
**ISOLASI DAN SELEKSI BAKTERI KANDIDAT SELULOLITIK DARI PROSES
PEMBUATAN PUPUK ORGANIK PADA PENGOLAHAN LIMBAH
PETERNAKAN**

***ISOLATION AND SELECTION OF CANDIDATE CELLULOLYTIC BACTERIA
FROM ORGANIC FERTILIZER MANUFACTURING PROCESS IN LIVESTOCK
WASTE PROCESSING***

Received : Sept 9th 2022

Accepted : Oct 2nd 2022

Akhmad Hidayatulloh*¹

Nadhira Yahdiyani¹

Lilih Siti Nurhayati¹

Fakultas Peternakan

Universitas Padjadjaran

*Korespondensi:

Akhmad Hidayatulloh

Fakultas Peternakan

Universitas Padjadjaran

Jalan Raya Bandung-

Sumedang KM 21 Jatinangor,

Sumedang. 45363.

e-mail:

hidayatulloh@unpad.ac.id

Abstract. Cattle farming is one of the livestock business commodities in Indonesia. In the production process, cattle farms produce waste in the form of feces and leftover feed which can be processed in such a way through a decomposition process into organic fertilizer. The rate of the decomposition process is influenced by the existing decomposer microbes. One of the microbes needed in the decomposition process is cellulolytic bacteria. The research was conducted to obtain potential cellulolytic bacterial isolates from the compost which can then be used as a starter in the decomposition process. This research was conducted experimentally and explorative with the stages of research including isolation of bacteria from decomposers, the isolates obtained were then reviewed on Nutrient Agar media to produce uniform colonies. Furthermore, screening was carried out to obtain cellulolytic bacteria using NA media added with 1% CMC (Carboxymethyl Cellulose). Based on the results of the study, obtained 7 bacterial isolates that have various cellulolytic indices. The best cellulolytic index was produced by isolates NC-12, NC-17, and NC-16.

Keywords: *Bacteria, Cellulolytic, CMC, Decomposition, Waste.*

Sitasi:

Hidayatulloh, A., Yahdiyani, N. & Nurhayati, L.S. (2022). Isolasi dan seleksi Bakteri Kandidat Selulolitik Dari Proses Pembuatan Pupuk Organik Pada Pengolahan Limbah Peternakan. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 3(2):65-72.

PENDAHULUAN

Limbah peternakan merupakan hasil buangan dari suatu proses dalam usaha peternakan. Limbah yang dihasilkan dari usaha peternakan meliputi limbah ternak dan limbah proses

produksi ternak. Jumlah populasi sapi di Jawa Barat adalah 415.036 ekor pada tahun 2021 yang tentunya akan menghasilkan limbah dengan jumlah yang besar (BPS 2022). Limbah ternak merupakan limbah yang dihasilkan dari

ternak yang dibudidayakan. Limbah ternak berasal dari proses metabolisme yakni gas metabolit (CO₂, NH₃, dll.), limbah cair berupa urin, dan limbah padat berupa feses. Sedangkan limbah proses produksi meliputi sisa pakan, air, dan limbah rumah tangga.

Feses dan sisa pakan merupakan salah satu limbah dari usaha peternakan yang terdiri dari bahan organik kompleks. Bahan organik kompleks tersebut dapat diolah menjadi pupuk kompos melalui proses dekomposisi. Proses dekomposisi merupakan proses penyederhanaan bahan organik kompleks menjadi bahan organik yang lebih sederhana dari campuran antara feses ternak dan sisa pakan dengan perbandingan tertentu berdasarkan kandungan Karbon dan Nitrogen yang diinkubasi secara anaerob selama 7 hari. Selama proses dekomposisi, mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi tersebut dapat berupa bakteri, ragi, maupun kapang. Pada proses pembuatan pupuk organik, mikroorganisme yang berperan merupakan indigenous mikroorganisme yang dapat hidup dan berkembang biak. Salah satu mikroorganisme yang dapat berperan dalam proses pembuatan pupuk organik adalah bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik berperan sebagai pendegradasi selulosa dan banyak ditemukan pada limbah organik baik dari sisa pakan maupun dari feses. Pada penelitian yang telah dilakukan mengisolasi bakteri selulolitik dari limbah kotoran ternak didapatkan dua isolat yang mampu mendegradasi

senyawa selulosa dengan kategori sedang (Fakhrudin, dkk. 2020)

Selulosa menempati 30-45 % dari limbah pertanian dan peternakan. Sebagian besar selulosa yang terdapat pada limbah tersebut berupa ligno-selulosa (Meriyandini, dkk. 2009). Dengan bantuan enzim selulase, selulosa dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon mikroba. Oleh karena itu untuk memperoleh agen potensial pendegradasi selulosa dan mempercepat proses pembuatan pupuk organik perlu dilakukan seleksi bakteri selulolitik indigenous. Bakteri indigenous memiliki sifat toleransi yang lebih tinggi terhadap kondisi lingkungan tempat bakteri berasal. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan isolat bakteri selulolitik potensial yang dapat digunakan sebagai starter guna mempercepat proses pembuatan pupuk organik.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan secara eksperimental dan eksploratif dengan menggunakan dekomposan sebagai objek penelitian. Dekomposan merupakan hasil dekomposisi campuran feses sapi dan jerami dengan perbandingan tertentu berdasarkan pada kandungan Karbon dan Nitrogen (Nisbah C/N 30) dari masing-masing bahan tersebut. Dekomposan diinkubasi secara anaerob selama 7 hari dengan tujuan mengubah bahan organik kompleks menjadi bahan organik yang lebih sederhana dengan bantuan mikroba. Penelitian terdiri dari dua tahap. Tahap pertama dilakukan isolasi bakteri dari dekomposan. Pada tahap kedua dilaku-

kan seleksi bakteri kandidat selulolitik berdasarkan nilai indeks aktivitas selulolitik terbaik.

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, cawan petri, gelas ukur, hoki stik, inkubator, jangka sorong, *inoculating loop*, botol schott, *laminar air flow*, pembakar bunsen, mikro pipet, rak tabung reaksi, refrigerator, tabung reaksi, timbangan analitik, *vortex stirrer*, dan orbital shaker.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah dekomposan, NaCl 0,9%, Alkohol 70%, media Nutrient Agar Merek Himedia, Carboxymethyl Cellulose, larutan McFarland (9,95 mL H₂SO₄ 1% dan 0,5 mL BaCl₂ 1%), Carbol Gentiana Violet, Iodine, , Alkohol 96%, Safranin, dan kertas cakram dengan diameter 6 mm.

1. Penyiapan Media

Media yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari media isolasi dan media seleksi. Media visolasi menggunakan Nutrient Agar (NA) yang dibuat dengan melarutkan NA sebanyak 28 gram dalam 1000 mL akuades. Larutan yang terbentuk dimasukkan ke dalam botol schott dan dipanaskan hingga NA larut dengan sempurna. Selanjutnya NA disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian media dituangkan ke dalam cawan petri masing-masing 25 mL dan dibiarkan memadat.

Media seleksi yang digunakan untuk screening bakteri selulolitik menggunakan media NA-CMC

(*Carboxymethyl cellulose*) yang dibuat dengan melarutkan NA sebanyak 28 gram dalam 500 mL akuades dan 1% CMC (10 gram) dalam 500 mL akuades. Keduanya dipanaskan secara terpisah hingga larut sempurna kemudian dicampurkan dalam botol schott. Selanjutnya NA-CMC disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian media dituangkan ke dalam cawan petri masing-masing 25 mL dan dibiarkan memadat.

2. Isolasi Bakteri Selulolitik

Kandidat bakteri selulolitik diisolasi dari sampel berupa dekomposan yang dihasilkan dari proses dekomposisi. Dilakukan pengenceran berseri menggunakan NaCl 0,9% terhadap sampel dekomposan yang telah selesai diinkubasi. Pengenceran ke-4, 5, dan 6 diinokulasikan dengan metode spread plate ke dalam media NA yang telah disiapkan sebelumnya. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Seluruh koloni bakteri yang tumbuh pada median NA kemudian diisolasi dengan metode streak kuadran pada media NA baru hingga didapatkan koloni bakteri tunggal (Kasana, dkk. 2008).

3. Pengukuran Aktivitas Selulolitik

Aktivitas selulolitik dapat diketahui dengan cara menghitung indeks selulolitik isolat. Masing-masing isolat yang diperoleh dari proses isolasi diambil menggunakan *inoculating loop* dan dilarutkan ke dalam NaCl 0,9%. Suspensi bakteri tersebut distandarkan

dengan McFarland 0.5 yang setara dengan jumlah bakteri 1.5×10^8 CFU/mL dengan absorbansi 0,08 – 0,1 pada Panjang gelombang 600 atau 625 nm. Suspensi bakteri tersebut kemudian ditanam pada kertas cakram yang telah diletakkan di atas media NA-CMC sebanyak 10 μ L kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengukuran luas zona bening yang dihasilkan bakteri kandidat selulolitik pada media NA-CMC dilakukan dengan melakukan pewarnaan menggunakan 1% Congo Red. Larutan Congo Red dituangkan ke dalam petri yang telah diinkubasi hingga larutan menutupi seluruh permukaan petri. Pewarnaan dilakukan selama 15 menit diatas orbital shaker. Pewarna kemudian dibuang dan media dibilas dengan NaCl 0,9% hingga zona bening terlihat dan dapat diukur. Zona bening yang terbentuk disekitar koloni menggambarkan aktivitas selulolitik dari bakteri. Indeks selulolitik diukur menggunakan rumus berikut (Sumardi dkk, 2018).

$$SI = \frac{\text{Diameter zona bening (mm)} - \text{Diameter koloni (mm)}}{\text{Diameter koloni (mm)}}$$

Keterangan:

SI= Indeks Selulolitik

4. Pengamatan pada Bakteri Terseleksi

Tiga isolat bakteri dengan indeks selulolitik terbaik kemudian dikoleksi. Dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis terhadap tiga isolat kandidat bakteri selulolitik terseleksi tersebut. Pengamatan makroskopis meliputi bentuk koloni, warna

koloni, permukaan koloni dan tepian koloni. Sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan dengan menggunakan pewarnaan Gram dan spora sehingga diketahui morfologi bakteri tersebut secara mikroskopis (Jutono, dkk. 1980).

Pewarnaan Gram dilakukan dengan mengambil satu ose dari setiap isolat kandidat bakteri selulolitik terseleksi, selanjutnya dilarutkan dengan akuades dan difiksasi di atas nyala api pada kaca objek hingga dihasilkan preparat ulas. Preparat ulas tersebut diwarnai dengan Carbol Gentiana Violet selama 1 menit kemudian dibilas dengan akuades. Selanjutnya preparat ulas diberi larutan iodine selama 1 menit kemudian dibilas dengan akuades. Selanjutnya dilakukan destaining menggunakan Alkohol 96% dan dibilas menggunakan akuades. Selanjutnya dilakukan pewarnaan kedua dengan menggunakan safranin selama 1 menit kemudian dibilas menggunakan akuades. Preparat yang telah selesai diwarnai kemudian dikeringkan lalu ditetesi dengan minyak Immersi dan diamati menggunakan mikroskop binokuler Olympus CX-23 pada perbesaran 10x100 (Rahmawati, 2016).

Pewarnaan spora dilakukan dengan membuat suspensi bakteri yang ditambahkan Carbol Fuchsin dengan perbandingan 1:1 dalam tabung reaksi steril. Kemudian suspensi bakteri tersebut dipanaskan pada suhu 80°C selama 10 menit di atas penangas air. Suspensi bakteri tersebut kemudian dibuat preparat ulas pada gelas objek. Preparat di tetesi H₂SO₄ 1% kemudian

dibilas dengan akuades. Preparat selanjutnya ditetesi Methylene Blue dan didiamkan selama 2 menit. Preparat selanjutnya dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Preparat yang telah selesai diwarnai lalu ditetesi dengan minyak Immersi dan diamati menggunakan mikroskop perbesaran 10x100 (Sunatmo, 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi bakteri selulolitik diawali dari proses isolasi bakteri pada media Nutrient Agar (NA). pada tahap isolasi awal diperoleh 7 isolat yaitu NC-11, NC-12, NC-13, NC-14, NC-15, NC-16, dan NC-17. Seluruh isolate yang diperoleh dimurnikan pada masing-masing cawan petri menggunakan metode quadrant streaking hingga diperoleh isolat yang murni dengan penampilan makroskopis yang seragam. Aktivitas selulolitik diuji terhadap isolate yang telah dimurnikan tersebut.

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas selulolitik yang dilakukan, sebanyak enam dari ketujuh isolat bakteri kandidat selulolitik menghasilkan zona bening pada media NA-CMC. Hal tersebut menandakan bahwa keenam isolat bakteri kandidat selulolitik tersebut memiliki aktivitas yang menguraikan selulosa (Tabel 1). Aktivitas selulolitik terjadi akibat sekresi enzim selulase yang mampu memecah ikatan 1,4 β -glukosida dalam media uji. Selulosa dihidrolisis oleh enzim selulase menjadi glukosa dalam media NA-CMC sehingga media yang berada di sekitar koloni bakteri tidak terwarnai oleh bahan pewarna Congo Red (Gambar 1).

Bagian media yang tidak terwarnai oleh bahan pewarna biasa disebut sebagai zona bening. Kemampuan isolat tersebut tumbuh pada media selulosa membuktikan bahwa isolat tersebut mampu memanfaatkan selulosa sebagai salah satu sumber nutriennya (Sari, dkk. 2012).



Gambar 1. Luasan koloni bakteri dan luasan zona bening media NA-CMC setelah pewarnaan menggunakan congo red

Tabel 1. Isolat bakteri kandidat selulolitik dan indeks selulolitiknya.

No.	Kode Isolat	Økoloni (cm)	Ø	
			Zona Bening (cm)	Indeks Selulolitik
1	NC-12	0,74	1,60	1,16
2	NC-17	1,00	1,92	0,92
3	NC-16	1,05	1,99	0,90
4	NC-15	1,06	1,90	0,79
5	NC-13	1,35	2,25	0,67
6	NC-14	0,65	0,98	0,51
7	NC-11	0,84	-	-

Indeks selulolitik menunjukkan kemampuan isolat tersebut dalam mendegradasi selulosa yang terdapat pada media NA-CMC. Dari seluruh isolate bakteri kandidat selulolitik diperoleh 3 isolat bakteri yang memiliki indeks selulolitik terbaik. Isolat bakteri kandidat selulolitik yang memiliki indeks terbaik adalah NC-12, NC-17,

dan NC-16. Selanjutnya dilakukan pengamatan secara makroskopis (Tabel 2) dan mikroskopis (Tabel 3) terhadap ketiga isolat bakteri kandidat selulolitik tersebut.

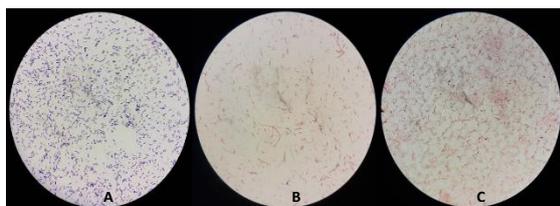
Tabel 2. Morfologi Koloni Isolat Bakteri Kandidat Selulolitik

No	Kode Isolat	Bentuk koloni	Tepian	Warna	Permukaan
1	NC-12	Bulat kecil	Rata	Putih	Datar
2	NC-17	Bulat kecil	Rata	Putih Bening	Datar
3	NC-16	Bulat kecil	Rata	Putih	Cembung

Setelah dilakukan pengamatan secara makroskopis terhadap isolat bakteri kandidat selulolitik terbaik selanjutnya dilakukan pengamatan secara mikroskopis. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan metode pewarnaan Gram dan pewarnaan spora pada preparat ulas dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x10 (Gambar 2).

Tabel 3. Morfologi Sel Isolat Bakteri Kandidat Selulolitik

No	Kode Isolat	Bentuk sel	Pewarnaan Gram	Spora
1	NC-12	Basil Pendek	Positif	Negatif
2	NC-17	Basil Panjang	Negatif	Negatif
3	NC-16	Basil Pendek	Negatif	Positif



Gambar 2. Hasil Pewarnaan Gram isolat bakteri kandidat selulolitik (A) Isolat NC-12; (B) Isolat NC-17; (C) Isolat NC-16 pada perbesaran 10 x 100.

Dari Gambar 2 diperlihatkan bahwa isolat NC-12 tergolong bakteri Gram positif, hal ini ditandai dengan morfologi bakteri yang berwarna ungu setelah diberikan zat pewarna sedangkan isolat NC-17 dan NC-16 adalah bakteri Gram negatif merupakan bakteri yang kehilangan kompleks ungu kristal pada waktu pembilasan dengan alkohol, namun kemudian terwarnai dengan pewarna tandingan yaitu safranin sehingga sel – sel tampak berwarna merah muda pada akhir pewarnaan. Struktur dinding sel pada isolat bakteri merupakan dasar yang membedakan hasil akhir pewarnaan Gram (Pelczar dan Chan, 2007).

Pewarnaan spora dilakukan untuk mengamati kemampuan suatu bakteri menghasilkan spora yang berfungsi melindungi sel vegetatif dari kondisi ekstrim di luar sel yang dapat membahayakan (Hadioetomo, R.S., 1993). Dari Tabel 3 diperlihatkan bahwa isolat NC-12 dan NC-17 tidak membentuk spora sedangkan isolat NC-16 mampu membentuk spora. Bakteri pembentuk spora lebih tahan panas dengan bakteri tidak membentuk spora.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat 7 isolat bakteri hasil isolasi dari dekomposisi dengan aktivitas selulolitik. Berdasarkan indeks selulolitiknya diperoleh 3 isolat terbaik yaitu NC-12, NC-17, dan NC-16. Isolat terbaik yaitu NC-12 mempunyai karakteristik koloni berbentuk bulat kecil, tepian rata, ber-

warna putih, dan permukaan rata serta mempunyai karakteristik sel isolat basil pendek, Gram negatif dan tidak berspora.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada hibah riset internal (Riset Tenaga Kerja Unpad) yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Anand, Vennison, Sankar, Prabhu, Vasanth, Raghuraman, Geoffrey, dan Vendan. (2009). Isolation and characterization of Bacteria from Gut of Bombyx Mori that Degrade Cellulose, Xylan, Pectin and Starch and Their Impact on Digestion. *J of Insect Science*, 10(107): 1-20.

Baharuddin, A.S., Razak, M.N.A., Hock, L.S., Ahmad, M.N., Aziz S.A., Rahman, N.A.A., dan Shah, U.K.M. (2010). Isolation and Characterization of Thermophilic Cellulose-Producing Bacteria from Empty Fruit Bunches Palm Oil Mill Effluent Compost, *American Journal of Applied Sciences*, 7: 56-62.

Fahrudin, Nur, H., Mustika, T. (2020). Potensi Bakteri Dari Limbah Kotoran Ternak Dalam Mendegradasi Selulosa. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 11(1): 16-20.

Hadioetomo, R.S. (1993). *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama

Puspitasari, Fajar Diah. Shovitri, Maya. dan Kuswytasari. (2012). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Proteolitik dari Tangki Septik. *Jurnal Sains Dan Seni ITS* 1(1).

Rahmawati, Nur. (2016). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik Dari Feses Hewan Luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*). *Jurnal Biologi* ,5(4).

Sumardi, Rochmah Agustina, Christina Nugroho Ekowati, dan Yovita Selvie Pasaribu. (2018). Characterization of protease from bacillus sp. on medium containing FeCl₃ exposed to magnetic field 0.2 mt. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 130.

Sunatmo TI. (2007). *Eksperimen Mikrobiologi Dalam Laboratorium*. Bogor: Ardy Agency.

Matthew, Sherry, Bryan and Jenkins. (2003). *How Straw Decomposes: Implication for Straw Bale Construction*. www.osbbc.ca

Zahidah dan Shovitri. (2013). Isolasi, Karakterisasi Dan Potensi Bakteri Aerob Sebagai Pendegrasi Limbah Organik. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(1).

Jutono. (1980). Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum. Yogyakarta. Fakultas Pertanian UGM.

Rao, N.S.S. (1994). Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman. Edisi Kedua. Jakarta: Universitas Indonesia Press.