

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pengambilan Sampel Tanah Perkebunan Teh

Sampel tanah perkebunan teh yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari perkebunan teh Kemuning yang ada di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Sampel tersebut diambil pada tiga titik lokasi berbeda dekat daerah rhizofe pada kedalaman 10-15 cm. Sampel tanah perkebunan teh dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Persiapan Sampel

Tanah dari tiga lokasi berbeda ditimbang secara seksama sebanyak 1 gram dan dilarutkan dengan 9 mL Na fisiologis 0,9 % kemudian divortex selama 5 menit. sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Tujuan dilakukan vortex adalah untuk menghomogenkan tanah dengan Na fisiologis dan memecahkan molekul tanah menjadi lebih halus. Hasilnya diperoleh suspensi tanah dengan butiran tanah yang halus dan merata dalam seluruh larutan Na fisiologis. Sampel dapat dilihat pada Lampiran 2.

3. Isolasi dan Skrining Bakteri Tanah Perkebunan Teh

Hasil isolasi dari tiga lokasi tanah perkebunan teh kemuning dengan seri pengenceran 10^{-1} didapatkan bakteri yang mampu tumbuh pada media NA (*Nutrient Agar*) kemudian diambil masing-masing 2 isolat bakteri dari masing-masing lokasi dengan bentuk yang berbeda dan tunggal sehingga didapatkan 6 isolat bakteri. Hasil isolasi dan skrining bakteri tanah perkebunan teh dapat dilihat pada Lampiran 3.

4. Hasil Identifikasi Tanah Perkebunan Teh

4.1 Hasil identifikasi bakteri secara makroskopis. Hasil isolasi dari tanah perkebunan teh diperoleh sebanyak 6 isolat yang mampu tumbuh pada media NA dengan karakter morfologi koloni seperti ditunjukkan pada Tabel 3.1. Hasil identifikasi isolat bakteri dari tanah perkebunan teh Kemuning secara makroskopis dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 1. Hasil identifikasi isolat bakteri dari tanah perkebunan teh secara makroskopis.

Isolat	Bentuk	Tepi	Permukaan	Warna
IBA 1	Bulat	Rata	Datar	Putih susu
IBA 2	Bulat	Rata	Datar	Putih susu
IBA 3	Bulat	Rata	Datar	Putih susu
IBS 1	Bulat	Rata	Datar	Putih susu
IBS 2	Bulat	Rata	Datar	Putih susu
IBS 3	Bulat	Rata	Datar	Putih susu

Keterangan :

IBA 1 = Kode isolat bakteri amilase dari tanah perkebunan teh lokasi 1

IBA 2 = Kode isolat bakteri amilase dari tanah perkebunan teh lokasi 2

IBA 3 = Kode isolat bakteri amilase dari tanah perkebunan teh lokasi 3

IBS 1 = Kode isolat bakteri selulase dari tanah perkebunan teh lokasi 1

IBS 2 = Kode isolat bakteri selulase dari tanah perkebunan teh lokasi 2

IBS 3 = Kode isolat bakteri selulase dari tanah perkebunan teh lokasi 3

4.2 Hasil identifikasi bakteri secara mikroskopis.

4.2.1 Hasil pewarnaan Gram. Uji pewarnaan gram bertujuan untuk mengetahui morfologi bakteri dan membedakan antara bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri Gram positif berwarna ungu yang disebabkan kompleks warna Kristal violet-iodine tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat. Bakteri Gram negatif berwarna merah karena kompleks warna tersebut larut sewaktu pemberian larutan pemucat dan kemudian mengambil zat warna kedua yang berwarna merah. Perbedaan hasil dalam pewarnaan tersebut disebabkan perbedaan struktur, terutama dinding sel kedua kelompok bakteri tersebut (Lud Waluyo 2008). Hasil uji pewarnaan gram pada isolat yang diuji menunjukkan bahwa bakteri gram bersifat positif yang ditandai dengan warna ungu. Warna ungu disebabkan karena dinding sel bakteri mengikat zat warna kristal violet (Sutrisna 2013). Terdapatnya warna ungu pada hasil pengecatan gram menunjukkan hasil pengecatan gram positif yang terdiri dari dua lapisan yaitu peptidoglikan yang tebal dan membran dalam. Lapisan peptidoglikan inilah yang mengikat zat warna kristal violet. Zat warna yang telah diikat oleh dinding sel bakteri ini tidak akan hilang setelah proses pelunturan dengan alkohol (Ernawati 2010). Lapisan peptidoglikan yang terdapat pada dinding sel bakteri Gram positif lebih tebal dibandingkan dengan Gram negatif.

Hasil pengujian pewarnaan Gram menunjukkan Gram positif (warna ungu) pada isolat bakteri IBA 1, IBA 2, IBA 3, IBS 1, IBS 2, dan IBS 3. Sifat Gram

positif dengan warna ungu pada sel bakteri karena memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal. (Hasil pewarnaan dapat dilihat pada Lampiran 5).

4.2.2 Hasil pewarnaan spora. Pewarnaan spora dilakukan untuk mengetahui letak spora didalam sel bakteri. Fungsi spora pada bakteri untuk mempertahankan diri dari pengaruh lingkungan luar. Spora akan lebih tahan dalam keadaan kering, panas atau adanya bahan kimia beracun (Sunatmo 2007). Fungsi dari penggunaan pewarnaan malachite green adalah untuk mewarnai spora yang ada dalam sel bakteri, sedangkan untuk memperjelas pengamatan, maka sel vegetatif juga diwarnai dengan menggunakan pewarna safranin sehingga sel vegetatif berwarna merah dan spora bakteri berwarna hijau. Dengan perbedaan warna tersebut, maka ada atau tidaknya spora bisa teramati, bahkan posisi spora di dalam tubuh sel vegetatif juga dapat diidentifikasi (Volk dan Wheeler 1988).

Hasil pengujian pewarnaan endospora pada 6 isolat bakteri positif (warna merah pada sel vegetatif dan warna hijau pada endospora). Uji pewarnaan endospora positif jika sel vegetatif bakteri berwarna merah dan terdapat spora didalam sel yang berwarna hijau, sedangkan jika hanya ada sel vegetatif saja berwarna merah tidak ada spora hasilnya negatif (Lay 1994). Hasil pewarnaan spora dapat dilihat pada Lampiran 6.

Hasil pewarnaan Gram dan Spora pada 6 isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil identifikasi isolat bakteri dari tanah perkebunan teh secara mikroskopik.

Isolat	Bentuk	Susunan	Warna	Spora
IBA 1	Batang	Tunggal	Ungu	Berspora
IBA 2	Batang	Tunggal	Ungu	Berspora
IBA 3	Batang	Tunggal	Ungu	Berspora
IBS 1	Batang	Tunggal	Ungu	Berspora
IBS 2	Batang	Tunggal	Ungu	Berspora
IBS 3	Batang	Tunggal	Ungu	Berspora

Keterangan :

IBA 1 = Kode isolat bakteri amilase dari tanah perkebunan teh lokasi 1

IBA 2 = Kode isolat bakteri amilase dari tanah perkebunan teh lokasi 2

IBA 3 = Kode isolat bakteri amilase dari tanah perkebunan teh lokasi 3

IBS 1 = Kode isolat bakteri selulase dari tanah perkebunan teh lokasi 1

IBS 2 = Kode isolat bakteri selulase dari tanah perkebunan teh lokasi 2

IBS 3 = Kode isolat bakteri selulase dari tanah perkebunan teh lokasi 3

Hasil identifikasi bakteri dengan uji biokimia. Uji biokimia dilakukan untuk mengidentifikasi suatu bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya. Uji

pada media KIA bertujuan untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dengan ada atau tidaknya gas dan sulfida. Uji Gula-Gula digunakan untuk mengetahui apakah bakteri memfermentasi gula-gula (glukosa, laktosa, maltosa, sukrosa) membentuk asam. Bakteri *Bacillus sp.* Merupakan bakteri yang bersifat aerobik oleh karena itu dalam proses fermentasi glukosa harus diperhatikan dengan baik (Sakti 2012). Bakteri ini hanya dapat memfermentasi glukosa tapi tidak dapat memfermentasi laktosa, maka pada uji bakteri tanah ini hanya menggunakan uji gula-gula saja seperti KIA, sukrosa, glukosa, laktosa dan maltosa. Uji biokimia yang dilakukan pada 6 isolat bakteri masing-masing memiliki hasil yang sama yang dapat dilihat pada tabel 3. Hasil identifikasi isolat bakteri dari tanah perkebunan teh dengan uji biokimia dapat dilihat pada lampiran 7.

Tabel 3. Hasil identifikasi isolat bakteri dari tanah perkebunan teh dengan uji biokimia

Pengujian	IBA 1	IBA 2	IBA 3	IBS 1	IBS 2	IBS 3
KIA	K/A S(-)	K/A S(-)	K/A S(-)	K/A S(-)	K/A S(-)	K/A S(-)
Sukrosa	+	+	+	+	+	+
Glukosa	+	+	+	+	+	+
Laktosa	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+

Keterangan :

IBA 1 = Kode isolat bakteri amilase dari tanah perkebunan teh lokasi 1

IBA 2 = Kode isolat bakteri amilase dari tanah perkebunan teh lokasi 2

IBA 3 = Kode isolat bakteri amilase dari tanah perkebunan teh lokasi 3

IBS 1 = Kode isolat bakteri selulase dari tanah perkebunan teh lokasi 1

IBS 2 = Kode isolat bakteri selulase dari tanah perkebunan teh lokasi 2

IBS 3 = Kode isolat bakteri selulase dari tanah perkebunan teh lokasi 3

KIA : Kliger Iron Agar

A : Kuning

K : Merah

S : Sulfida

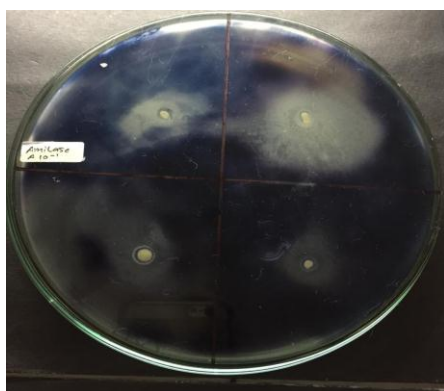
Hasil karakterisasi pada isolat bakteri IBA 1, IBA 2, IBA 3, IBS 1, IBS 2, dan IBS 3 yang dilakukan pada pengujian media KIA memberikan hasil bagian lereng berwarna merah (K) karena adanya proses oksidasi dekarboksilasi protein membentuk amina yang bersifat alkali dengan adanya *fenol red*. Bagian dasar berwarna kuning (A) karena isolat bakteri memfermentasi karbohidrat yaitu menguraikan glukosa dan tidak menguraikan laktosa. Sulfida negatif dengan tidak adanya warna hitam pada media yang dikarenakan tidak memproduksi hidrogen sulfida. Hasil uji fermentasi sukrosa, glukosa, dan maltosa menunjukkan reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna kuning pada media tetapi tidak

terdapat gas pada tabung durham. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri mampu melakukan fermentasi terhadap sukrosa, glukosa, dan maltosa yang berupa asam campuran. Terjadi perubahan warna dari merah menjadi kuning disebabkan karena adanya indikator *fenol red* pada medium. Sedangkan pada fermentasi laktosa tidak terbentuk warna kuning ataupun gas berarti bakteri tidak mampu memfermentasi laktosa.

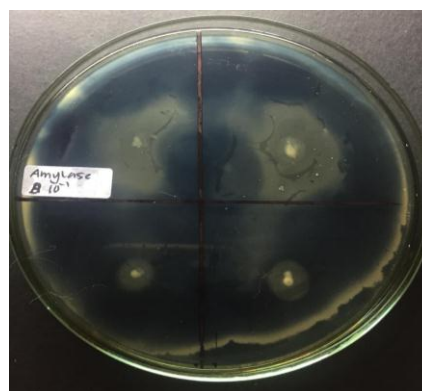
5. Hasil Uji Aktivitas Enzim Amilase dan Selulase Dari Bakteri Asal Tanah Perkebunan Teh

5.1. Uji Aktivitas Enzim Amilase. Amilase merupakan enzim yang mampu mengkatalisis pemecahan ikatan glikosida dari pati menjadi gula sederhana. Amilase dapat mengubah karbohidrat yang merupakan polisakarida menjadi molekul yang lebih sederhana seperti dekstrin, maltosa maupun glukosa.

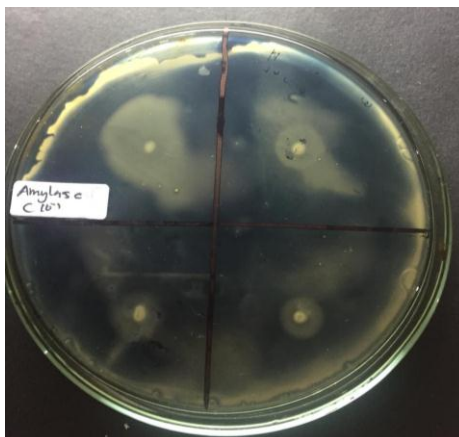
Uji aktivitas enzim amilase dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui kemampuan 3 isolat bakteri yang mampu menghasilkan enzim amilase. Aktivitas amilase secara kualitatif dapat dilakukan dengan pengujian menggunakan iodium, dengan cara menambahkan iodium pada media amilum yang telah ditumbuhi koloni bakteri. Isolat yang mampu menghasilkan amilase akan membentuk zona bening disekitar koloni. Terbentuknya zona bening karena pati sudah terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti disakarida atau monosakarida. Daerah di luar zona bening akan berwarna biru karena larutan iodium bereaksi dengan pati yang tidak dihidrolisis (Cruger dan Annelias 1982). Zona jernih yang dihasilkan ditampilkan pada Gambar 5.1.



Bakteri amilase IBA 1 dari tanah perkebunan teh lokasi 1



Bakteri amilase IBA 2 dari tanah perkebunan teh lokasi 2



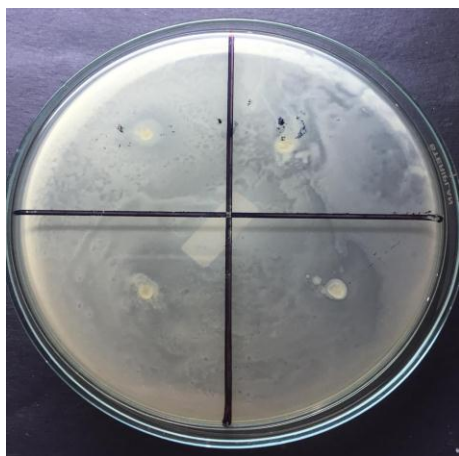
Bakteri amilase IBA 3 dari tanah perkebunan teh lokasi 3

Gambar 5. Petri dengan media Amilum Agar yang di tetesi iodium menunjukkan zona jernih yang diproduksi oleh aktivitas isolat amilase.

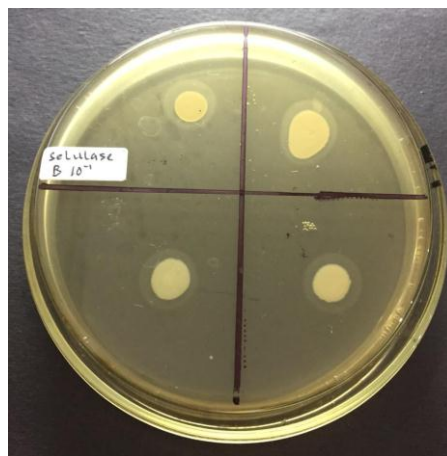
Hasil pengujian pada 3 isolat bakteri mempunyai aktivitas amilolitik berupa visualisasi zona bening disekitar koloni. Pembentukan zona bening menunjukkan bahwa pati yang terdapat di dalam media di hidrolisis oleh amilase menjadi senyawa yang sederhana seperti maltosa, dekstrin, dan glukosa. Untuk memperjelas adanya zona bening, medium pati padat yang telah ditumbuhi bakteri ditetesi dengan larutan *lugol's iodine*. Daerah di luar zona bening akan berwarna biru keunguan setelah diberi larutan tersebut, karena larutan iodin akan bereaksi dengan pati yang tidak dihidrolisis. Zona bening tidak ikut terwarnai karena pati yang terdapat pada zona tersebut sudah terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti disakarida atau monosakarida. Dilihat dari hasil ketiga lokasi pada cawan petri warna biru yang dihasilkan dari iodine yang ditetesi pada media amilum tidak merata karena terdapat garis putih di sekitar cawan, kemudian saat di uji garis putih tersebut adalah bakteri. Terdapatnya bakteri tersebut disebabkan karena pada saat tahap isolasi bakteri tanah hasil isolasi belum tunggal sehingga terdapat bakteri lain pada cawan tersebut. Faktor yang mempengaruhi salah satunya adalah kurang aseptis saat mengerjakan dan saat melakukan isolasi tidak diulang sehingga didapatkan isolat yang tidak tunggal. Berdasarkan zona bening yang terbentuk pada media amilum, maka dapat di simpulkan bahwa 3 isolat bakteri yaitu IBA1, IBA2, dan IBA3 mampu menghasilkan enzim amilase.

5.2. Uji Aktivitas Enzim Selulase. Selulase merupakan enzim yang mampu mendegradasi selulosa melalui proses katalis yang bekerja secara sinergis untuk melepas gula. Enzim selulase merupakan enzim kompleks yang terdiri dari tiga tipe enzim yaitu endoglukanase, eksoglukanase, dan selobiase yang bekerjasama dalam menghidrolisis selulosa yang tidak dapat larut menjadi glukosa.

Uji aktivitas enzim selulase dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui kemampuan 3 isolat bakteri yang mampu menghasilkan enzim selulase. Aktivitas enzim selulase dapat diketahui dengan mengamati zona jernih yang dihasilkan pada media CMC Agar 1% *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) merupakan suatu polimer anionik yang umum digunakan pada pengujian aktivitas selulase (Lee 2008). CMC merupakan substrat terbaik untuk produksi selulase karena dapat menginduksi bakteri untuk memproduksi enzim selulase (Abou Taleb *et al.* 2009). Zona jernih yang dihasilkan ditampilkan pada Gambar 5.2.



Bakteri selulase IBS 1 dari tanah perkebunan teh lokasi 1



Bakteri selulase IBS 2 dari tanah perkebunan teh lokasi 2



Bakteri selulase IBS 3 dari tanah perkebunan teh lokasi 3

Gambar 6. Petri dengan media CMC Agar menunjukkan zona jernih yang diproduksi oleh aktivitas isolat selulase.

Hasil pengujian pada 3 isolat bakteri mempunyai aktivitas selulolitik berupa visualisasi zona bening disekitar koloni. Terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa isolat bakteri yang di uji mampu menghasilkan enzim selulase. Terbentuknya zona bening menunjukkan bahwa polisakarida telah terdegradasi menjadi sakarida dengan rantai yang telah lebih pendek, dengan demikian isolat bakteri uji memiliki kemampuan mendegradasi media CMC yang mengandung selulosa. Produksi ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri uji dilakukan dengan menginkubasi bakteri selama 24 jam. Produksi enzim selulase yang merupakan metabolit primer terjadi pada akhir fase logaritmik atau awal fase stasioner bakteri (Sonia dan Kusnadi 2015). Hasil yang didapatkan pada cawan petri dari masing-masing lokasi terdapat zona bening yang dihasilkan tetapi belum terlihat sempurna, hal tersebut disebabkan karena kurangnya waktu inkubasi. Bakteri *Bacillus sp.* Memiliki fase log pertumbuhan terjadi pada jam ke- 48, sehingga apabila waktu inkubasi lebih lama maka zona bening yang dihasilkan akan lebih terlihat jelas. Berdasarkan zona bening yang terbentuk pada media CMC, maka dapat di simpulkan bahwa 3 isolat bakteri yaitu IBS1, IBS2, dan IBS3 mampu menghasilkan enzim selulase.

Sintesis enzim selulase terjadi saat nutrisi organik selain substrat CMC mulai habis, sehingga sekresi enzim selulase memungkinkan sel bakteri tetap bertahan hidup dengan menghidrolisis CMC sebagai sumber nutrisi yang tersisa

dalam media (Sari 2010). CMC pada media produksi berfungsi sebagai substrat dan sekaligus sebagai zat penginduksi untuk menghasilkan enzim selulase. Substrat CMC juga dimanfaatkan oleh bakteri sebagai karbon untuk menghasilkan glukosa (Apriani 2014). Apabila semakin banyak sumber karbon dalam media produksi maka enzim selulase yang di hasilkan semakin meningkat. Namun, apabila semakin banyak sumber karbon dapat menghambat pertumbuhan sel karena akan mengurangi jumlah oksigen dalam media sehingga dapat menurunkan produksi enzim selulase (Saropah 2012). Berdasarkan hal itu, maka untuk produksi enzim pada penelitian ini menggunakan konsentrasi substrat CMC 1%.

6. Karakteristik Bakteri hasil Isolasi

Hasil identifikasi 6 isolat bakteri yang menghasilkan enzim amilase dan selulase adalah bakteri *Bacillus sp.* Karakteristik bakteri penghasil enzim tersebut dilakukan dengan menggunakan pengamatan morfologi dan fisiologi. Hasil dari pengamatan morfologi makroskopis yaitu koloni berbentuk bulat, memiliki tepi yang rata, permukaannya datar dan warna koloni putih susu. Bentuk koloni bulat dan warna koloni putih umumnya menandakan bakteri tersebut berasal dari genus *Bacillus sp.* (Corbin 2004). Koloni bakteri *Bacillus sp.* memiliki karakteristik umum memiliki warna krem keputihan serta bentuk koloni yang bulat dan tidak beraturan. Bakteri *Bacillus sp.* memiliki tepi koloni yang bermacam-macam rata dan tidak rata, permukaannya kasar dan tidak berlendir, bahkan ada cenderung kering dan berbubuk, koloni besar dan tidak mengkilat (Hatmati 2000).

Pengecatan gram pada bakteri IBA 1, IBA 2, IBA 3, IBS 1, IBS 2, dan IBS 3 memiliki ciri-ciri morfologi bentuk sel bakteri batang dan bersifat gram positif (berwarna ungu). Pada pengecatan spora bakteri tersebut memiliki spora, bentuk spora oval dan letaknya di tengah. Sesuai dengan Feliatra *et al.* (2004) yang mengatakan bahwa bakteri *Bacillus sp.* memiliki endospora oval, kadang-kadang bundar atau silinder dan sangat resisten pada kondisi yang tidak menguntungkan.

Pengamatan secara fisiologi yang meliputi uji biokimia seperti uji gula-gula dan KIA menunjukkan hasil bahwa bakteri IBA 1, IBA 2, IBA 3, IBS 1, IBS 2, dan IBS 3 memiliki kemampuan dalam memfermentasi karbohidrat terutama glukosa dan fruktosa serta mendegradasi amilum dan selulosa. *Bacillus sp.*

bersifat aerobic oleh karena itu dalam proses fermentasi harus diperhatikan dengan baik (Sakti 2012).

Hasil-hasil ini didukung oleh pernyataan Todar (2011), yang menyatakan bahwa bakteri *Bacillus sp.* adalah bakteri uniseluler yang berbentuk batang, Gram positif, hidup secara aerob dan mempunyai endospora yang terbentuk dari sel vegetatif sebagai respon terhadap lingkungan yang ekstrim. Penentuan spesies *Bacillus sp.* juga didasarkan pada ciri-ciri karakteristik secara fisiologi dan morfologi.