



## Isolasi dan Uji Patogenitas Bakteri Indigen Penghasil Enzim Selulase dari Limbah Ampas Kelapa di Pasar Tradisional Ngawen untuk Bioremediasi

### *Isolation and Pathogenicity Test of Indigenous Bacteria Producing Cellulase Enzymes from Coconut Waste of Ngawen Traditional Market for Bioremediation*

Nova Dwi Pamungkas<sup>1</sup>, Akbar Firmansyah<sup>2</sup>, Stalis Norma Ethica<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup>Program Studi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

<sup>2</sup>Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Diponegoro

<sup>1</sup>[novadwi323@gmail.com](mailto:novadwi323@gmail.com), <sup>2</sup>[norma@unimus.ac.id](mailto:norma@unimus.ac.id)

#### Abstrak

Pasar tradisional di Indonesia merupakan tempat perdagangan yang banyak menghasilkan sampah bahan organik berupa ampas kelapa dengan kandungan selulosa yang tinggi. Terdapat dua cara penanganan limbah ampas kelapa di pasar. Pertama adalah menyingkirkan atau menghancurkan limbah yang kedua yaitu dimanfaatkan atau pendauran ulang limbah. Bioremediasi adalah suatu cara mendegradasi limbah yang ramah lingkungan menggunakan mikroorganisme indigen hasil seleksi untuk ditumbuhkan pada polutan tertentu dengan maksud untuk menurunkan kadar polutan tersebut. Penelitian ini bertujuan mendapatkan isolat bakteri indigen nonpatogen penghasil enzim selulase dari limbah ampas kelapa di pasar tradisional untuk keperluan bioremediasi. Isolasi bakteri indigen dilakukan dengan cara kultivasi isolat bakteri hasil purifikasi koloni dari sampel ampas kelapa yang diambil dari Pasar Tradisional Ngawen di Indonesia. Uji penghasilan enzim selulase bakteri dilakukan pada media CMC Agar 1% yang ditandai oleh pembentukan zona bening selulase. Selanjutnya uji patogenitas bakteri selulolitik dilakukan pada media MacConkey (MC) dan *Blood Agar Plate* (BAP). Dari hasil penelitian ini diperoleh 4 isolat bakteri, yaitu AK1, AK2, AK3, dan AK4 yang seluruhnya merupakan bakteri selulolitik dan berdasarkan karakteristik pada media McConkey dan BAP bersifat nonpatogen. Dengan demikian keempat isolat bakteri selulolitik yang diperoleh memiliki berpotensi sebagai kandidat agen bioremediasi untuk mendegradasi limbah ampas kelapa di Pasar Tradisional Ngawen.

**Kata kunci:** Bioremediasi, limbah organik, ampas kelapa, bakteri selulolitik, Pasar Tradisional Ngawen

#### Abstract

*Traditional market in Indonesia is a trading place producing plenty of organic material in the form of coconut residue with high cellulose content. There are two ways to handle coconut waste in the market. First is to remove or destroy the waste, second is to recycle the waste. Bioremediation is a way to degrade waste in environmentally friendly way using indigenous organisms that are selected to be grown on certain pollutants in order to reduce levels of the pollutants. This study aims to obtain isolates of non-pathogenic indigenous bacteria producing cellulase enzymes from coconut waste in traditional markets for bioremediation purposes. Isolation of indigenous bacteria was carried out by cultivating bacterial isolates from colonization from coconut waste samples taken from Ngawen Traditional Market in Indonesia. Test of bacterial cellulase enzyme production was carried out on CMC agar 1% medium which was indicated by the formation of clear cellulase zones. Furthermore, the pathogenicity test of cellulolytic bacteria was carried out on MacConkey (MC) and Blood Agar Plate (BAP) media. As many as 4 bacterial isolates, namely AK1, AK2, AK3, and AK4 which are all cellulolytic bacteria were obtained and based on the characteristics of the McConkey and BAP media they were all non-pathogenic. Hence, all four cellulolytic bacteria isolates obtained in this study have the potential as candidates for bioremediation agents to degrade coconut waste in Ngawen Traditional Market.*

**Keywords:** Bioremediation, organic waste, coconut waste, cellulolytic bacteria, Ngawen Traditional Market

#### PENDAHULUAN

Pasar di Indonesia sebagai suatu tempat perdagangan yang berpotensi besar untuk menghasilkan timbunan sampah dan limbah cair (Jana dkk., 2006). Limbah pasar tradisional terdiri dari bahan organik berupa sisa sayuran, buah, daun, nasi dan lain-lain, dan anorganik



meliputi plastik, kain, kaca, dan sebagainya. Limbah pasar mengandung berbagai macam mikroba, diantaranya adalah protozoa, fungi, bakteri, dan virus (Marlina dkk., 2011).

Ada dua cara untuk penyelesaian persoalan limbah. Pertama ialah menyingkirkan atau menghancurkan limbah, yang kedua ialah mengolah limbah menjadi bahan atau barang berguna. Upaya yang kedua disebut juga pemanfaatan atau pendauran ulang limbah dan yang sudah tentu lebih menguntungkan dari pada cara pertama (Notohadiprawiro dkk., 1991).

Bioremediasi adalah salah satu cara yang penggunaannya menggunakan mikroorganisme yang telah dipilih untuk ditumbuhkan pada polutan tertentu yang bertujuan untuk menurunkan kadar polutan tersebut. Pada saat proses bioremediasi berjalan, enzim-enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme memodifikasi struktur polutan beracun menjadi tidak kompleks sehingga menjadi metabolit yang tidak beracun dan berbahaya (Priadie, 2012). Kelebihan dari teknologi bioremediasi ditinjau dari aspek komersil adalah relatif lebih ramah lingkungan, biaya penanganan yang relatif lebih murah dan bersifat fleksibel (Lembang, 2005).

Isolasi dan identifikasi merupakan metode yang bertujuan untuk mengetahui jenis mikroorganisme yang terdapat pada suatu substrat (Suardana dkk., 2007). Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh (Deviani dkk., 2014) menyimpulkan bahwa bakteri yang dapat tumbuh di media CMC Agar 1% adalah bakteri yang merupakan bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik sebagai penghasil enzim selulase digunakan menghidrolisis selulosa karena bakteri tersebut menghasilkan enzim selulase sebagai respon terhadap adanya selulosa pada lingkungannya. Proses ini berlangsung jika terjadi kontak langsung antara sel bakteri dengan permukaan selulosa (Meryandini dkk., 2009). Penelitian ini penting dilakukan untuk mengurangi limbah organik ampas kelapa di Pasar Tradisional Ngawen, Jawa Tengah.

## TINJAUAN PUSTAKA

Isolasi dan identifikasi merupakan metode yang bertujuan untuk mengetahui jenis mikroorganisme yang terdapat pada suatu substrat (Suardana dkk., 2007). Bakteri selulolitik sebagai penghasil enzim selulase digunakan menghidrolisis selulosa karena bakteri tersebut menghasilkan enzim selulase sebagai respon terhadap adanya selulosa pada lingkungannya. Proses ini berlangsung jika terjadi kontak langsung antara sel bakteri dengan permukaan selulosa (Meryandini dkk., 2009). Sedangkan kandungan ampas kelapa kering (bebas lemak) mengandung 93% karbohidrat yang terdiri atas: 61% galaktomanan, 26% manosa dan 13% selulosa (Balasubramanian, 1976). Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh (Deviani dkk., 2014) mengisolasi bakteri menggunakan media padat selulase yang mengandung *carboxymethyl cellulase* (CMC) 1%, dan menyimpulkan bahwa bakteri yang dapat hidup pada media tersebut merupakan bakteri selulolitik.

Identifikasi morfologi bakteri penghasil selulolitik dapat dilihat dengan cara mengisolasi bakteri menggunakan media agar CMC. Koloni bakteri yang tumbuh diidentifikasi berdasarkan morfologi bakterinya seperti perbedaan warna, bentuk, dan ukurannya. Setiap jenis koloni yang didapat dimurnikan dengan purifikasi. Proses purifikasi koloni bakteri dilakukan dengan cara sub-kultur, proses purifikasi dilakukan sebanyak 3x atau sampai mendapatkan suatu koloni murni. Uji kualitatif (zona bening) umumnya menggunakan metode pewarnaan *congo red* 0,1% dan iodin 1%. Isolat bakteri selulolitik digores pada media agar CMC. Bakteri diinkubasi selama tiga hari pada suhu 37°C dan kemudian dilakukan uji aktivitas bakteri dengan menambahkan *congo red* 0,1% sebanyak 15 mL dan didiamkan selama 30-60 menit. Setelah itu, dibilas sebanyak 2-3 kali dengan 15 mL NaCl 1 M dan didiamkan selama 15 menit.

Selain menggunakan *congo red* bisa juga dilakukan uji aktivitas bakteri dengan menggunakan iodin (Andriani dkk., 2012). Diameter zona bening dan diameter koloni yang terbentuk diukur. Uji aktivitas selulase dilihat dari indeks selulase yang terbentuk. Indeks



selulase merupakan nisbah antara zona bening dengan diameter koloni. Semakin besar indeks selulolitik yang dihasilkan maka semakin besar enzim yang dihasilkan oleh isolat bakteri tersebut. Indeks selulolitik atau indeks aktivitas selulase (IAS) diperoleh dengan menggunakan rumus berikut (Kader & Omar, 1998):

$$\text{Indeks selulolitik} = \frac{DB - DK}{DK}$$

ket :

DB = Diameter zona bening (mm)

DK = Diameter koloni (mm)

Pada penelitian ini dilakukan uji kualitatif dengan menambahkan iodine dan tidak menggunakan *congo red*.

## METODE

### Alat dan Bahan

Bahan utama untuk isolasi, perhitungan, pemurnian dan seleksi isolat bakteri adalah sampel limbah ampas kelapa dari bak penampung sampah di Pasar Tradisional Ngawen, Kabupaten Blora, akuades steril, medium *Nutrient Agar* (Sigma, Jerman), agar MacConkey (MC), agar darah (BAP) (ketiganya dari Thermo Scientific, UK), agar CMC (Sigma, Jerman) dan  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Jerman), dan pepton. Bahan untuk identifikasi morfologi adalah *Gram-staining reagent set* (Merck, Jerman).

Alat utama dalam sampling adalah botol 100-ml dengan *Teflon-lined septum caps* steril, kantong plastik *zip* dan pendingin. Untuk isolasi, pemurnian dan seleksi isolat bakteri, alat utamanya adalah cawan petri, tabung reaksi bertutup steril, laminar UV, mikroskop binokular, bunsen, labu ukur, *shaker*, inkubator, dan spektroskop UV-VIS. Instrumen untuk identifikasi morfologi yaitu mikroskop optik, *vortex* dan sentrifugator.

### Prosedur

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Tempat penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Oseanografi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK) Universitas Diponegoro, Semarang. Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan Agustus – Oktober 2018. Tempat pengambilan sampel bakteri adalah di tempat pembuangan sampah Pasar Tradisional Ngawen Kecamatan Ngawen Kabupaten Blora. Pengenceran sampel dilakukan dengan cara pertama menumbuk sampel sampai halus dengan mortar sebanyak 1 g lalu ditambahkan larutan NaCl fisiologis hingga 10 ml. Selanjutnya, sebanyak 5 tabung reaksi steril masing-masing diisi larutan NaCl fisiologis sebanyak 9 ml, lalu tabung reaksi diberi label tanpa pengenceran dan pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  dan  $10^{-5}$ . Sampel di pipet sebanyak 1 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung pengenceran  $10^{-1}$  dan dihomogenkan. Lalu dari tabung pengenceran  $10^{-1}$  diambil sampel sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke tabung pengenceran  $10^{-2}$ . Pengenceran dilakukan secara bertingkat hingga  $10^{-5}$ . Sampel hasil pengenceran selanjutnya diinokulasikan pada media NA. Setelah inkubasi 24 jam pada temperatur  $37^\circ\text{C}$  diamati morfologi koloni dan dilanjutkan dengan pewarnaan Gram (Ethica dkk., 2017; Ethica, 2018). Isolat bakteri lalu dipurifikasi menggunakan media NA sebanyak 3 kali atau hingga diperoleh koloni murni yang konsisten dan tidak bercampur dengan koloni bakteri lain. Koloni bakteri hasil purifikasi diinokulasikan ke dalam media MC Agar dan media BAP lalu diinkubasi 1x24 jam dengan suhu  $37^\circ\text{C}$ . Koloni bakteri yang tumbuh diamati. Pada media BAP dipilih koloni bakteri dengan tipe hemolisis gama, yaitu koloni yang tidak menunjukkan reaksi di sekitarnya atau tidak dapat menghemolisa sel darah merah (Buxton, 2005). Pada media MC agar, dipilih koloni yang menghasilkan warna merah muda

pada media yang menunjukkan yang menunjukkan kemampuan memfermentasikan laktosa. Uji penghasiian enzim selulase oleh bakteri dengan patogenitas rendah atau non patogen dilakukan menggunakan media CMC. Sampel bakteri yang telah lolos uji patogenitas diinokulasikan pada media CMC lalu di inkubasi selama 1x24 jam pada 37 °C. Koloni diinokulasi dengan metode *dotting*. Bakteri yang tumbuh dan menghasilkan zona bening jika ditambahkan larutan iodin 1% di sekitar koloni pada media CMC merupakan bakteri yang dapat menghasilkan enzim selulase.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran umum sampel Ampas Kelapa, memiliki tekstur lembab dan memiliki bau khas Ampas Kelapa yang sudah basi. Hasil isolasi bakteri sampel Ampas Kelapa ditemukan 4 isolat berbeda dan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1:  
Karakteristik Morfologi Isolat Bakteri

Kode	Bentuk	Warna	Ukuran (cm)	Tepi	Elevasi	Konsistensi
AK1	Bulat	Putih keruh	0,20	<i>Smoth</i>	<i>Convex</i>	Kering
AK2	Bulat	Putih	0,05	<i>Smoth</i>	<i>Convex</i>	Kering
AK3	Bulat	Putih bening	0,10	<i>Smoth</i>	<i>Convex</i>	Kering
AK4	<i>Swam</i>	<i>Swam</i>	NA	<i>Swam</i>	<i>Swam</i>	Berlendir

Koloni bakteri yang ditemukan pada isolasi bakteri pada sampel ampas kelapa diidentifikasi karakteristik dan jenisnya berdasarkan pewarnaan Gram (Darmawati dkk., 2014; Darmawati dkk., 2015). Hasil pewarnaan Gram koloni bakteri dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2:  
Karakteristik koloni bakteri pada pewarnaan Gram

Kode	Karakteristik Koloni
AK1	<i>Coccus</i> , soliter, Gram-positif
AK2	Basil, soliter, Gram-negatif
AK3	Basil, bergerombol, Gram-positif
AK4	Basil, soliter, Gram-positif



Isolat bakteri hasil purifikasi koloni diseleksi berdasarkan tingkat patogenitasnya menggunakan media MC dan BAP. Hasil seleksi dengan media MC ditunjukkan pada Gambar 1. Berdasarkan hasil yang ditunjukkan pada Gambar 1 terlihat bahwa semua isolat yang diperoleh mampu memfermentasi laktosa. Umumnya bakteri yang mampu melakukan fermentasi laktosa merupakan bakteri non patogen. Selanjutnya 4 isolat hasil seleksi dengan media MC diuji kemampuannya dalam menghasilkan enzim selulase menggunakan media CMC.

Gambar 2:

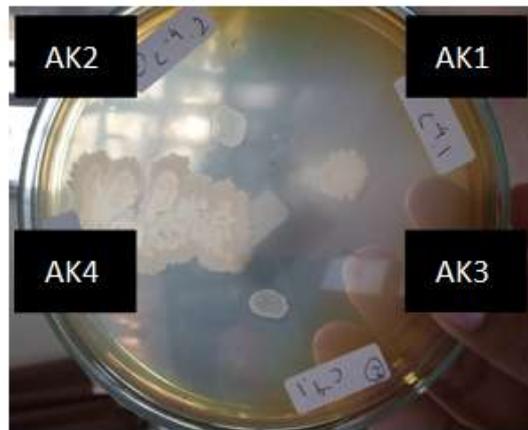
Isolat bakteri AK1, AK2, AK3 dan AK4 yang bersifat laktosa fermenter pada media MC (mengubah warna media MC menjadi berwarna merah muda).



Hasil uji penghasilan enzim selulase oleh 4 isolat bakteri hasil seleksi, yaitu AK1, AK2, AK3, dan AK4 pada media CMC ditunjukkan pada Gambar 3.

Gambar 3:

Isolat bakteri AK1, AK2, AK3, dan AK4 yang menghasilkan zona bening pada media CMC



Berdasarkan hasil yang ditunjukkan pada Gambar 3, terlihat bahwa seluruh isolat mampu menghasilkan zona bening selulase di sekitar koloni bakteri. Terbentuknya zona bening selulase ini membuktikan bahwa seluruh isolat yang diperoleh dalam penelitian ini merupakan penghasil enzim selulase (Ethica dan Sabdono, 2017).

Isolat AK1 – AK4 merupakan isolat bakteri indigen (bakteri asal) yang terdapat pada limbah ampas kelapa. Ampas kelapa kaya akan serat sehingga diyakini banyak mengandung bakteri penghasil selulase. Hipotesis tersebut terbukti dengan diperolehnya isolat AK1-AK4 pada penelitian ini yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase merupakan salah satu enzim hidrolitik yang penting dalam degradasi limbah organik (Ethica, 2018, Ethica dkk., 2018)

Selain merupakan isolat bakteri indigen yang menghasilkan enzim pendegradasi selulase, isolat AK1-AK4 juga menunjukkan indikasi sebagai bakteri yang nonpatogen. Hal ini berarti keempat isolat tersebut juga memenuhi kriteria aman untuk digunakan pada skala luas. Secara keseluruhan, hasil penelitian ini mampu mendapatkan isolasi dan seleksi bakteri selulolitik yang berpotensi untuk digunakan dalam proses bioremediasi limbah ampas kelapa, khususnya di Pasar Tradisional Ngawen, Blora.

## KESIMPULAN

Proses isolasi bakteri dari limbah ampas kelapa di Pasar Tradisional Ngawen, Blora menghasilkan 4 isolat bakteri yaitu, AK1, AK2, AK3, AK4. Dari hasil seleksi patogenitas keempat isolat tidak bersifat patogen. Dari hasil uji penghasilan enzim selulase terbukti



semua isolat mampu menghasilkan zona bening selulase yang berarti menghasilkan enzim selulase. Dengan demikian, keempat isolat bakteri yang diperoleh dari penelitian ini berpotensi untuk digunakan dalam proses bioremediasi limbah ampas kelapa.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Andriani, Y., Sastrawibawa, S., Safitri, R., & Abun. 2012. Isolasi dan identifikasi mikroba selulolitik sebagai biodegradator serat kasar dalam bahan pakan dari limbah pertanian. *IJAS2*, (3), 100-105.
- Subbramaniam, B. K. 1976. *Polyasaccharides of the Kernel of Maturity and mature coconuts*. *J. of Food Sci.* 41:1370-1371.
- Priadie, B. (2012). *Teknik Bioremediasi Sebagai Alternatif Dalam Upaya Pengendalian Pencemaran Air*. Pusat Litbang Sumber Daya Air, Kementerian PU. Jl. Ir. H. Juanda No. 193 Bandung.
- Buxton, R., 2005. *Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols*. American Society for Microbiology, Amerika Serikat.
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W. and Artama, W.T., 2015. Identifikasi bakteri batang gram negatif pada darah widal positif berdasarkan karakter fenotipik.
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W., Artama, W.T. and Kawaichi, M., 2014. Phylogenetic relationship of Gram Negative Bacteria of Enterobacteriaceae Family in the Positive Widal Blood Cultures based on 16S rRNA Gene Sequences. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 19(1), pp.64-70.
- Ethica, S.N. Saptaningtyas, R., Muchlissin, S.I. and Sabdono, A., 2018. The development method of hospital biomedical waste using hydrolitic bacteria. *Helth and Technology*, pp.1-16.
- Ethica, S.N., *Bioremediasi Limbah Biomedik Cair*, 2018, pp 1-158, Deepublish Publisher, Yogyakarta, ISBN 978-602-475-503-4
- Ethica, S.N., Muchlissin, S.I., Saptaningtyas, R. and Sabdono, A., 2017, Sampling Mikrobiologi Limbah Biomedis Rumah Sakit di Kota Semarang Jawa Tengah. In *Prosiding Seminar Nasional & Internasional* (Vol. 1, No. 1).
- Ethica, S.N., Muchlissin, S.I., Saptaningtyas, R., Sabdono, A., 2018. Protease Producers Predominate Cultivable Hydrolytic Bacteria Isolated from Liquid Biomedical Waste, *Asian Journal of Chemistry* 30(9): 2035-2038 DOI: 10.14233/ajchem
- Ethica, S.N., Oedjijoni, O., Semiarti, E., Widada, J., Raharjo, T.J., 2018. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Alcaligenes javanensis* JG3 Potential as an Effective Biograder, *Biotropia* 25(1): 1-10 DOI: 10.11598/btb.2018.25.1.583.
- Marlina, E.T. Hidayati, Y.A., Harlia, E. (2011). *Pengaruh penambahan berbagai starter pada proses pengomposan limbah pasar tradisional terhadap penurunan jumlah bakteri total dan koliform*. Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran Bandung
- Kader, A.J., & Omar, O. (1998). *Isolation of cellulolytic fungi from Sayap-Kinabalu Park, Sabah*. Serawak. *Journal of Biodiversity and BioConservation* (ARBEC), p. 1-6.
- 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. DOI: 10.7454/mss.v13i1.369
- Pratiwa, R., 2005 *Bioremediasi dengan Perlakuan Hayati*, (<http://www.bbpp-lembang.info/index.php/arsip/artikel/artikel-pertanian/962-bioremediasi-dengan-perlakuan-hayati>, diakses tanggal 11 September 2018).
- Deviani, S., Haryani, Y., Jose, C. (2014). *Isolasi Dan Uji Aktivitas Bakteri Selulolitik Dari Air Muara Daerah Aliran Sungai Siak Wilayah Kabupaten Bengkalis*. Bidang Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau



- Suardana, I.W., Suarsana, I.N., Sujaya, I.N., Wiryawan, K.G. (2007). *Isolasi dan Identifikasi bakteri asam laktat dari cairan rumen sapi bali sebagai kandidat biopreservatif*. Jurnal Veteriner, 8(4), 155 – 159.
- Jana, W., Mardani, N.K., Suyasa, I.W.B. (2006). *Analisis Karakteristik Sampah Dan Limbah Cair Pasar Badung Dalam Upaya Pemilihan Sistem Pengelolaannya*. Poltekkes Denpasar Jurusan Kesehatan Lingkungan