selulolitik umur 24 jam pada media CMC hingga seluruh permukaan media dan biakan bakteri terendam, dibiarkan selama 15 menit, kemudian dicuci dengan NaCl 0,1%. Indeks selulolitik kemudian dihitung dengan cara: Indeks Selulolitik =

$$\frac{\text{Diameter zona bening (mm)}}{\text{Diameter koloni bakteri (mm)}}$$

Produksi Enzim

Pembuatan media produksi enzim dilakukan dengan menginokulasikan satu ose isolat bakteri berumur 24 jam pada media NA ke dalam 100 ml medium Luria Bertani (LB) + Carboxy methyl Cellulose (CMC) 1% (v/v), diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan agitasi 100 rpm.

Pengukuran Pertumbuhan

Satu ose isolat bakteri berumur 24 jam pada media NA diinokulasikan pada 100 ml medium LB+CMC 1%, diinkubasi pada suhu ruang menggunakan *rotary shaker* selama 24 jam. Kultur sebanyak 10% ditambahkan pada medium kultur bakteri baru. Kultur diambil sebanyak 2 ml, dituang ke dalam tabung *ependorf*, disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan selanjutnya dipisahkan, lalu natan dicuci dengan aquades sebanyak 1,5 ml, disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Sisa aquades dibuang lalu diberi aquades kembali dan divortex untuk menghomogenkan natan

dengan aquades. Larutan kemudian diukur kerapatan optisnya menggunakan spektrofotometer pada $\lambda=600$ nm. Pengukuran OD untuk kurva tumbuh dilakukan setiap 2 jam sekali selama 24 jam.

Penentuan Aktivitas Enzim Selulase (Miller, 1959 dalam Yang *et al.*, 2014).

Aktivitas enzim pada isolat bakteri diukur menggunakan metode Dinitro Salicylic Acid (DNS). Kultur bakteri dari media produksi enzim sebanyak 10% ditambahkan pada medium kultur baru. Kultur diambil sebanyak 2 ml, disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit menggunakan *centrifuge* kemudian diambil supernatnya. Supernatan merupakan ekstrak kasar enzim selulase yang akan diuji aktivitas enzim dan aktivitas spesifik selulasenya. Supernatan sebanyak 1 ml ditambah dengan 1 ml media CMC cair 1% (w/v) lalu diinkubasi pada suhu 65° C selama 30 menit. Larutan yang telah diinkubasi, ditambahkan dengan 2,5 ml pereaksi DNS dan dipanaskan selama 5 menit di dalam air mendidih, kemudian didinginkan. Larutan yang telah dingin, diencerkan dengan 5 ml aquades dan diukur absorbansinya pada $\lambda=520$ nm dengan spektrofotometer Spectronic 20. Kandungan gula pereduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa yang dibuat dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 mg/mL. Rumus nilai aktivitas enzim :

Aktivitas enzim (U/ml) =

$$\frac{\text{Kadar glukosa sampel} \times \text{Pengenceran} \times 1000}{\text{BM glukosa} \times \text{waktu}}$$

Penentuan Kadar Protein (Lowry, 1951 dalam Anggarawati, 2012).

Supernatan sebanyak 0,5 ml ditambahkan dengan Reagen Lowry D sebanyak 1 ml lalu digojok, diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit di tempat yang tidak terkena cahaya. Larutan yang telah

diinkubasi, ditambahkan dengan 0,1 ml Reagen Lowry E lalu segera digojok dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu ruang di tempat yang tidak terkena cahaya. Akuades sebanyak 5 ml ditambahkan pada larutan tersebut, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 570 nm menggunakan spektrofotometer Spectronic 20. Kandungan protein ditentukan berdasarkan kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA) yang dibuat dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml. Aktivitas spesifik selulase dapat ditentukan dari:

$$\text{Aktivitas spesifik selulase (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas selulase (unit/ml/menit)}}{\text{Kadar protein (mg/ml)}}$$

Penentuan aktivitas enzim dan kadar protein dilakukan setiap 4 jam sekali selama 24 jam dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali untuk memenuhi kaidah ilmiah, kemudian diambil nilai rata-rata.

Karakterisasi Fenotipik Bakteri

Karakterisasi bakteri dilakukan dengan uji makroskopis, uji mikroskopis, dan uji fisiologis.

Uji Fisiologis

Uji Karbohidrat

Isolat bakteri berumur 24 jam pada media NA diinokulasikan ke dalam kaldu glukosa, sukrosa, laktosa, mannitol, dan arabinose dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan perubahan warna media dari merah menjadi kuning karena terbentuknya asam (Barrow & Feltham, 1993).

Uji Motilitas

Isolat bakteri pada medium NA berumur 24 jam diinokulasikan secara "stab" dengan jarum tanam tajam ke dalam medium motility agar, diinkubasi pada suhu ruang

selama 18-24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya daerah keruh yang meluas dari garis inokulasi atau tusukan.

Uji Katalase

Kultur isolat bakteri pada medium NA berumur 24 jam diinokulasi pada media NA baru lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Satu tetes larutan H₂O₂ diteteskan di atas koloni bakteri. Reaksi positif ditunjukkan dengan munculnya busa atau gelembung udara.

Uji Nitrat

Isolat bakteri pada media NA berumur 24 jam diinokulasikan pada media nitrat dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna media menjadi merah setelah penambahan reagen -naphthylamine.

Uji Hidrolisis Pati

Isolat bakteri pada medium NA berumur 24 jam diinokulasikan pada medium pati dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Pada akhir inkubasi, 0,5 ml larutan iodium diteteskan pada koloni bakteri. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening koloni bakteri.

Uji Urea

Satu ose isolat bakteri berumur 24 jam pada media NA diinokulasi ke dalam media urea broth kemudian diinkubasi selama 24-48 jam. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah keunguan yang merupakan indikator bahwa bakteri mampu menggunakan urea dan mengubah pH menjadi basa.

Uji Indol

Isolat bakteri pada medium NA berumur 24 jam, diinokulasikan pada medium indol lalu diinkubasi selama 24 jam

pada suhu ruang. Kultur ditetesi dengan 2 tetes reagen Kovac's. Hasil positif dari uji ini ditunjukkan dengan adanya cincin berwarna merah pada permukaan medium.

Uji Voges-Proskauer (VP)

Isolat bakteri pada medium NA berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam VP broth dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Pada akhir inkubasi, ditambahkan 2 tetes reagent -naphtol dan 2 tetes KOH kemudian digojok. Reaksi positif ditunjukkan dengan munculnya warna merah muda pada medium.

Uji Sitrat

Isolat bakteri pada medium NA berumur 24 jam diinokulasi pada agar miring Simmon's citrate dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Hasil uji positif ditunjukkan dengan perubahan warna media dari hijau menjadi biru.

Uji Oksidatif-Fermentatif

Isolat bakteri pada medium NA berumur 24 jam diinokulasikan pada media Oksidatif-Fermentatif agar dengan metode tusuk. Salah satu media ditutup dengan minyak parafin sebanyak 1 ml diatas permukaan media lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan media dari merah menjadi kuning.

Uji Hidrolisis Gelatin

Isolat bakteri pada medium NA berumur 24 jam diinokulasikan pada media gelatin dan diinkubasi selama 48 jam. Kultur selanjutnya dimasukkan ke dalam lemari es selama 15 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan konsistensi media yang cair.

Uji Pertumbuhan pada Suhu 45 dan 65 C

Isolat bakteri dari media NA berumur 24 jam disuspensikan ke dalam 2 ml aquadest

steril dan dipanaskan pada suhu 45 C selama 30 menit, selanjutnya suspensi ditanamkan pada media NA cawan petri. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media NA. Hal yang sama dilakukan pada suhu 65 C.

Uji Pertumbuhan pada pH 5,7

Isolat bakteri diambil dan diinokulasikan pada media NB dengan pH 5,7 lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan media menjadi lebih keruh.

Uji Pertumbuhan Anaerobik

Isolat bakteri pada medium NA berumur 24 jam diinokulasikan pada media NA dan Glucose broth lalu diinkubasi suhu ruang selama 24 jam pada wadah kedap udara.

Uji Hidrolisis Casein

Isolat bakteri pada medium NA berumur 24 jam diinokulasikan pada skim milk agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri.

Hasil karakterisasi isolat bakteri kemudian digunakan untuk melakukan identifikasi dengan panduan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

HASIL DAN PEMBAHASAN

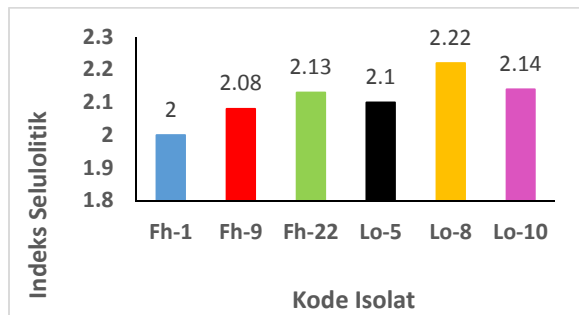
Isolasi bakteri selulolitik dari cairan rumen sapi memperoleh 6 isolat bakteri aerob yang menunjukkan aktivitas selulolitik. Enam isolat tersebut berasal dari dua sapi berbeda, yaitu 3 isolat bakteri dari cairan rumen sapi jenis Peranakan *Fries Holland* (PFH) dan 3 isolat bakteri dari sapi jenis *Limousin* Peranakan *Ongole* (Limpo). Semua isolat bakteri tersebut diamati secara makroskopis (Tabel 4.1).

Enam isolat bakteri yang telah diamati secara makroskopis, kembali diuji aktivitas selulolitiknya untuk menentukan nilai indeks selulolitik. Hasil tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Tabel 4.1 Karakteristik morfologi isolat bakteri dari cairan rumen sapi *Fries Holland* dan *Limousin Peranakan Ongole*

Kode Koloni	Bentuk Koloni	Tepi Koloni	Warna Koloni	Ketinggian (Elevation)
Fh-1	Bulat	Rata	Putih Kekuningan	<i>Raised</i>
Fh-9	Bulat	Tidak rata	Putih Susu	<i>Convex</i>
Fh-22	Bulat	Tidak rata	Putih Kekuningan	<i>Raised</i>
Lo-5	Bulat	Tidak rata	Putih Susu	<i>Convex</i>
Lo-8	Bulat	Rata	Putih Kekuningan	<i>Raised</i>
Lo-10	Bulat	Tidak Rata	Putih Kekuningan	<i>Raised</i>

Keterangan: Fh: Fries Holland; Lo: Limousin Peranakan Ongole

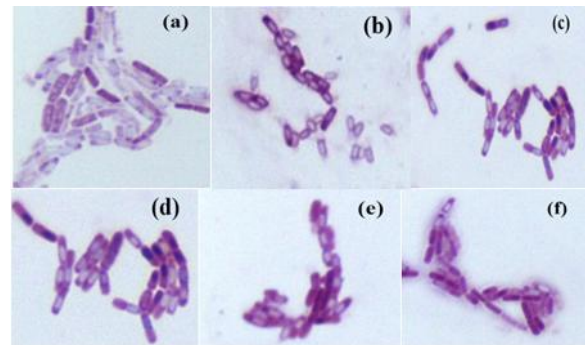


Gambar 4.1 Nilai indeks selulolitik isolat bakteri dari cairan rumen sapi.

Hasil uji aktivitas selulolitik terhadap isolat bakteri selulolitik yang diperoleh menunjukkan bahwa 6 isolat bakteri, yaitu Fh-1, Fh-9, Fh-22, yang berasal dari cairan rumen sapi Peranakan *Fries Holland* (PFH) dan isolat Lo-5, Lo-8, serta Lo-10, dari cairan rumen sapi *Limousin Peranakan Ongole* (Limpo), memiliki nilai indeks selulolitik lebih tinggi dibandingkan dengan isolat lain. Semakin tinggi nilai indeks selulolitik, semakin tinggi potensi mikroorganisme tersebut. Enam isolat terpilih selanjutnya diamati secara mikroskopis. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan

gram. Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis dari keenam isolat bakteri, semua isolat bakteri bersifat gram positif berbentuk basil dan memiliki spora (Gambar 4.2 dan Tabel 4.2). Ketiga ciri ini merupakan ciri bakteri genus *Bacillus*. Lamid *et al.* (2011) dalam penelitiannya memperoleh 7

spesies bakteri selulolitik aerob dari cairan rumen sapi yang terdiri dari genus *Nitrosomonas*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Acidothermus*, *Lactobacillus*, dan *Cellvibrio*.

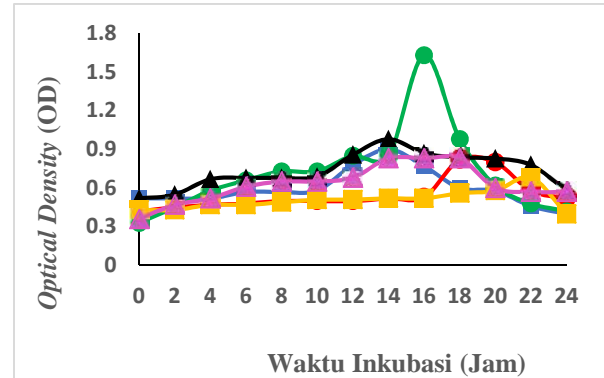


Gambar 4. 2 Isolat bakteri asal cairan rumen sapi usia 24 jam

Keterangan: (a) Fh-1, (b) Fh-9, (c) Fh-22, (d) Lo-5, (e) Lo-8, (f) Lo-10

Berdasarkan pengamatan mikroskopis dan makroskopis, isolat bakteri Fh-1 memiliki kemiripan dengan isolat Lo-8, berbentuk basil dengan letak spora subterminal (Gambar 4.2). Morfologi koloni dari kedua isolat ini berbentuk bulat dengan tepi yang rata, berwarna putih kekuningan, dan permukaan koloni raised (Tabel 4.1). Berdasarkan uji biokimia bakteri (Tabel 4.2), sifat fisiologis dari kedua isolat ini juga mirip, hanya ada perbedaan pada uji urea. Isolat bakteri Fh-9 dan Lo-5 juga memiliki kemiripan berdasarkan pengamatan mikroskopis, makroskopis, dan uji biokimia. Kedua isolat tersebut memiliki bentuk basil dengan spora subterminal (Gambar 4.2). Morfologi dari kedua isolat ini adalah berbentuk bulat dengan tepi tidak rata, berwarna putih susu, dan permukaan koloninya convex (Tabel 4.1). Hasil uji biokimia dari kedua isolat ini juga menunjukkan kesamaan terkecuali pada uji hidrolisis gelatin (Tabel 4.2). Pengamatan mikroskopis, makroskopis, dan uji biokimia isolat bakteri Fh-22 menunjukkan kemiripan dengan isolat Lo-10. Kedua isolat ini

berbentuk sel basil dengan spora subterminal (Gambar 4.2). Koloni kedua isolat berbentuk bulat dengan tepi yang tidak rata, berwarna putih kekuningan dengan permukaan koloni raised (Tabel 4.1). Terdapat dua uji biokimia yang berbeda yaitu uji hidrolisis gelatin dan fermentasi asam dari manitol (Tabel 4.2).



Gambar 4.2 Kurva pertumbuhan enam isolat bakteri selama waktu inkubasi 24 jam menggunakan *rotary shaker*.

Keterangan:

- Fh-1 : █
- Fh-9 : █
- Fh-22 : █
- Lo-5 : █
- Lo-8 : █
- Lo-10 : █

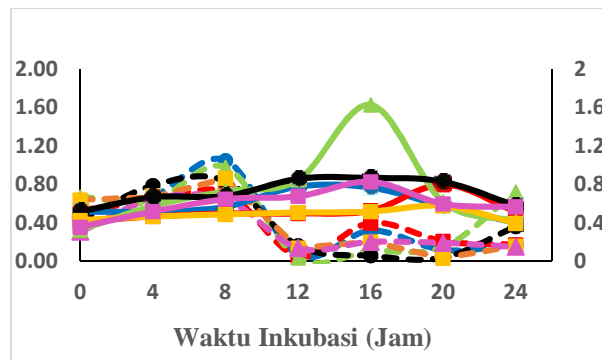
Tabel 4. 2 Uji biokimia enam isolat bakteri asal cairan rumen sapi

No.	Uji Biokimia	FH 1	LO 8	FH 9	LO 5	FH 22	LO10
1	Bakteri Gram	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
2	Bentuk Sel	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil
3	Spora	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
4	Bentuk Spora	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval
5	Posisi spora	ST	ST	ST	ST	ST	ST
6	Fermentasi asam Glukosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
7	Motilitas	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
8	Reduksi Nitrat	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	Katalase	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
10	Hidrolisis Pati	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	Hidrolisis Gelatin	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
12	Hidrolisis Casein	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
13	Uji Indol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

14	Uji VP	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	Pemanfaatan Citrat	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	Fermentasi asam Manitol	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
17	Fermentasi asam Arabinosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
18	Urea	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
19	Suhu 45	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
20	Suhu 65	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
21	ph 5.7	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
22	Pertumbuhan pada NaCl 7%	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
23	Oksidatif	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
24	Fermentatif	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
25	Pertumbuhan Anaerobic	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
26	Pertumbuhan pada <i>Anaerobic Glucose Broth</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Keenam isolat tersebut digunakan untuk penelitian selanjutnya, yang meliputi pengamatan pertumbuhan, aktivitas selulase, kadar protein, dan aktivitas spesifik selulase. Hasil pengamatan terhadap kurva pertumbuhan (Gambar 4.3) menunjukkan pola pertumbuhan yang berbeda antar semua isolat. Perbedaan terdapat pada lamanya isolat bakteri mengalami fase lag, fase log, fase stationer, dan fase kematian. Fase log pada setiap isolat bakteri rata-rata terjadi pada waktu inkubasi 14-18 jam, lalu setelah itu mengalami fase stationer yang singkat, dan kemudian masuk ke fase kematian. Kemampuan bakteri dalam tumbuh dan berkembang, termasuk lamanya bakteri mengalami fase lag dan fase log, tergantung kepada spesies bakteri tersebut yang berkenaan dengan respon fisiologisnya terhadap suatu lingkungan. Menurut Backlof (2011 dalam Ibrahim & El-Diwany 2007), lama waktu bakteri berduplikasi tergantung pada spesies bakteri dan faktor lingkungan.

Hasil pengukuran aktivitas selulase dari isolat bakteri selulolitik terlihat pada Gambar 4.4. Satu unit aktivitas selulase dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 μmol glukosa. Aktivitas selulase tertinggi dari semua isolat bakteri terjadi sebelum bakteri memasuki fase log, pada waktu inkubasi 8 jam. Hal ini dapat disebabkan, karena bakteri menghasilkan enzim selulase untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa yang digunakan sebagai sumber karbon dalam pertumbuhan dan perkembangan sel bakteri. Menurut Gonzalez (2014), enzim selulase ekstraseluler mengurai ikatan - glikosidik dari selulosa menjadi gula (glukosa) untuk digunakan oleh bakteri tersebut sebagai sumber karbon untuk tumbuh dan berkembang.

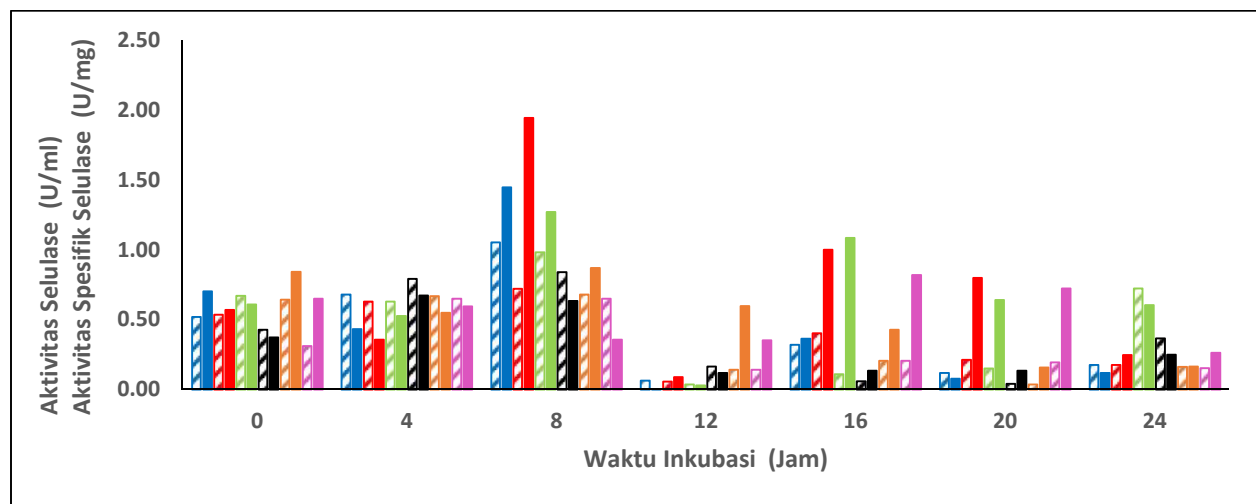


Gambar 4.4 Kurva pertumbuhan dan aktivitas selulase enam isolat bakteri selama

waktu inkubasi 24 jam menggunakan *rotary shaker*.

Keterangan:

- | | |
|--|--|
| Fh-1 : █ | Lo-5 : █ |
| Fh-9 : █ | Lo-8 : █ |
| Fh-22 : █ | Lo-10 : █ |
| Kurva Pertumbuhan : _____ | |
| Aktivitas Selulase : - - - - - | |



Gambar 4.5 Aktivitas selulase dan aktivitas spesifik selulase enam isolat bakteri selama waktu inkubasi 24 jam menggunakan *rotary shaker*.

Keterangan:

- | | |
|--|--|
| Fh-1 : █ | Lo-5 : █ |
| Fh-9 : █ | Lo-8 : █ |
| Fh-22 : █ | Lo-10 : █ |

Pada waktu inkubasi 12 jam, aktivitas selulase mengalami penurunan. Hal ini terjadi, karena kandungan glukosa tinggi yang ditunjukkan pada waktu inkubasi 8 jam, bersifat represi pada sintesis enzim selulase. Hal ini sesuai dengan pernyataan Xiao *et al.*, (2004) bahwa, glukosa pada medium kultur yang tidak digunakan oleh bakteri akan menyebabkan menurunnya produksi selulase, karena terjadinya represi katabolit. Represi diartikan sebagai penghambatan

sintesis enzim yang dibutuhkan untuk mengubah substrat menjadi produk akhir.

Aktivitas selulase isolat Fh-22, Lo-5, dan Lo-8 pada waktu inkubasi 24 jam, justru mengalami peningkatan. Hal ini terjadi karena, keadaan lingkungan kultur mengalami penurunan kadar glukosa, yang merupakan sumber karbon yang dibutuhkan, sehingga bakteri merespon keadaan tersebut dengan mensintesis enzim selulase dalam jumlah besar untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Anggarawati (2012)

menyatakan bahwa, peningkatan aktivitas selulase terjadi ketika kadar glukosa dalam lingkungan kultur berkurang, sehingga bakteri mensintesis enzim selulase dalam jumlah besar agar dapat menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Pada kondisi kultur yang masih mengandung banyak glukosa, bakteri tidak akan banyak memproduksi enzim selulase, sehingga aktivitas selulasenya rendah. Fenomena ini seperti *switch off-on*, karena bakteri menghasilkan enzim selulase untuk dapat bertahan dan tumbuh dalam lingkungan yang mengandung selulosa.

Hasil pengukuran aktivitas selulase dan aktivitas spesifik selulase (Gambar 4.5) menunjukkan bahwa, semua isolat pada waktu inkubasi 4 jam memiliki nilai aktivitas selulase tinggi dan nilai aktivitas spesifik selulasenya rendah, hal ini terjadi karena kadar protein totalnya tinggi. Kadar protein yang tinggi dengan aktivitas spesifik enzim yang rendah menunjukkan bahwa, protein yang terukur tidak hanya protein dari enzim selulase, melainkan terdapat protein dari enzim lain atau protein struktural bakteri. Menurut Raharjo (2014 dalam Anggraeni *et al.*, 2008), bakteri *Bacillus* sp. dapat menghasilkan enzim ekstraseluler selain selulase yaitu protease untuk menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi asam amino. Fitrahmayani (2010 dalam Deviani *et al.* 2014) menambahkan bahwa, aktivitas spesifik enzim menunjukkan suatu ukuran kemurnian enzim atau dapat digunakan sebagai indikasi ada tidaknya inhibitor enzim atau represor sintesis enzim di dalam media produksi enzim. Apabila kadar protein tinggi, tetapi aktivitas spesifik rendah, maka ini menunjukkan selain adanya protein lain, konsentrasi inhibitor dalam media produksi enzim tinggi. Kadar protein tinggi juga dapat diakibatkan karena protein yang terukur termasuk protein struktural bakteri dan protein yang terkandung dalam medium.

Perbedaan produksi dan kemurnian enzim selulase dari semua isolat bakteri ditunjukkan pada Gambar 4.5. Aktivitas spesifik enzim adalah jumlah unit enzim per miligram protein. Semakin besar aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan, maka semakin murni protein dari enzim tersebut. Nilai aktivitas spesifik selulase yang tinggi dihasilkan oleh isolat Fh-9 dan Lo-8 pada waktu inkubasi 8 jam. Hal ini menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi tersebut, Fh-9 dan Lo-8 memproduksi protein murni yang tinggi dari enzim selulase.

SIMPULAN

Bakteri selulolitik berhasil diisolasi dari sampel cairan rumen sapi, Peranakan Fries Holland (PFH) dan Limousin peranakan Ongole (Limpo). Enam isolat bakteri menunjukkan potensi aktivitas selulolitik yang tinggi. Aktivitas spesifik selulase tinggi ditunjukkan oleh isolat Fh-9 dan Lo-8 pada waktu inkubasi 8 jam. Bakteri-bakteri tersebut diidentifikasi sebagai bakteri genus *Bacillus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggarawati, D. 2012. Aktivitas Enzim Selulase Isolat SGS 2609 BBP4B-KP menggunakan Substrat Limbah Pengolahan Rumput Laut yang Dipertreatment dengan Asam. *Skripsi*. Universitas Indonesia, Jakarta.
- Anggraeni, Y.M., 2008. Produksi Aktivitas Selulase *Bacillus* sp. DUCC-BR-KI.3 Dengan Penambahan Mg^{2+} . *Skripsi*. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Deviani, S., Y. Haryani, and J. Christine. 2014. Isolasi dan Uji Aktivitas Bakteri Selulolitik dari Air Muara Daerah Aliran Sungai Siak Wilayah Kabupaten Bengkalis. *JOM FMIPA Vol. 1 No. 2*. Universitas Pekanbaru. Pekanbaru.

Gonzalez, A.C., M.B. Barraza, J.D.Viveros, and A.C.Martinez. 2014. Rumen Microorganisms and Fermentation. *Arch Med Vet* 46 (349-361).

Ibrahim, A.S.S. and El-Diwany, A. 2007. Isolation and Identification of New Celluloses Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4): 473-478. Department of Chemistry of Natural and Microbial Products, National Research Centre, Dokki, Kairo.

Lamid, M., T. P. Nugroho, S. Chusniati dan K. Rochiman. 2011. Eksplorasi Bakteri Selulolitik Asal Cairan Rumen Sapi Potong sebagai Bahan Inokulum Limbah Pertanian. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan* 4:1. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.

Sumardjo, D. 2009. Pengantar Kimia: Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran pada Program Strata I Fakultas Bioeksakta. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.

Xiao, Z., X. Zhang, D.J. Greg, and J.N. Saddler. 2004. Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and -Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113-116 (1115-1127). University of British Columbia, Canada.

Yang, W., M. Fanxu, P. Jiayin, H. Peng, F. Fang, M. Li and C. Binyun. 2014. Isolation and Identification of a Cellulolytic Bacterium from The Tibetan Pig's Intestine and Investigation of Its Cellulase Production. *Electronic Journal of Biotechnology*. College of Animal

Science and Technology, Luoyong Normal University, Luoyong, China.