

SKRIPSI

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI SELULOLITIK AEROB

DARI LIMBAH CAIRAN RUMEN SAPI

SEBAGAI BAHAN INOKULUM

PADA JERAMI PADI



Oleh

TRI PRASETYO NUGROHO

BOJONEGORO – JAWA TIMUR

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2005

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI SELULOLITIK AEROB
DARI LIMBAH CAIRAN RUMEN SAPI
SEBAGAI BAHAN INOKULUM
PADA JERAMI PADI**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Oleh

TRI PRASETYO NUGROHO

NIM 060012766

Menyetujui,

Komisi Pembimbing

(Mirni Lamid, M.P., Drh)

Pembimbing Pertama

(Soepartono P., M.S., M.M., Drh)

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN

Menyetujui
Panitia Penguji,

Prof. Dr. Ir. Hj. Kusrinigrum, R.S., M.S.

Ketua

Widya Paramita L., M.P., Drh

Sekretaris

Suryanie Sarudji., M.Kes., Drh

Anggota

Mirni Lamid, M.P., Drh

Drh

Anggota

Soepartono P., M.S., M.M.,

Anggota

Surabaya, 11 Pebruari 2005

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,

Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh

Nip. 130 687 297

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI SELULOLITIK AEROB
DARI LIMBAH CAIRAN RUMEN SAPI
SEBAGAI BAHAN INOKULUM
PADA JERAMI PADI**

TRI PRASETYO NUGROHO

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri selulolitik dari limbah cairan rumen sapi dengan menggunakan media *Carboxil Methyl Cellulosa* (CMC).

Pengambilan sampel dilaksanakan 3 kali dengan menampung limbah cairan rumen kemudian dimasukkan ke dalam botol. Dilakukan pengenceran 10^{-2} kemudian diambil 1 ml dan diinokulasikan ke cawan petri yang berisi media CMC dengan metode *pour plate*. Inkubasi dilaksanakan selama 3 hari, koloni yang mampu tumbuh dipindahkan pada media pembenihan murni yang baru dengan metode gores sampai diperoleh isolat murni.

Identifikasi dilakukan secara makroskopis, mikroskopis yang dilanjutkan dengan uji biokimia yang meliputi uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), Manitol, Sitrat, Urea dan uji Gula-gula (Glukosa, Laktosa, Dextrosa, Sukrosa, Sakarosa dan Maltosa).

Dari hasil penelitian diperoleh 6 jenis bakteri selulolitik yaitu *Acidothermus cellulolyticus*, *Bacillus sphaericus*, *Cellulomonas cellulans*, *Cellvibrio mixtus*, *Cytophaga hutchinsonii* dan *Lactobacillus acidophilus*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Segala pujian, hormat dan kemuliaan hanya bagi Allah di tempat maha tinggi, oleh karena kasih setia dan anugerahNya yang telah memberikan kekuatan, kemampuan dan penyertaan kepada penulis untuk menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul Isolasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik Aerob dari Limbah Cairan Rumen Sapi Sebagai Bahan Inokulum Pada Jerami Padi dengan baik.

Dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang telah mengizinkan dan memberikan fasilitas selama penulis menempuh studi.
2. Ibu Mirni Lamid, MP., drh selaku Pembimbing I, dan Bapak Soepartono Partosoewignjo, MS, MM, drh, atas segala bantuan, saran, bimbingan dan pengarahannya.
3. Ibu Sri Chusniati, Mkes., drh dan Drs Agus Supriyanto, yang telah membimbing selama pelaksanaan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
4. Pegawai Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya, yang telah mengizinkan untuk pengambilan sampel.

5. Bapak, Ibu untuk curahan kasih sayang, doa dan segala hal yang penulis butuhkan selama ini, serta kepada kakak Erwin dan Yayuk yang telah memberikan dukungan selama penulisan skripsi.
6. Daruli, Noris, Doni, Hanza, Izza, Lilis dan Oki yang telah bersama selama penelitian, tidak lupa teman-teman angkatan 2000 yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu serta teman MENWA terima kasih atas bantuan dan doanya.

Dan kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, namun telah memberikan bantuan moral dan materi, secara langsung maupun tidak langsung.

Disadari sepenuhnya bahwa laporan penelitian ini jauh lebih dari sempurna. Oleh karena itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran demi perbaikan dan sempurnanya skripsi ini.

Harapan penulis, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membaca.

Surabaya, Pebruari 2005

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
UCAPAN TERIMAKASIH.....	iv
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Landasan Teori	3
1.4. Tujuan Penelitian	5
1.5. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Mikroba Rumen	6
2.2. Selulosa.....	7
2.3. Enzim Selulase.....	8
2.4. Rumen Sapi.....	9
2.5. Pembenihan Bakteri Selulolitik	10
2.6. Optical Density	11

	2.7. Jerami Padi.....	11
BAB III	MATERI DAN METODE.....	12
	3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	12
	3.2. Bahan Penelitian	12
	3.3. Alat Penelitian.....	12
	3.4. Prosedur Penelitian	13
	3.4.1. Pengambilan Sampel	13
	3.4.2. Cara Isolasi	13
	3.4.3. Tahap Identifikasi.....	14
	3.4.3.1. Uji Morfologis	14
	3.4.3.2. Uji Motilitas.....	14
	3.4.3.3. Uji Biokimia	14
	3.4.4. Pembuatan Bahan Inokulum	16
BAB IV	HASIL PENELITIAN	18
BAB V	PEMBAHASAN.....	21
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	28
	RINGKASAN	29
	DAFTAR PUSTAKA	31
	LAMPIRAN	33

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Bakteri Rumen yang Berhubungan dengan Selulosa.....	6
4.1. Hasil Uji Biokimia dari Isolat Bakteri Selulolitik.....	19
4.2. Hasil Isolat Bakteri Selulolitik dari Cairan Rumen Beserta Sifat Gramnya...	20
4.3. Hasil Isolat Bakteri Selulolitik dari Cairan Rumen Beserta <i>Optical Density</i> Selama Tiga Hari Pertama	20

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Media Isolasi Bakteri Selulolitik.....	34
2. Media Uji Biokimia	36
3. Diagram Pemecahan Selulosa.....	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Foto Mikroskopis Isolat Bakteri Selulolitik dari Limbah Cairan Rumen Sapi, Pembesaran 1000x	21

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Tidak semua bakteri sebagai penyebab penyakit. Dalam keadaan tertentu beberapa spesies bakteri merupakan bagian penting dalam kehidupan manusia, baik secara langsung maupun tidak langsung. Bakteri ada yang mempunyai peran dalam memecahkan masalah lingkungan. Diantara bakteri tersebut mempunyai fungsi penting untuk mengurai sampah organik dan organisme yang telah mati (Campbell,1994).

Jerami merupakan limbah organik hasil dari pertanian padi. Jerami masih dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak, media pertumbuhan jamur merang, dan dapat dikembalikan ke tanah sebagai pupuk dengan cara dibakar. Jerami memiliki kandungan lignin, selulosa dan hemiselulosa yang sukar untuk dicerna tanpa bantuan enzim sellulase.

Di dalam rumen hewan ruminansia terdapat bakteri dan fungi yang mampu memecah lignohemiselulosa, sehingga jerami dapat diberikan kepada ternak ruminansia. Rumen merupakan lingkungan yang sesuai untuk sejumlah mikroorganisme. Jumlah bakteri di rumen bervariasi tergantung pakan yang diberikan, waktu pengambilan sampel setelah pemberian pakan, spesies hewan, individu, musim dan ketersediaan hijauan pakan (Arthur, 1987). Di dalam rumen terdapat sekitar $10^{10} - 10^{12}$ bakteri pada tiap gram isi rumen (Ogimoto,1981).

Selulosa merupakan penyusun dinding sel tanaman, jumlahnya berlimpah pada tanaman, umumnya memiliki daya cerna yang rendah dibanding bahan nutrisi lain. Hewan ruminansia seperti sapi dan domba tidak memiliki kemampuan mendegradasi selulosa. Selulosa dapat dihidrolisis dengan proses tertentu menjadi glukosa (Campbell, 1994).

Daya cerna jerami padi dapat ditingkatkan dengan perlakuan khusus diantaranya dengan perlakuan biologis. Glass (1991) menjelaskan bahwa penanganan limbah secara biologi adalah penanganan limbah dengan bantuan mikroba baik aerob maupun anaerob. Penanganan limbah dengan metode ini bertumpu pada kemampuan metabolisme mikroba untuk memanfaatkan senyawa kimia sebagai sumber karbon dan energi dengan bantuan katalisator biologis yang disebut enzim.

Salah satu golongan bakteri yang hidup di rumen adalah bakteri selulolitik yang memiliki kemampuan mendegradasi selulosa pada tanaman dengan menghasilkan enzim selulase (Churh, 1993). Bakteri rumen yang terdapat pada cairan rumen di Rumah Potong Hewan (RPH) terbuang percuma karena tidak dimanfaatkan dan dapat mencemari lingkungan.

Isolat bakteri selulolitik mempunyai aktivitas spesifik, sehingga mempunyai fungsi komersial tertentu seperti pengolahan limbah jerami dan pembuatan kertas koran (Singleton, 2001). *Carboxil Methyl Cellulosa* (CMC) di dalamnya terdapat 5-6 atau lebih gugus glukosa yang berikatan (Aklyosov, 2004)

Berdasarkan hal di atas peneliti ingin mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri rumen yang mampu mencerna selulosa dengan tujuan membuktikan

bahwa mikroba selulolitik masih mampu mendegradasikan selulosa diluar lingkungan alaminya.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, dapat diajukan rumusan masalah sebagai berikut :

Apakah bakteri selulolitik aerob dari cairan limbah rumen sapi dapat diisolasi dengan menggunakan media *Carboxil Methil Cellulosa* (CMC)?

1.3. Landasan Teori

Selulose sebagai komponen bahan organik yang melimpah di muka bumi berbentuk seperti benang merupakan penyusun dinding sel tanaman. Selulosa adalah komponen terbesar pada tanaman. Selulosa merupakan polimer dari glukosa yang tergabung bersama dengan ikatan tanpa cabang dengan ikatan hidrogen. Kebanyakan hewan tidak dapat mencerna selulosa karena tidak terdapat enzim selulase dalam saluran pencernaannya. Sapi mampu menjadikan selulosa sebagai sumber nutrisi karena di dalam rumennya mengandung bakteri selulolitik yang menghasilkan enzim selulase untuk menghidrolisis selulosa (Campbell, 1994).

Solomon *et al.* (1996) menjelaskan bahwa selulosa adalah polisakarida insolubel yang tersusun dari kumpulan glukosa yang bergabung bersama. Selulosa terdiri atas monomer β -glukosa yang menyatu dengan ikatan β 1-4 glukosida. Manusia dan kebanyakan organisme tidak mempunyai enzim yang

mampu mencerna selulosa, tetapi selulosa merupakan komponen penting sebagai makanan berserat yang berfungsi melancarkan proses pencernaan manusia. Beberapa bakteri menghasilkan enzim selulase yang mampu memecah selulosa menjadi glukosa seperti bakteri yang hidup di saluran pencernaan sapi dan kambing. Sapi dan kambing mampu memanfaatkan rumput sebagai sumber nutrisi dari hasil pemecahan selulosa oleh enzim selulase yang dihasilkan mikroba selulolitik.

Sapi mempunyai lambung yang terbagi menjadi empat bagian dan merupakan sistem untuk mencerna selulosa. Ketika sapi memakan rumput, pakan ditampung di rumen. Bakteri rumen bekerja untuk memecah selulosa, sedang sapi membantu melumatkan serat menjadi lebih halus dengan melakukan regurgitasi secara periodik. Serat yang telah halus memudahkan bakteri untuk menghidrolisis selulosa (Campbell, 1994).

Menurut Church (1993), bakteri yang terdapat di dalam rumen berjumlah sekitar 10^{10} sampai 10^{11} sel tiap gram isi rumen. Terdapat 22 genus dan 63 spesies bakteri di dalam rumen, tetapi hanya 16 genus dan 28 spesies yang diyakini berperan secara signifikan dalam proses metabolisme. Terdapat delapan pengelompokan bakteri rumen berdasarkan substrat yang dipecah dan proses fermentasinya, salah satunya adalah bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik dikelompokkan berdasarkan kemampuan mendegradasikan selulosa.

Keeton (1986), juga menjelaskan bahwa dalam saluran hewan ruminansia seperti sapi terdapat mikroorganisme, terutama pada rumen yang merupakan bagian lambung yang terbesar. Pakan yang masuk di dalam rumen akan

difermentasi. Pemecahan bahan makanan tidak hanya terjadi pada protein, polisakarida, lemak tetapi juga pada selulosa. Hasil fermentasi disalurkan sampai abomasum dan usus yang akhirnya diserap oleh usus. Dengan pencernaan oleh bakteri, sapi dapat memperoleh nutrisi.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

- (a) Mengisolasi bakteri selulolitik aerob dari limbah cairan rumen sapi.
- (b) Mengidentifikasi isolat-isolat bakteri selulolitik aerob yang diperoleh dari sampel limbah cairan rumen sapi.

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang bakteri selulolitik dari limbah cairan rumen sapi yang dapat dimanfaatkan sebagai probiotik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Mikroba Rumen

Rumen merupakan lingkungan yang sangat baik untuk pertumbuhan mikroba yang terdiri dari bakteri, protozoa dan fungi. Mayoritas bakteri gram negatif ditemukan pada ternak yang diberi makan hijauan, sedang pemberian biji-bijian akan meningkatkan jumlah bakteri gram positif. Diantara bakteri rumen, bakteri selulolitik dan ureolitik sangatlah penting karena kemampuan mereka untuk mencerna selulosa dan menghidrolisis urea (Rahmachandran, 2003).

Tabel 1. Bakteri Rumen yang Berhubungan dengan Selulosa (Rahmachandran, 2003).

No	Spesies	Morfologi	Gram	Substrat	Hasil akhir
1.	<i>Ruminococcus albus</i>	Coccus	Positif	Selulosa/hemiselulosa	F/A/S
2.	<i>R. flavecciens</i>	Coccus	Positif	Selulosa	F/A/S
3.	<i>B. succinogenes</i>	Coccus-rods	Negatif	Selulosa	F/A/S
4.	<i>B. ruminicola</i>	Cocoid-rods	Negatif	Hemiselulosa/urea/protein/pectin	F/A/S
5.	<i>B. ruminibacter</i>	Bacillus	Negatif	Hemiselulosa/protein/starch	F/A/S

F=format; A=Asetat; S=Suksinat

Bakteri selulolitik adalah kelompok jasad renik yang memiliki kemampuan mendegradasikan selulosa menjadi senyawa dengan berat molekul yang lebih kecil seperti selobiosa dan glukosa (Thayer, 1978).

Bahan pakan yang memasuki lambung sapi akan bercampur dengan mikroba rumen selama lebih kurang sembilan jam. Bakteri selulolitik yang terdapat di dalam rumen akan menghidrolisis selulosa menjadi selobiosa dan

glukosa. Kedua gula tersebut merupakan bahan baku untuk proses fermentasi yang kemudian menghasilkan asam organik yang berupa asetat, propionat, dan butirat serta gas CO₂ dan CH₄ (Anggorodi, 1990).

2.2. Selulosa

Selulosa merupakan penyusun dinding sel tanaman, dan juga merupakan penyusun terbanyak di dalam tanaman. Tanaman menggunakan sebagian karbohidrat yang terbentuk dari fiksasi CO₂ untuk membuat bahan organik kompleks seperti selulosa, yang merupakan polimer dari glukosa yang tidak larut air. Tanaman secara normal mengandung selulosa sebanyak 40-50%, komponen penyusun lainnya adalah lignin (20-30%) dan hemiselulosa (10-30%). Ketika tumbuhan mati secara alami selulosa, hemiselulosa dan lignin akan didegradasi oleh mikroorganisme tanah (Pelczar, 1993).

Selulosa adalah polimer dari glukosa, dengan rumus bangun molekulnya tidak bercabang dan dihubungkan oleh ikatan 1,4 β-glukosida. Panjang gugus glukosa pada polimer selulosa adalah bervariasi antara 2.000-10.000 unit (Fessenden, 1978), bahkan ada yang sampai 14.000 unit glukosa (Thayer, 1978).

Titik pusat pendegradasian selulosa terletak pada pecahnya ikatan 1,4 β-glukosida. Pecahnya ikatan 1,4 β-glukosida menyebabkan selulosa terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana, yaitu oligosakarida (terutama selobiosa). Selanjutnya oligosakarida akan terhidrolisis menjadi monosakarida (terutama glukosa). Pemecahan ikatan 1,4 β-glukosida dilakukan oleh kompleks enzim selulase (Bondi, 1987).

2.3. Enzim Selulase

Enzim adalah substansi yang paling banyak terdapat dalam sel hidup, dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia yang secara kolektif membentuk metabolisme perantara dari sel. Berdasarkan letak enzim yang dihasilkan oleh mikroba dapat dibedakan dua macam enzim, yaitu enzim ekstraseluler dan intraseluler. Enzim intraseluler adalah enzim yang terletak di dalam sel, setelah biakan sel diperoleh maka dilakukan pemecahan sel untuk mengeluarkan enzim. Untuk mengekstraksi enzim, kultur mikroba disentrifus, dan supernatannya merupakan ekstrak kasar enzim. Enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang terletak di luar sel, enzim ini selama proses biosintesis menembus membran dan keluar dari sel mikroba. Untuk mendapatkan enzim ini tidak perlu diadakan pemecahan membran sel (Lehmniger, 1983).

Selulase termasuk enzim hidrolisa yang menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Enzim selulase dihasilkan oleh mikroorganisme, tanaman dan binatang. Tiga tipe enzim selulase adalah endoglucanase (endo-1,4- β -D-gluconase, atau 1,4- β -D-glucan 4-gluconohydrolase), eksoglucanase (exo-1,4- β -D-gluconase, atau 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase) dan cellobiase (β -glucosidase atau β -D-glucoside glucohidrolase) (Singleton, 2001).

Enzim selulase dapat diisolasi dari berbagai sumber, dengan perbedaan karakteristik berat molekul, komposisi asam amino beserta urutannya, kapasitas untuk menyerap selulosa dan kemampuan untuk mendegradasikan substrat tertentu. Beberapa enzim selulase yang berasal dari bakteri mempunyai kemampuan yang lebih untuk mendegradasikan selulosa secara *in vivo* dibandingkan dengan enzim selulosa yang berasal dari fungi (Aklyosov, 2004).

2..4. Rumen Sapi

Lambung sapi terpisah menjadi empat bagian, dengan perkembangan sistem kontraksi pada tiap-tiap bagian sehingga memungkinkan sirkulasi isi lambung ke dalam rumen, untuk selanjutnya mengalirkan ke dalam retikulum, omasum dan abomasum.

Rumen merupakan lingkungan yang cocok untuk sejumlah mikroorganisme. Jumlah bakteri di rumen 25 sampai 80 milyar pada setiap mili liternya, dan protozoa mencapai 200.000 sampai 500.000 tiap mili liternya, jumlah bakteri bervariasi tergantung pakan yang terdapat dalam rumen, waktu pengambilan sampel setelah pemberian pakan, spesies yang berbeda, individu yang berbeda, musim serta ketersediaan hijauan pakan. Di dalam rumen terdapat bakteri anaerobik dan bakteri fakultatif anaerobik serta aerobik (Ogimoto, 1981). Bakteri rumen diantaranya adalah bakteri selulolitik yang memiliki kemampuan mendegradasi selulosa pada tanaman dengan menghasilkan enzim selulase.

Bakteri selulolitik rumen mempunyai dua fungsi penting, mikroorganisme rumen memungkinkan ruminan untuk mencerna serat kasar dan mikroorganisme rumen mendegradasi selulosa menjadi asam organik, asam asetat, propionat dan asam butirat atau disebut *volatile fatty acids* (VFA). Pencernaan oleh mikroba merupakan hal yang sangat penting dalam penyediaan nutrisi ruminan. Terjadi simbiosis antara mikroba rumen dengan hewan ruminansia, rumen merupakan tempat tinggal bagi mikroorganisme untuk mensintesis semua vitamin B-Complek dan semua asam amino bagi hewan yang rumennya ditinggali mikroorganisme. Sedangkan mikroorganisme yang tinggal di dalam rumen memberikan nutrisi

bagi hewan tersebut sebagai imbalan atas penyediaan bahan makanan bagi mikroba (Singleton,2001).

2.5. Pembenuhan Mikroba Selulolitik

Menurut Colwell (1972) banyak jenis media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri selulolitik secara aerobik. Beberapa diantaranya adalah media Hutchinson, media Winogradsky, Media Mc Beth, dan media Dubos. Pada media tersebut selalu ditambahkan CMC.

Kondisi yang baik bagi pertumbuhan bakteri selulolitik tidak hanya bergantung pada komposisi media tersebut, tetapi kondisi pengudaraan (aerasi) juga sangat menentukan. Menurut Imshenetskii (1953) yang dikutip oleh Colwell (1972), menyarankan suatu metode untuk memperoleh kondisi pertumbuhan yang ideal, yaitu menuangkan media dalam erlenmeyer atau tabung reaksi dalam lapisan tipis saja (tidak lebih dari 1-2 cm) dan kemudian menginkubasikan di atas alat pengocok (*shaking incubator*).

Faktor pH medium pertumbuhan menentukan jenis mikroba selulolitik yang dominan. Pada medium dengan pH 6,5-7,0 populasi mikroba yang mendominasi adalah *vibrio* dan jamur. Pada medium agak asam pH 5,7-6,2 mikroba yang dominan adalah *vibrio* dan *Cytophaga*. Pada medium asam dengan pH 5,5 didominasi oleh jamur berfilamen. Pada medium sedikit basa dengan pH 7,1-7,6 merupakan pH optimum untuk bakteri *vibrio*. sedangkan *Cytophaga* membutuhkan medium dengan pH basa dalam proses degradasi selulosa (Alexander, 1976).

2.6 Optical Density

Optical Density merupakan ukuran jumlah penyerapan (*Absorben*) cahaya dari larutan molekul organik yang diukur oleh Kolorometer atau spektrofotometer. Nilai penyerapan cahaya tersebut digunakan untuk mengukur konsentrasi molekul dalam larutan (Anonimus, 2003).

2.7. Jerami Padi

Menurut Soejono (1995) jerami padi adalah bagian batang tanaman padi setelah di potong dan dirontokkan bulir-bulir buah padi, bersama atau tidak dengan tangkainya dikurangi dengan akar dan bagian batang yang tertinggal setelah disabit. Klasifikasi tanaman padi menurut Reksohadiprodjo (1981) adalah filum *Sphermatophyta*, klass *Monocotyledoneae*, ordo *Glumiflora*, famili *Gramineae*, genus *Oryza*, spesies *Oryza sativa*.

Menurut Soejono (1995) jerami padi tergolong pakan ternak berkualitas rendah karena telah mengalami lignifikasi, sehingga kandungan karbohidrat yang mudah larut menurun, sedangkan selulosa dan hemiselulosa sebagian besar telah berikatan dengan lignin membentuk lignoselulosa dan lignohemiselulosa. Kualitas dan komposisi kimia jerami padi sangat bervariasi karena dipengaruhi oleh faktor lingkungan, varietas dan penyimpanan . Doyle *et al.* (1986) menyebutkan bahwa jerami padi tersusun atas 4,1% protein kasar dan 86% dinding sel. Komar (1984) menyebutkan dinding sel jerami padi tersusun atas 43,7% selulosa, 27,2% hemiselulosa, 9,8% lignin dan 13% silika.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi, jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya. Mulai bulan Juni 2004 sampai Oktober 2004.

3.2 Bahan Penelitian

Sampel yang digunakan untuk isolasi bakteri selulolitik aerob adalah limbah cairan rumen dari Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya.

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Carboxil Methyl Cellulosa* (CMC) Agar, CMC cair, *Czapex Modification* (ditambah dengan Malt Extract) dan *Sulfit Indole Motility* (SIM), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), Sitrat, Manitol, Lactosa, Glukosa, Dextrosa, Sukrosa, Sakarosa, Maltosa dan Urea.

3.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah Petridish, Erlenmeyer, tabung reaksi, *Water Bath*, *Ultra Sentrifuge*, timbangan analitik, *shaking incubator*, Fotomikroskop Olympus, *Spektrofotometer*, Indikator pH, Inkubator, Autoklav.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel

Limbah cairan rumen adalah cairan yang berasal dari rumen sapi yang telah disembelih yang masih bercampur dengan pakan yang masih belum tercerna sempurna. Pengambilan sampel dilaksanakan sebanyak 3 kali ulangan secara acak. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara memeras isi rumen untuk dimasukkan ke dalam botol sebanyak kurang lebih 500 ml, kemudian dimasukkan ke dalam termos agar terhindar dari kontaminasi untuk isolasi bakteri selulolitik aerob.

3.4.2 Cara Isolasi

Sampel limbah cairan rumen dibuat pengenceran 10^{-2} dengan cara 1 ml sampel diencerkan dengan 99 ml aquadest steril. Pengenceran 10^{-2} dilakukan untuk mengurangi kepadatan koloni yang tumbuh pada media isolasi untuk memudahkan proses isolasi. Hasil pengenceran 10^{-2} diambil 1 ml untuk diinokulasikan kedalam media CMC agar yang bersuhu kurang lebih 45°C sebanyak kurang lebih 15 ml dengan metode tuang (*pour plate*). Pencampuran dilaksanakan dengan memutar cawan petri. Setelah dingin cawan petri diinkubasikan pada suhu ruang selama 3 hari.

Bakteri yang tumbuh dimurnikan dengan membuat *streak* pada media *Czapex Modification*. Koloni yang telah murni dipindahkan kedalam media biakan miring. Tiap jenis isolat diidentifikasi melalui uji morfologis, uji motilitas dan uji biokimia.

3.4.3 Tahap identifikasi

3.4.3.1 Uji Morfologis

Uji morfologis secara makroskopis dengan melihat bentuk dan warna koloni yang dihasilkan sedang untuk uji morfologis secara mikroskopis dilakukan dengan menggunakan pengecatan Gram. Diambil sedikit bakteri dari setiap jenis koloni dari media isolasi. Dibuat preparat ulas dan dibiarkan kering. Difiksasi dengan cara dilewatkan di atas nyala api lampu spiritus beberapa kali. Ditetesi dengan *Gention Violet* setelah dua menit zat warna dibuang, kemudian ditetesi dengan larutan *Jodium Lugol* dan dibiarkan satu menit dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian ditetesi dengan *Alkohol Aceton* sedikit demi sedikit sampai larutan yang mengalir tidak berwarna, dan dibiarkan kering. Ditetesi dengan *Safranin* dan dibiarkan selama 30 detik. Dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan kering. Diamati dengan menggunakan minyak emersi di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 100. Sel yang telah terwarnai bersifat gram positif jika sel berwarna biru gelap atau ungu dan bersifat gram negatif bila sel berwarna merah muda (Iman dkk, 2004).

3.4.3.2 Uji Motilitas

Dengan *ose needle* dari setiap jenis koloni dalam media isolasi diinokulasikan dengan cara tusukan ke dalam media SIM. Diinkubasikan pada suhu 25° C – 30° C selama 24 – 48 jam. Uji dikatakan positif jika ada pertumbuhan yang menyebar dari garis inokulasi, yang berarti ada motilitas.

3.4.3.3 Uji Biokimia

a. Uji Gula - Gula

Uji gula-gula meliputi uji glukosa, uji lactosa, uji dextrosa, uji sukrosa, uji sakarosa dan uji maltosa. Prosedur pelaksanaan uji gula-gula adalah dengan mengambil sedikit bakteri dari media biakan isolasi untuk diinokulasikan ke dalam media uji gula-gula, diinkubasikan pada suhu $25^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Uji dikatakan positif jika terjadi perubahan warna pada media uji. Iman dkk. (2004) menjelaskan bahwa uji gula-gula dilaksanakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menfermentasi karbohidrat

b. Uji Urea

Satu ose dari media biakan isolasi diinokulasikan ke dalam glukosa Broth. Diinkubasikan pada suhu $25^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Uji dikatakan negatif jika tidak ada perubahan warna dan uji dikatakan positif jika terjadi perubahan warna terhadap pada media uji. Iman dkk. (2004) menjelaskan bahwa uji urea dilaksanakan untuk mengetahui adanya enzim urease yang dihasilkan bakteri.

c. Uji Sitrat

Satu ose needle dari media biakan isolasi ditusukkan ke dalam Sitrat agar. Diinkubasikan pada suhu $25^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Uji dikatakan positif jika terjadi perubahan warna pada media uji. Iman dkk. (2004) menjelaskan bahwa uji sitrat dilaksanakan untuk mengetahui kemampuan kuman dalam memanfaatkan natrium sitrat sebagai sumber karbon untuk keperluan hidup bakteri.

d. Uji Manitol

Satu ose needle dari media biakan isolasi ditusukkan ke dalam Manitol agar. Diinkubasikan pada suhu 25° C – 30° C selama 24 jam. Uji dikatakan positif jika terjadi perubahan warna pada media uji.

e. Uji SIM

Satu ose needle dari media biakan isolasi ditusukkan ke dalam SIM agar. Diinkubasikan pada suhu 25° C – 30° C selama 24 jam. Uji dikatakan positif jika terjadi kekeruhan pada tempat sekitar tusukan. Pada uji Indol Akan terbentuk cincin merah setelah ditetesi reagen *Covac*. Iman dkk. (2004) menjelaskan bahwa uji SIM dilaksanakan untuk mengetahui terbentuknya sulfide, indol dan mengetahui pergerakan kuman.

f. Uji TSIA

Satu ose jarum dari media biakan isolasi ditusukkan ke dalam TSIA agar. Diinkubasikan pada suhu 25° C – 30° C selama 24 jam. Uji dikatakan positif jika terjadi perubahan warna pada tempat sekitar tusukan. H₂S dikatakan positif jika terbentuk warna hitam, media yang pecah menunjukkan terbentuknya gas. Iman dkk. (2004) menjelaskan bahwa uji TSIA dilaksanakan untuk membedakan sifat kuman secara biokimia.

3.4.4. Pembuatan Bahan Inokulum

Dari stok bakteri pada media miring ditambah aquadest steril 5 ml, divortex selama 1 menit untuk membuat suspensi bakteri dari media miring tabung untuk selanjutnya dituang pada 45 ml media cair *Czapek Modification*.

Inkubasi suhu kamar pada *shacker* selama 2 hari. 50 ml suspensi bakteri pada media cair *Czapek Modification* dimasukkan kedalam 450 ml media cair CMC yang telah ditambah Malt Ekstrak. Inkubasi dengan suhu kamar pada *sacker* selama 2 hari. Suspensi siap diinokulasikan pada jerami padi.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Tabel 4.1. Hasil Uji Biokimia Dari Isolat Bakteri Selulolitik.

Uji fisiologis	<i>Acidothermus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellvibrio</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Lactobacillus</i>
TSIA						
Slant	Alkali	alkali	Alkali	Alkali	Alkali	Alkali
Deep	Alkali	alkali	Alkali	alkali	Alkali	Alkali
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Gas	-	-	-	-	-	-
SIM						
Indole	-	-	-	-	-	+
Motilitas	-	+	+	+	+	-
Sitrat	+	-	+	-	+	-
Manitol	-	-	-	-	-	-
Lactosa	+	-	+	+	-	-
Glukosa	+	-	+	+	+	-
Dextrosa	+	-	+	-	-	+
Sukrosa	+	-	+	+	-	-
Sakarosa	+	-	+	-	-	-
Maltosa	+	-	+	+	-	+
Urea	-	-	-	-	-	-

Hasil isolasi bakteri selulolitik dari cairan rumen sapi diperoleh enam macam spesies bakteri selulolitik aerob. Enam macam bakteri yang didapatkan

adalah *Acidothermus*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Cytophaga*, dan *Lactobacillus*.

Tabel 4.2. Hasil Isolat Bakteri Selulolitik dari Cairan Rumen Beserta Sifat Gramnya.

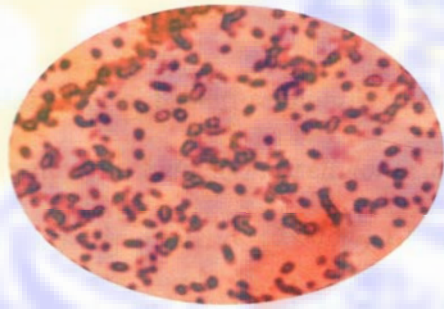
No.	Genus bakteri	Spesies bakteri	Sifat gram
1.	<i>Acidothermus</i>	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	Gram negatif
2.	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>	Gram positif
3.	<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas cellulans</i>	Gram positif
4.	<i>Cellvibrio</i>	<i>Cellvibrio mixtus</i>	Gram negatif
5.	<i>Cytophaga</i>	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	Gram negatif
6.	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Gram positif

Pertumbuhan bakteri pada media CMC cair dapat ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi keruh setelah penanaman bakteri dan diinkubasi selama dua hari. Kekeruhan yang terjadi dapat diukur dengan melihat *Optical Density* untuk melihat jumlah penyerapan cahaya dari suspensi bakteri pada media.

Tabel 4.3. Hasil Isolat Bakteri Selulolitik dari Cairan Rumen Beserta *Optical Density* Selama Tiga Hari Pertama.

BAKTERI	NILAI OPTICAL DENSITY (ABSORBEN)		
	HARI KE-1	HARI KE-2	HARI KE-3
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	0,2	1,1	1
<i>Bacillus sphaericus</i>	0,2	0,9	0,8
<i>Cellulomonas cellulans</i>	0,1	0,9	0,9
<i>Cellvibrio mixtus</i>	0,1	1	0,9
<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	0,1	1	1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,1	0,9	0,9

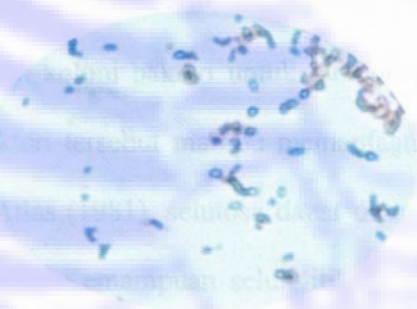
Gambar 4.1. Foto Mikroskopis Isolat Bakteri Selulolitik dari Limbah Cairan Rumen Sapi, Pembesaran 1000X.



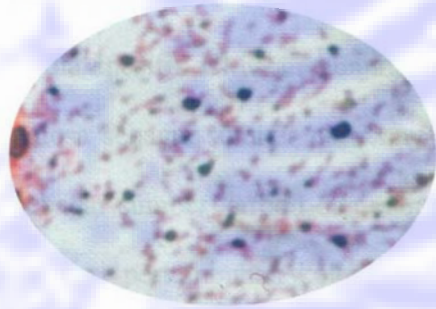
Acidothermus cellulolyticus



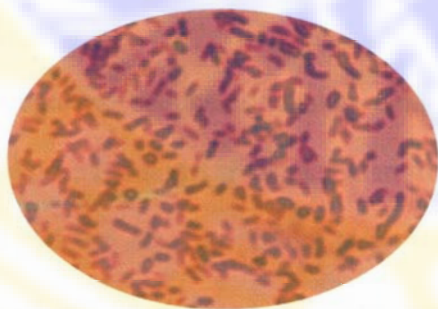
Bacillus sphaericus



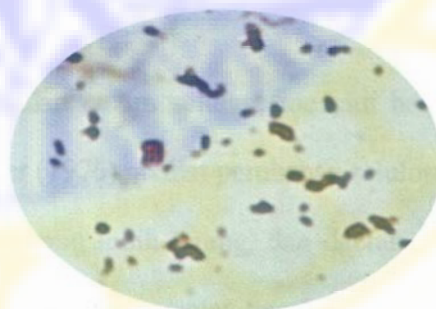
Cellulomonas cellulans



Celvibrio mixtus



Cytophaga hutchinsonii



Lactobacillus acidophilus

BAB V

PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri selulolitik aerob dari cairan rumen sapi diperoleh enam bakteri yaitu *Acidothermuscelluloliticus*, *Bacillus sphaericus*, *Cellulomonas cellulans*, *Cellvibrio mixtus*, *Cytophaga hutchinsonii* dan *Lactobacillus acidophilus*. Keenam bakteri yang diperoleh menunjukkan sifat positif dalam uji kemampuan selulolitik, sehingga dapat diduga keenam isolat tersebut mampu mengekskresikan enzim selulase yang mampu memecah ikatan 1,4 β -glukosida dalam media uji. Kemampuan koloni bakteri untuk tumbuh pada media spesifik CMC menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu memanfaatkan selulosa sebagai sumber nutriennya. Menurut Atlas (1981), selulosa dapat digunakan sebagai sumber karbon dan energi bagi bakteri. Kemampuan selulolitik dapat dilihat dari pertumbuhan koloni pada media CMC padat dan mampu tumbuh pada media CMC cair. Pertumbuhan bakteri selulolitik pada media CMC cair dapat dilihat dari perubahan warna media yang menjadi keruh.

Degradasi selulosa dilakukan dengan bantuan enzim selulase dengan hasil akhir glukosa. Berdasarkan pengamatan Alexander (1976), akibat perubahan selulosa menjadi glukosa, disekitar koloni tampak daerah yang lebih terang, dan daerah ini disebut sebagai zona terang (*Cleared zone*). Kemampuan isolat tersebut tumbuh pada media selulosa membuktikan bahwa isolat tersebut mampu memanfaatkan selulosa sebagai salah satu sumber nutriennya.

Masing-masing jenis bakteri selulolitik mempunyai kemampuan tersendiri dalam mendegradasi selulosa. Bakteri genus *Cytophaga* menduduki peringkat paling utama dalam mendegradasi selulosa (Alexander, 1977 ; Campbell, 1985).

Bakteri selulolitik merupakan bakteri heterotrop yang termasuk golongan saprofit. Bakteri saprofit adalah bakteri yang dapat memanfaatkan sisa-sisa tumbuhan yang telah mati untuk memenuhi kebutuhan sel. Bakteri saprofit memerlukan gula (karbohidrat) dalam jumlah tertentu, nitrogen organik, fosfor dan garam-garam mineral sebagai sumber energi, beberapa asam amino, vitamin, sterol untuk memenuhi kebutuhan sel (Campbell, 1985).

Pertumbuhan bakteri selulolitik dalam media CMC melalui fase-fase tertentu. Pada fase eksponensial terjadi pertumbuhan sel maksimal. Dimana nutrisi masih dapat mendukung pertumbuhan bakteri sampai fase stasioner. Jumlah bakteri tetap karena nutrisi berkurang sebagian bakteri akan mati dan sebagian akan tetap berkembang biak.

Uji morfologis yang dilakukan untuk identifikasi meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis untuk melihat bentuk, warna dan ukuran koloni. Pemeriksaan mikroskopis dilaksanakan untuk melihat serta mempelajari bentuk morfologi serta sifat Gram bakteri Uji dengan media SIM digunakan untuk melihat terbentuknya H₂S dan indol serta digunakan melihat motilitas kuman. Uji biokimia yang dilaksanakan meliputi uji gula-gula, urea, sitrat, manitol dan TSIA. Uji gula-gula dilaksanakan untuk mengetahui kemampuan fermentasi bakteri terhadap gula-gula, reaksi positif apabila media uji berubah warna dari merah menjadi kuning. Sedangkan reaksi negatif tidak terjadi

perubahan warna pada media uji. Uji urea menunjukkan hasil positif jika bakteri menghasilkan enzim urease ditunjukkan dengan perubahan warna medium menjadi ungu. Uji sitrat positif apabila bakteri memanfaatkan natrium sitrat sebagai sumber karbon, ditandai dengan perubahan warna media uji dari hijau menjadi biru. TSIA *acid butt* atau *acid deep* ditunjukkan dengan terbentuk warna kuning pada bagian bawah media, *acid slant* ditandai dengan terbentuknya warna kuning pada bagian atas atau bagian miring dari media uji. Gas positif apabila terbentuk gas pada tempat tusukan dan H₂S positif apabila terjadi perubahan warna media menjadi hitam (Iman dkk., 2004).

Tabel 5.1. Hasil Pengamatan Isolat Bakteri Selulolitik Aerob dari Limbah Cairan Rumen Sapi.

Sifat-sifat yang Teramati	Sifat berdasarkan Holt <i>et al.</i> (1994)
<i>Acidothermus celluloliticus</i>	<i>Acidothermus celluloliticus</i>
Bentuk koloni : Sirkuler	Bentuk koloni : Sirkuler
Ukuran koloni : 1-3 cm	Ukuran koloni : 1-3 cm
Warna koloni : Putih	Warna koloni : Putih
Bentuk sel : Bulat	Bentuk sel : Bulat
Sifat Gram : Negatif	Sifat Gram : Negatif
Uji gula-gula Positif : : laktosa, glukosa, dextrosa, sukrosa, sakarosa, maltosa	Uji gula-gula Positif : : glukosa, sukrosa, maltosa
<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>
Bentuk koloni : bundar	Bentuk koloni : bundar
Ukuran koloni : 1 cm	Ukuran koloni : 1 cm
Warna koloni : Putih	Warna koloni : Putih
Bentuk sel : batang	Bentuk sel : batang
Sifat Gram : positif	Sifat Gram : positif
Uji gula-gula Positif : Negatif pada semua uji	Uji gula-gula Positif : -

Sifat-sifat yang Teramati	Sifat berdasarkan Holt <i>et al.</i> (1994)
<p><i>Cellulomonas cellulans</i></p> <p>Bentuk koloni : bundar Ukuran koloni : 1 cm Warna koloni : kuning Bentuk sel : coccus Sifat Gram : positif Uji gula-gula Positif : laktosa, glukosa, dextrosa, sukrosa, sakarosa, maltosa</p>	<p><i>Cellulomonas cellulans</i></p> <p>Bentuk koloni : - Ukuran koloni : - Warna koloni : kuning Bentuk sel : coccus Sifat Gram : positif Uji gula-gula Positif : glukosa dan berbagai macam karbohidrat</p>
<p><i>Cellvibrio mixtus</i></p> <p>Bentuk koloni : bulat Ukuran koloni : 1-3 cm Warna koloni : putih crem Bentuk sel : kokoid Sifat Gram : negatif Uji gula-gula Positif : glukosa, laktosa, maltosa, sukrosa</p>	<p><i>Cellvibrio mixtus</i></p> <p>Bentuk koloni : - Ukuran koloni : 1-3 cm Warna koloni : putih crem Bentuk sel : - Sifat Gram : negatif Uji gula-gula Positif : glukosa, laktosa, maltosa, sukrosa</p>
<p><i>Cytophaga hutchinsonii</i></p> <p>Bentuk koloni : bundar Ukuran koloni : 1 cm Warna koloni : kuning Bentuk sel : batang Sifat Gram : negatif Uji gula-gula Positif : glukosa</p>	<p><i>Cytophaga hutchinsonii</i></p> <p>Bentuk koloni : bundar Ukuran koloni : 1 cm Warna koloni : kuning Bentuk sel : - Sifat Gram : negatif Uji gula-gula Positif : glukosa dan berbagai macam karbohidrat</p>
<p><i>Lactobacillus acodophilus</i></p> <p>Bentuk koloni : bundar Ukuran koloni : 2 cm Warna koloni : putih Bentuk sel : coccus Sifat Gram : positif Uji gula-gula Positif : dextrose, maltosa</p>	<p><i>Lactobacillus acodophilus</i></p> <p>Bentuk koloni : - Ukuran koloni : 2-5 cm Warna koloni : tanpa pigmen Bentuk sel : coccus Sifat Gram : positif Uji gula-gula Positif : -</p>

Nilai *optical density* yang meningkat pada semua biakan bakteri dalam media CMC cair menunjukkan bahwa bakteri selulolitik hasil isolat mampu berkembangbiak dengan memanfaatkan selulosa yang terdapat di dalam media sebagai sumber energinya. Kekeruhan media CMC yang telah diinokulasi dengan bakteri selulolitik timbul karena terdapat banyak bakteri setelah diinkubasi.

Keenam bakteri selulolitik yang dapat diisolasi tersebut adalah bakteri tanah yang masuk ke dalam rumen sapi bersama dengan makanan atau minuman. Bakteri selulolitik mampu hidup di dalam rumen sapi karena rumen memberikan kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri tersebut. Arthur (1987) menyebutkan bahwa jumlah bakteri bervariasi tergantung jenis makanan yang diberikan, spesies yang berbeda, dan individu yang berbeda.

Bakteri selulolitik dapat ditemukan di tanah, limbah peternakan dan dalam jaringan tumbuhan yang sedang membusuk. Di alam bakteri selulolitik mampu mendegradasikan selulosa dalam keadaan aerob maupun anaerob. Bakteri selulolitik juga masih mampu menunjukkan aktivitas selulolitik pada kondisi pH asam maupun basa dan pada kisaran suhu yang luas (Alexander, 1976).

Proses pencernaan makanan di dalam saluran pencernaan sapi berlangsung kira-kira hanya sembilan jam menjadikan jenis pakan seperti jerami padi yang mengandung banyak selulosa menjadi bahan pakan yang kurang dapat dimanfaatkan secara maksimal tanpa bantuan bakteri selulolitik. Di dalam rumen bakteri selulolitik menghasilkan enzim selulase yang mampu memecah selulosa menjadi glukosa. Isolat bakteri selulolitik digunakan sebagai bahan inokulum pada jerami padi dengan harapan bakteri selulolitik mampu memecah selulosa di

dalam jerami padi menjadi glukosa di luar rumen sapi. Pemakaian bahan pakan jerami yang telah difermentasi dengan bantuan bakteri selulolitik menjadikan jerami padi lebih efektif sebagai bahan pakan karena sapi tidak mampu menghasilkan enzim selulase.

Titik pusat degradasi selulosa terletak pada pecahnya ikatan 1,4 β -glukosida. Pecahnya ikatan 1,4 β -glukosida menyebabkan selulosa terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana, yaitu oligosakarida selobiosa. Selanjutnya oligosakarida akan terhidrolisis menjadi monosakarida glukosa. Pemecahan ikatan 1,4 β -glukosida dilakukan oleh kompleks enzim selulase (Bondi, 1985). Kompleks enzim selulase terdiri dari tiga enzim yaitu, endo 1,4 β -glukanase, ekso 1,4 β -glukanase dan β -glukosidase yang bersifat ekstra seluler (Atlas, 1981). Setiap enzim mempunyai fungsi khusus, ekso 1,4 β -glukanase berfungsi untuk melepaskan selobiosa dari rantai selulose. Endo 1,4 β -glukanase berfungsi untuk menghidrolisis rantai-rantai selulosa secara acak. Enzim β -glukosidase berperan dalam hidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Atlas, 1981).

Acidothermus cellulolyticus mampu tumbuh pada berbagai macam karbohidrat termasuk D-glukosa dan D-selobiose (Holt et al., 1994). Glukosa adalah penyusun dari selulosa (Thayer, 1978) *Acidothermus cellulolyticus* mampu menggunakan kedua bahan tersebut untuk hidupnya menunjukkan bahwa *Acidothermus cellulolyticus* memiliki sifat selulolitik. *Cellvibrio mixtus* memiliki sifat selulolitik ditunjukkan dengan kemampuannya menghasilkan enzim β -Glukosidase (Holt, 1994). *Cellulomonas* dan *cytophaga* mampu membentuk endoglukanase dan β -Glukosidase tetapi tidak mampu membentuk

eksoglukonase. Sutedjo(1991) menyebutkan bahwa *Cytophaga* merupakan bakteri yang paling aktif dalam pembusukan atau dekomposisi sampah sayuran di dalam tanah spesies dari bakteri ini adalah *Cytophaga hutchinsonii*. Selain *Cytophaga*, *Cellvibrio* juga berperan dalam dekomposisi selulosa.. Spesies *Lactobacillus* yang berhasil diisolasi adalah *Lactobacillus acidophilus* yang merupakan bakteri *homofermentatif* yang memproduksi asam laktat.

Bakteri selulolitik anaerob tidak didapatkan selama isolasi karena pelaksanaan penelitian dilakukan secara aerob. Bakteri selulolitik yang termasuk an aerob diantaranya adalah : *Ruminococcus albus*, *R. flavecciens*, *B. succinogenes*, *B. ruminicola*, *B. ruminibacter*.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil isolasi bakteri selulolitik dari limbah cairan rumen sapi diperoleh enam isolat bakteri yaitu *Acidothermus cellulolyticus*, *Bacillus sphaericus*, *Cellulomonas cellulans*, *Cellvibrio mixtus*, *Cytophaga hutchinsonii*, dan *Lactobacillus acidophilus*.

V.2 Saran

1. Perlu dilaksanakan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi jamur dari cairan rumen yang bersifat selulolitik.
2. Perlu dilaksanakan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi protozoa dari cairan rumen yang bersifat selulolitik.
3. Perlu dilaksanakan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui lama kemampuan hidup bakteri selulolitik aerob pada media CMC.
4. Perlu dilaksanakan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh waktu pengambilan sampel, perbedaan spesies dan individu terhadap hasil isolat yang diperoleh dari limbah cairan rumen sapi.

RINGKASAN

TRI PRASETYO NUGROHO. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik dari Limbah Cairan Rumen Sapi Sebagai Bahan Inokulum pada Jerami Padi (dibawah bimbingan Mirni Lamid, MP., Drh sebagai pembimbing pertama dan Soepartono Partosoewignjo, MS., MM., Drh sebagai pembimbing kedua).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi dan membuktikan bahwa bakteri selulolitik dari limbah cairan rumen masih mampu mendegradasikan selulosa diluar rumen.

Isolasi dilakukan dengan mengambil sampel limbah cairan rumen sapi sebanyak 500 ml. Diambil 1 ml sampel diencerkan pada 99 ml aqudest steril sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Hasil pengenceran 10^{-2} diambil 1 ml untuk diinokulasikan kedalam media CMC agar yang bersuhu kurang lebih 45°C sebanyak kurang lebih 15 ml dengan metode tuang (*pour plate*). Pencampuran dilaksanakan dengan memutar cawan petri. Setelah dingin cawan petri diinkubasikan pada suhu ruang selama 3 hari.

Setelah koloni bakteri selulolitik tumbuh dimurnikan dengan membuat *streak* pada media *Czapex Modification*. Koloni yang telah murni dipindahkan kedalam media biakan miring dan diinkubasikan pada suhu ruang sebagai stok bakteri.

Tiap jenis isolat diidentifikasi melalui uji morfologis secara makroskopis untuk melihat bentuk dan warna koloni dan secara mikroskopis untuk melihat bentuk dan sifat Gram bakteri. Untuk penentuan jenis bakteri dilanjutkan dengan

uji Motilitas dan uji Biokimia yang meliputi uji : gula – gula (Glukosa, lactosa, dextrosa, sukrosa, sakarosa dan maltosa), urea, sitrat, manitol, SIM dan TSIA.

Hasil isolasi bakteri selulolitik dari cairan rumen sapi diperoleh enam macam spesies bakteri selulolitik aerob. Semua bakteri tersebut mampu tumbuh pada media padat CMC, media cair CMC dan *Czapek Modification*. Enam macam bakteri yang didapatkan adalah *Acidothermus*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Cytophaga*, dan *Lactobacillus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aklyosov. 2004. Principles of The Enzymatic Degradation of Cellulosa. http://aklyosov.home_comlast.net/volume2.htm.
- Alexzander, M. 1976. Introduction To Soil Microbiology. Second edition. Jhon & sons, New York.
- Anggorodi, R. 1980. Ilmu Makanan Ternak Umum. Gramedia. Jakarta.
- Anonimus^a. 2003. Hyperdictionary. Biologi Dictionary. Meaning of Optical Density. Optical Dencity-Compare Prices and Find The Best Deal Here. WWW.dealtime.com
- Anonimus^b. 2004. Microbiology of The Rumen and Small and Large Intestine. www.chu.cam.ac.uk/-ARLF/microbial.htm.
- Atlas, M. R. 1988. Microbiologi Fundamental and Aplications. Second Edition. Macmillan Publishing Company. New York. USA.
- Bondi, A.A. 1987. Animal Nutition. Wiley-Interscience publication. London. 63.
- Campbell, Mitchell, Reece. 1994. Biology Concepts & Connections. The Benjamin/Commings Publishing Company, inc. USA. 2, 39, 222, 328 – 329.
- Church, D.C. 1993. The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition. Waveland Press, Inc. USA. 126, 276.
- Colwell, R.R. and M.S. Zambruski. 1972. Methods in Aquatic Microbiology, University Park Press. London.
- Demain, A. and A. N. Solomon. 1986. Manual Industrial Mikrobiologi and Biotecnology. American Society for Microbioloy. Wasington D.C. 18.
- Doyle, p.t., C. Devendra and G.R. Pearce. 1986. Rice Straw as a Feed for Ruminants. International Development Program of Australian Univesities and Coleges Limited (IDP), Canberra.
- Fessenden, R.J. 1982. Kimia Organik. terjemahan. jilid 2. Erlangga. Jakarta.
- Glass, D.J. 1991. Waste Management; Biological Treatment of Hazardous Wastes. Environman heldreff Publication. New York.

- Holt, John G., Noel R. Krieg., Peter H.A. Sneath., James T. Staley., Stanley T. 1994. Williams. Bergey's manual of determinative Bacteriologi ninth edition. William and Wilkins. USA.
- Iman, E.R.S., D. Handijatno., W. Tyasningsih. 2004. Penuntun Praktikum Mikrobiologi Veteriner I Program S-1. 24 – 28.
- Keeton W. T., I. G. James. 1986. Biological science. 4th. w.w. norton & Company, inc. USA. 108 – 109, 265, 394.
- Komar, A. 1984. Teknologi Pengolahan Jerami Sebagai Makanan ternak. Yayasan Dian Grahita, Indonesia.
- Lehninger, A.L. 1983. Dasar-dasar Biokimia. Terjemahan. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Ogimoto, K., S. Imai. 1981. Atlas Of Rumen Microbiologi. Japan Scientific Societies Prees. Tokyo. 71, 74.
- Pelczar, Michael J., E.C.S. Chan., N.R. Krieg. 1993. Microbiology Concepts and Applications. Mc Graw-Hill. USA
- Rahmachandran, S. 2003. Anaerobes In Health and Disease Of Animals. www.indiaveterinarycommunity.com
- Reksohadiprodjo, S. 1981. Produksi Tanaman Hijauan Makanan Ternak Tropik. Bagian Penerbitan Fakultas Ekonomi, UGM. Yogyakarta.
- Singleton, P., D. Sainsbury. 2001. Dictionary of Biology and Molecular Biologi. 3th Edition. John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane. Chichester West Sussex PO19 1UD. UK. 70 – 72, 679.
- Solomon, Berg, Martin, Villee. 1996. Biology. fourth edition. USA. 507, 514 – 520.
- Solomon, Arnold. 1986. Manual of Industrial microbiology and Biotechnology. Massachusetts Institute of Technology Cambridge. Massachusetts.
- Sorjono, M. 1995. Perubahan Struktur dan Kecernaan Jerami Padi Akibat Perlakuan Urea Sebagai Pakan Sapi potong. Disertasi S-3. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Thayer, D.W. 1978. Groeth of Seeded Cellulolitic Enrichment cultures on Mesquite Wood. Applied Microbiology, vol. 36.

Lampiran 1. Media Isolasi Bakteri Selulolitik**CARBOXIL METIL CELLULOSE (CMC) CAIR (Solomon, 1986)**

Bahan :

Carboxil Metil Cellulose	7,0 ml
Yeast Extract	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,7 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄	0,001g

Cara pembuatan media CMC cair :

Semua bahan yang tercantum diatas dicampur kedalam sebuah erlenmeyer, tambahkan 1000 ml aquadest. Panaskan pada api sampai mendidih, kemudian diautoclaf untuk sterilisasi.

CMC PADAT

Bahan sama dengan CMC cair ditambah Agar Base 15 gram untuk pembuatan media 1 liter.

CZAPEK'S DOX AGAR (Solomon, 1986)

Bahan :

Czapek Dox Agar (Oxoid) 45,6 g
Carboxol Methil Cellulosa 10 g
Aquadest..... 1000 ml

Cara Pembuatan :

..... Campur
an semua zat kimia di atas sebanyak 55,6 gram ditambahkan 1 liter aquades dan
dipanaskan. Kemudian disterilisasi dalam autoclaf selama 20 menit pada suhu
121°C.

Lampiran 2. Media Uji Biokimia

TSIA (Triple Sugar Iron Agar) (Iman, 2004)

LAB-Lemco Powder	3 g
Yeast extract.....	3 g
Peptone.....	20 g
Sodium chloride	5 g
Lactose	10 g
Sucrose	10 g
Dextrose	1 g
Ferric citrate	0,3 g
Sodiumthiosulfate	0,3 g
Phenol red	secukupnya
Agar ph 7,4 +_ 0,2	12 g

Cara kerja :

- larutkan semua bahan ke dalam 1 liter air suling
- Panaskan sambil diaduk hingga larutan sempurna
- Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit
- Tuang dalam tabung reaksi dan letakkan +_ 30 – 45^o C sehingga diperoleh bagian tegak dan bagian miring.
- Biarkan medium menjadi dingin dan padat
- Inkubasi pada suhu 37^o C selama 24 jam

Sulfide Indol Motility(SIM) (Iman, 2004)

Triptone	20 g
Peptone	6,1 g
Ferrous Ammonium Sulphate	0,2 g
Sodiumthiosulphate.....	0,2 g
Agar.....	0,2 g

pH 7,3 +_2

Cara Kerja :

- larutkan semua bahan ke dalam 1 liter air suling
- Panaskan sambil diaduk hingga larutan sempurna
- Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit
- Tuang dalam tabung reaksi Biarkan medium menjadi dingin dan padat
- Inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam

Simmons Citrate Agar (Iman, 2004)

Magnesium sulphate.....	0,2 g
Ammonium dihidrogen phosphate.....	0,2 g
Sodium citrate, tribasic	0,8 g
Sodium chloride	2 g
Bromothymol blue	5 g
Agar.....	15 g
pH 7+- 0,2	

Cara Kerja :

- larutkan semua bahan ke dalam 1 liter air suling
- Panaskan sambil diaduk hingga larut sempurna
- Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit
- Tuang dalam tabung reaksi Biarkan medium menjadi dingin dan padat
- Inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam

Urea (Iman, 2004)

Peptone.....	1 g
Dextrose	1 g
Sodium phosphate.....	5 g
Disodium phosphate.....	1,2 g
Pottasium dihydrogen phosphate	0,8 g
Phenol red	0,012 g

pH 6,8 +_ 0,2

Cara Kerja :

- larutkan semua bahan ke dalam 1 liter air suling
- Panaskan sambil diaduk hingga larut sempurna
- Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit
- Dinginkan sampai suhu 50° C kemudian secara aseptis tambahkan 5 ml urea solution steril 40 %
- Tuang dalam tabung reaksi biarkan medium menjadi dingin
- Inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam

Larutan Gula-Gula (Iman, 2004)

Air pepton	100 ml
Gula – gula	2,1 g
Phenol red	1 ml

Cara Kerja :

- larutkan gula-gula dalam air pepton
- teteskan phenol red
- sterilkan gula-gula dengan cara filtrasi
- tuang ke dalam tabung reaksi
- inkubasikan pada suhu 37° C selama 24 jam

Lampiran 3. Diagram Pemecahan Selulosa

