



**PENGARUH LAMA FERMENTASI TERHADAP KEBERADAAN
MIKROORGANISME LOKAL (MOL) PADA EKOENZIM BERBASIS LIMBAH
BUAH DAN SAYUR**

Arrum Fitria^{1*}, Suhartini²

¹Jurusan Pendidikan Biologi, Program Studi Biologi, FMIPA UNY

²Jurusan Pendidikan Biologi, Program Studi Biologi, FMIPA UNY

*e-mail: arrumfitria.2018@student.uny.ac.id

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap keberadaan mikroorganisme lokal (MOL) pada ekoenzim dan mengidentifikasi MOL yang berperan dalam proses fermentasi ekoenzim berbasis limbah buah dan sayur ditinjau dari lama fermentasinya. Jenis penelitian ini adalah kuantitatif dengan pendekatan deskriptif-eksploratif. Isolasi MOL dilakukan dengan perlakuan lama fermentasi (45 hari dan 90 hari). Identifikasi berdasarkan morfologi koloni, morfologi sel, dan sifat fisiologis. Isolat mikroorganisme yang diperoleh diidentifikasi dengan *profile matching*. Pengaruh lama fermentasi terhadap keberadaan MOL dianalisis menggunakan aplikasi statistik dengan menerapkan uji *One-Way Anova* dan uji lanjut *Tukey HSD* dengan taraf signifikansi 5%. Karakter fenotipik pada bakteri dianalisis menggunakan program *MVSP (Multivariate Statistical Package)*. Hasil penelitian ini adalah lama fermentasi berpengaruh terhadap keberadaan MOL. Semakin lama waktu fermentasi pada fase awal stasioner menuju fase kematian jumlah mikroorganisme lokal berkurang. Hasil dari identifikasi mikroorganisme lokal adalah ditemukannya 3 genus bakteri yaitu *Megasphaera*, *Lactobacillus*, dan *Cellulomonas*. 3 genus kapang yang ditemukan adalah *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Mycelia sterilia*, serta 1 genus yeast berupa *Saccharomyces*.

Kata kunci: *Mikroorganisme Lokal, Ekoenzim, Lama Fermentasi, Identifikasi*

***EFFECT OF FERMENTATION DURATION ON THE PRESENCE OF LOCAL
MICROORGANISMS (MOLES) IN FRUIT AND VEGETABLE WASTE-BASED
ECOENZYMES***

Abstract. This study aims to determine the effect of fermentation time on the presence of local microorganisms (MOL) in ecoenzymes and identify MOLs that play a role in the ecoenzyme fermentation process based on fruit and vegetable waste in terms of fermentation time. This type of research is quantitative with a descriptive-exploratory approach. Isolation of MOL was carried out with long fermentation treatment (45 days and 90 days). Identification based on colony morphology, cell morphology, and physiological properties. Microorganism isolates obtained were identified by *profile matching*. The effect of fermentation time on the presence of MOL was analyzed using statistical applications by applying the *One-Way Anova* test and the *Tukey HSD* further test with a significance level of 5%. Phenotypic characters in bacteria were analyzed using the *MVSP (Multivariate Statistical Package)* program. The results of this study were that the length of fermentation affected the presence of MOL. The longer the fermentation time in the initial stationary phase towards the death phase the number of local microorganisms decreased. The result of the identification of local microorganisms was the discovery of 3 genera of bacteria, namely, *Megasphaera*, *Lactobacillus*, and *Cellulomonas*. 3 genera of molds found were *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Mycelia sterilia*, and 1 yeast genus in the form of *Saccharomyces*.

Keywords: *Local Microorganisms, Ecoenzymes, Fermentation Time, Identification*

PENDAHULUAN

Limbah menjadi masalah serius yang dihadapi oleh masyarakat di Indonesia yang tak kunjung usai. Manusia tidak lepas dari limbah yang dihasilkannya setiap hari dari segala aktivitasnya, baik dari kegiatan pabrik atau industri, pertambangan, dan rumah tangga. Berdasarkan data dari Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan (KLHK), pada tahun 2020 Indonesia menghasilkan 67,8 ton limbah, yang artinya ada sekitar 185.753 ton limbah setiap harinya dihasilkan oleh 270 juta penduduk. Limbah organik merupakan limbah yang mudah membusuk dan dapat terurai melalui proses biologi seperti sisa makanan, sayuran, kulit buah, daun kering dan serpihan kayu (Indriyanti *et al*, 2015). Alternatif pengolahan limbah organik terutama limbah kulit buah dan sayuran dapat dilakukan dengan cara membuat bioproduk yang ramah lingkungan seperti ekoenzim.

Ekoenzim merupakan cairan hasil fermentasi limbah dapur organik, gula (gula cokelat, gula merah, atau gula tebu), air dengan perbandingan 3: 1: 10 (Imron, 2019, Destyana, 2020). Keistimewaan dari ekoenzim ini adalah pembuatan ekoenzim memanfaatkan botol bekas air mineral sebagai wadah fermentasi ekoenzim yang sejalan dengan konsep *Reuse*, bahkan tidak membutuhkan bak komposter dengan spesifikasi tertentu, tidak membutuhkan lahan luas, bahan baku mudah didapat dan metode pembuatannya yang sederhana. Produksi ekoenzim dihasilkan gas O₃ (ozon) yang dibutuhkan untuk mengurangi emisi gas rumah kaca atmosfer bumi. Ekoenzim memiliki beragam manfaat meliputi sebagai cairan pembersih lantai, campuran deterjen, dan pupuk cair organik tanaman (Imron, 2019).

Proses pembuatan ekoenzim melalui proses fermentasi yang berlangsung selama 3 bulan. Fermentasi merupakan proses perubahan secara biokimia pada bahan pangan yang melibatkan aktivitas mikroorganisme dan metabolit aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut (Suprihatin, 2010). Fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satu diantaranya adalah lama fermentasi. Lama fermentasi dapat mempengaruhi derajat keasaman (pH) substrat, keberadaan mikroorganisme, dan ketersediaan nutrisi bagi mikroorganisme (Kusuma dkk., 2020). Fermentasi pada ekoenzim dibantu oleh mikroorganisme yang ada pada limbah sayuran dan buah-buahan yang disebut mikroorganisme *indigenous* atau lokal (MOL). Mikroorganisme Lokal (MOL) adalah mikroorganisme yang dimanfaatkan sebagai starter dalam pembuatan pupuk organik padat maupun cair (Panudju, 2011). MOL mengandung unsur hara makro dan mikro, serta mikroorganisme yang berpotensi sebagai perombak bahan organik, perangsang pertumbuhan, dan sebagai agen pengendali hama dan penyakit tanaman (Fitriani dkk., 2015). Dalam larutan MOL mengandung mikroorganisme yang berguna untuk tanaman dan kesuburan tanah seperti *Azetobacter* sp.,

Azospirillum sp., *Rhizobium* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., dan bakteri pelarut fosfat (Rahayu dan Tamtono, 2017). Mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi ekoenzim memiliki beragam karakteristik yang berbeda, maka diperlukan identifikasi untuk mempelajari mikroorganisme dalam suatu kelompok tertentu. Identifikasi mikroorganisme dilakukan melalui 2 cara yakni secara morfologi dan fisiologi. Pengamatan morfologi dibagi menjadi 2 yakni morfologi koloni dan sel (Irianto, 2013). Uji fisiologi pada bakteri dapat dilakukan dengan uji fermentasi karbohidrat, kebutuhan oksigen, katalase, hidrolisis pati, dan lain-lain (Cappucino & Sherman, 2014).

Berdasarkan uraian tersebut, jumlah dan genus dari mikroorganisme lokal (MOL) yang berperan dalam fermentasi ekoenzim dapat dipengaruhi oleh lamanya fermentasi perlu diteliti lebih lanjut. Waktu fermentasi berhubungan dengan ketersediaan nutrisi yang digunakan sebagai sumber energi dan metabolisme dari mikroorganisme. Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi dan identifikasi terhadap MOL pada lama fermentasi hari ke-45 dan hari ke-90 ekoenzim berbasis limbah buah dan sayur dengan perbandingan 1 : 2. Setelah diketahui apa saja MOL tersebut akan diteliti mengenai pengaruh lama fermentasi terhadap keberadaan ekoenzim. Dengan demikian mikroorganisme yang telah diidentifikasi dari ekoenzim berbasis limbah buah dan sayur diharapkan dapat menjadi alternatif dalam menghasilkan ekoenzim yang berkualitas ditinjau dari lama fermentasinya.

METODE PENELITIAN

Jenis Penelitian

Jenis dari penelitian ini adalah kuantitatif dengan pendekatan deskriptif-eksploratif. Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kompos FMIPA UNY dan Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNY pada bulan April 2021 hingga Mei 2022.

Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi pada penelitian adalah mikroorganisme yang ada pada cairan ekoenzim berbasis limbah buah dan sayur pada toples yang bervolume 12 L. Sampel pada penelitian ini adalah mikroorganisme yang diisolasi dari 1 ml sampel ekoenzim dengan perlakuan lama fermentasi (45 hari dan 90 hari) berbasis limbah buah dan sayur pada pengujian di laboratorium.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini dibagi menjadi 2 yaitu alat untuk

pembuatan ekoenzim dan pengujian ekoenzim di laboratorium. Alat yang digunakan pada pembuatan ekoenzim meliputi toples berukuran 12 L, botol sampel 200 ml, botol air mineral 1,5 liter, pengaduk kayu, timbangan, baskom, pH meter, pH stick, termometer, higrometer, gelas ukur, pisau, talenan, serbet, penyaring, gunting, selang, label, alat dokumentasi, dan alat tulis. Bahan yang digunakan pada pembuatan ekoenzim adalah limbah kulit buah segar (0,7 kg), limbah sayur segar (1,4 kg), air 7 liter, dan gula merah 0,7 kg. Alat yang digunakan untuk pengujian ekoenzim di laboratorium meliputi petridish, tabung reaksi beserta rak, ose kolong, ose jarum, drygalsky, spatula, scalpel, gelas benda, gelas penutup, mikropipet dan tip, pipet tetes, tabung durham, gelas beaker, gelas ukur, labu Erlenmeyer, lampu bunsen, hot plate, *magnetic stirrer*, *vortex*, timbangan analitik, oven, inkubator, *autoclave*, *laminar air flow*, lemari pendingin, mikroskop, dan korek api. Bahan yang digunakan pada pengujian ekoenzim di laboratorium meliputi media *Nutrient Agar*, *Potato Dextrose Agar*, *Nutrient Broth*, *Starch Agar*, *Carboxymethyl Cellulose*, media glukosa, media maltose, media laktosa, larutan H₂O₂ 30%, fenol red, congo red, iodin, *malachite green*, safranin, kristal violet, *lactophenol blue*, aseton alkohol, tablet *ringer solution*, aquadest, alkohol 70%, spiritus, tisu, kertas saring, kertas payung, aluminium foil, dan plastik wrap.

Teknik Pengambilan Data

Isolasi Mikroorganisme dari Sampel Ekoenzim

Pengenceran bertingkat untuk mengurangi jumlah mikroorganisme yang tersuspensi dalam cairan. Pengenceran bertingkat dilakukan dari 10⁻¹ hingga pengenceran 10⁻⁸. Pengenceran yang digunakan ialah tiga seri pengenceran terakhir yakni 10⁻⁶, 10⁻⁷, dan 10⁻⁸. Isolasi mikroorganisme digunakan media pertumbuhan *Nutrient Agar* untuk bakteri dan *Potato Dextrose Agar* untuk kapang dan *yeast*. Teknik isolasi yang digunakan adalah *spread plate*.

Perhitungan Jumlah Koloni Mikroorganisme

Hasil isolasi mikroorganisme pada media NA dan PDA dihitung dengan *colony counter* dengan teknik metode *Total Plate Count*. Jumlah koloni bakteri dan kapang/*yeast* yang dilakukan perhitungan bakteri dengan rumus perhitungan koloni.

Purifikasi dan Penyediaan Kultur Murni Mikroorganisme

Purifikasi mikroorganisme dilakukan menggunakan teknik streak yang diinokulasi pada media *Nutrient Agar slant* pada bakteri dan *Potato Dextrose Agar slant* pada kapang dan *yeast*.

Identifikasi Morfologi Koloni Mikroorganisme

Identifikasi morfologi koloni bakteri diinokulasi pada media NA plate, NA slant, dan NB. Karakter yang diamati pada identifikasi morfologi koloni bakteri meliputi warna

permukaan, konfigurasi/bentuk, margin/tepi, elevasi, diameter. Morfologi koloni pada kapang dan yeast diinokulasi pada media PDA plate. Karakter yang diamati pada kapang meliputi warna permukaan, warna sebalik, tekstur, permukaan, radial furrow, growing zone zonasi, dan eksudat. Karakter yang diamati pada yeast meliputi warna, bentuk, tepi, elevasi, dan permukaan.

Identifikasi Morfologi Sel Mikroorganisme

Identifikasi morfologi sel pada bakteri dilakukan melalui pewarnaan gram dan pewarnaan endospora. Identifikasi morfologi sel pada kapang dilakukan melalui *slide culture* dengan karakter yang diamati berupa ada atau tidaknya sekat pada hifa, jenis alat reproduksi yang dimiliki, warna spora atau konidianya ada tidaknya alat tambahan (rhizoid, sel kaki), dan ada tidaknya percabangan konidiofora atau sporangiofora. Identifikasi morfologi sel pada yeast dilakukan dengan pewarnaan menggunakan *methylene blue*. Pengamatan sel *yeast* berupa bentuk, ukuran sel, dan *budding* (pertunasan).

Identifikasi Fisiologi Bakteri

Identifikasi fisiologi bakteri dilakukan dengan pengujian biokimiawi meliputi uji motilitas, uji kebutuhan oksigen, uji katalase, uji hidrolisis pati, uji CMC (Carboxymethyl Cellulose), uji sitrat, dan uji fermentasi karbohidrat.

Teknik Analisis Data

Data hasil penelitian ini dianalisis secara kuantitatif dan deskriptif-eksploratif. Secara kuantitatif dianalisis dengan aplikasi statistik dengan menerapkan analisis One-Way Anova dengan taraf signifikansi yang digunakan sebesar 5%. Jika hasil Anova menunjukkan nilai $p < 0.05$ yang berarti terdapat pengaruh lama fermentasi terhadap jumlah mikroorganisme, maka dilakukan uji lanjut atau *post hoc* berupa uji Tukey *Honestly Significance Difference* (HSD). Teknik analisis data secara deskriptif-eksploratif pada bakteri dilakukan dengan cara *profile matching* menggunakan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* dan pembuatan dendogram menggunakan aplikasi Microsoft Excel dan MVSP. Identifikasi pada kapang dilakukan dengan cara *profile matching* menggunakan buku *Pengenalan Kapang Tropik Umum* (Gandjar *et al.*, 2000) dan jurnal terkait. Identifikasi pada *yeast* dilakukan dengan cara *profile matching* berdasarkan literatur yang ada.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Tabel 1. Perhitungan Jumlah Koloni Mikroorganisme

No.	Sampel Ekoenzim	Jumlah Bakteri (cfu/gr)	Jumlah Kapang / Yeast (cfu/gr)
1.	P 45	$2,57 \times 10^8$	$1,78 \times 10^6$
3.	P 90	$1,22 \times 10^8$	$1,75 \times 10^6$

Hasil perhitungan jumlah koloni mikroorganisme didapatkan sampel ekoenzim P 45 pada bakteri dan kapang/*yeast* memiliki nilai yang lebih tinggi yakni $2,57 \times 10^8$ cfu/gr dan $1,78 \times 10^6$ cfu/gr dibandingkan pada sampel P 90 dengan jumlah $1,22 \times 10^8$ cfu/gr dan $1,75 \times 10^6$ cfu/gr. Sampel dengan lama fermentasi 45 hari menunjukkan jumlah koloni mikroorganisme, lebih banyak dibandingkan pada lama fermentasi 90 hari. Hal ini dikarenakan pada hari ke-45, mikroorganisme memasuki fase awal stasioner berdasarkan dari ciri-ciri dan jumlah yang ada. Pada hari ke-90 atau akhir fermentasi ekoenzim, mikroorganisme berada dalam fase kematian yang ditunjukkan dari jumlah mikroorganisme menurun drastis dibandingkan pada hari ke-45. Hasil penelitian sejalan dengan Mardalena (2016), ciri-ciri fase stasioner pada mikroorganisme adalah terjadinya penurunan jumlah mikroorganisme sehingga jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati, dimana penurunan jumlah mikroorganisme dikarenakan jumlah nutrisi dalam media dan cadangan energi mulai berkurang.

Tabel 2. Morfologi Koloni Bakteri pada Media NA

No.	Kode Isolat	Morfologi Koloni NA <i>plate</i>						Morfologi Koloni NA <i>slant</i>
		Warna	Konfigurasi	Margin	Elevasi	Diameter	Ukuran	Tipe Pertumbuhan
1.	B.45.1	Putih	Irregular and spreading	Lobate	Flat	9 mm	Kecil	Effuse
2.	B.90.1	Putih	Irregular and spreading	Lobate	Flat	14 mm	Sedang	Spreading
3.	B.90.2	Putih	Irregular and spreading	Wavy (Undulate)	Flat	5 mm	Kecil	Effuse
4.	B.90.3	Putih	Irregular and spreading	Wavy (Undulate)	Flat	7 mm	Kecil	Effuse
5.	B.90.4	Kuning muda	Round	Smooth (Entire)	Flat	9 mm	Kecil	Spreading

Identifikasi koloni bakteri ditanam pada media *Nutrient Agar* (NA) *plate* dan NA *slant*

yang bertujuan untuk melihat karakteristik morfologi koloni bakteri. Karakter yang diamati berupa warna permukaan, konfigurasi, margin, elevasi, dan diameter. Pertumbuhan koloni bakteri pada media *Nutrient Agar (NA) slant*, pada isolat bakteri mempunyai tipe pertumbuhan effuse yang ditandai dengan pertumbuhan tipis dan merata. Tipe pertumbuhan *spreading* yang ditunjukkan dengan pertumbuhan yang merata beberapa mm di sekitar garis (bekas) inokulasi. Tipe pertumbuhan filiform yang ditandai dengan pertumbuhan sepanjang bekas inokulasi merata. Karakteristik morfologi pada bakteri dipengaruhi oleh variasi media yang digunakan. Perbedaan ini disebut dengan karakteristik kultur, yang digunakan sebagai dasar dalam memisahkan mikroorganisme pada kelompok taksonomik (Sabdaningsih dkk., 2013).

Tabel 3. Hasil Uji Morfologi Sel Bakteri

No.	Kode Isolat	Sifat Gram	Bentuk Sel	Susunan Sel	Endospora
1.	B.45.1	Positif	Basil	Diplobasil	Tidak ada
2.	B.90.1	Positif	Basil	Monobasil	Tidak ada
3.	B.90.2	Positif	Basil	Streptobasil	Ada
4.	B.90.3	Positif	Basil	Stapilobasil	Tidak ada
5.	B.90.4	Negatif	Kokus	Diplokokus	Tidak ada

Pengamatan pewarnaan gram dan pewarnaan endospora dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X. Hasil pewarnaan gram dari 5 isolat bakteri, 4 diantaranya adalah gram positif yang ditunjukkan dengan sel bakteri yang berwarna ungu. Sedangkan 1 isolat merupakan gram negatif yang ditunjukkan dengan sel bakteri berwarna merah. Perbedaan warna yang ditunjukkan pada bakteri gram positif dan gram negatif disebabkan adanya perbedaan struktur dinding sel antara kedua jenis bakteri tersebut. Bakteri gram positif mempunyai struktur dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tebal. Sementara itu, bakteri gram negatif mempunyai struktur dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tipis. Komponen penyusun dinding sel bakteri gram positif relatif lebih sederhana dibandingkan gram negatif yaitu tersusun dari asam teikoat dan asam teikuronat. Sedangkan dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks karena ada membran luar yang melindungi peptidoglikan yaitu terdiri atas fosfolipid (lapisan dalam) dan lipopolisakarida (lapisan luar).

Identifikasi mikroskopi pada bakteri selanjutnya adalah pewarnaan endospora. Hasil dari pewarnaan endospora adalah 1 dari 5 isolat bakteri yaitu B.90.2 memiliki endospora yang ditunjukkan dengan adanya warna hijau saat diamati di bawah mikroskop. Sementara, pada 4 isolat bakteri dengan kode B.45.1; B.90.1; B.90.3; dan B.90.4 tidak memiliki endospora. Fungsi endospora bagi bakteri adalah untuk melindungi bakteri dari keadaan lingkungan yang ekstrim seperti pemanasan, kering, dan kondisi asam. Bakteri yang mempunyai endospora

bersifat lebih tahan terhadap pengaruh luar daripada bakteri yang tidak berspora. Endospora berbentuk sangat padat karena mempunyai sedikit kandungan air (Madigan *et al.*, 2019).

Tabel 4. Hasil Uji Biokimiawi Bakteri

No.	Kode Isolat	Motilitas	Kebutuhan Oksigen	Katalase	Hidrolisis Pati	CMC	Sitrat
1.	B.45.1	-	Anaerob	-	-	-	-
2.	B.90.1	-	Anaerob	-	-	-	-
3.	B.90.2	-	Anaerob	-	-	-	-
4.	B.90.3	-	Anaerob	-	-	-	-
5.	B.90.4	-	Fakultatif anaerob	+	-	-	-

Keterangan: + (Positif); - (Negatif)

Identifikasi fisiologis pada isolat bakteri dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui sifat fisiologis bakteri dengan cara uji biokimiawi bakteri. Uji biokimiawi yang dilakukan meliputi uji motilitas, uji katalase, uji hidrolisis pati, uji CMC, uji penggunaan sitrat, dan uji fermentasi karbohidrat.

Uji motilitas bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya alat gerak pada bakteri. Uji motilitas ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) tegak. Dari hasil uji motilitas seluruh isolat bakteri bersifat non motil yang ditunjukkan dengan pertumbuhan tidak menyebar dan hanya tumbuh berupa satu garis bekas tusukan (Tabel 4). Pergerakan bakteri motil ditandai dengan adanya alat gerak bakteri tersebut berupa flagella atau *gliding motility*, sementara itu pada bakteri non motil tidak memiliki flagella atau *gliding motility* (Damayanti dkk., 2020).

Berdasarkan hasil pengamatan, kebutuhan oksigen dari isolat bakteri ekoenzim dengan kode B.45.1; B.90.1; B.90.2; B.90.3 adalah anaerob. Isolat bakteri dengan kode B.90.4 memiliki kebutuhan oksigen fakultatif anaerob. Media *Nutrient Broth* (NB) termasuk ke dalam media umum yang digunakan untuk menumbuhkan biakan secara general (Wahyuningsih & Zulaikha, 2019). Kebutuhan oksigen pada bakteri menunjukkan bagaimana bakteri tersebut dalam memenuhi kebutuhan energinya. Ketersediaan oksigen dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Berdasarkan kebutuhan oksigennya, bakteri diklasifikasikan menjadi tiga kelompok yaitu bakteri aerob merupakan bakteri yang membutuhkan oksigen dalam pertumbuhannya. Bakteri anaerob adalah bakteri yang dapat hidup tanpa keberadaan oksigen. Bakteri fakultatif anaerob merupakan bakteri yang dapat tumbuh jika terdapat oksigen maupun tanpa adanya oksigen (Dwijoseputro, 2018).

Uji katalase digunakan untuk mengetahui kelompok bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase. Berdasarkan hasil pengamatan, terdapat 1 isolat bakteri dengan kode B.90.4

yang positif menghasilkan enzim katalase. Sedangkan 4 isolat bakteri lainnya menunjukkan hasil negatif. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas pada isolat bakteri setelah ditetesi H₂O₂ 30%. Katalase merupakan enzim yang dapat mengkatalisis penguraian hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi H₂O (air) dan O₂ (oksigen). Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel bakteri karena dapat menonaktifkan enzim dalam sel dan sangat berbahaya bagi sel bakteri itu sendiri (Panjaitan dkk., 2020). Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang hidup pada lingkungan aerob pasti menguraikan bahan tersebut (Cappucino & Sherman, 2014).

Uji hidrolisis pati bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolisis pati dengan cara menghasilkan enzim amilase. Berdasarkan hasil pengamatan, seluruh isolat bakteri menunjukkan hasil negatif (Tabel 4). Hasil positif ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Sementara, hasil negatif tidak membentuk zona bening di sekitar koloni (Gambar 12). Pati merupakan polisakarida yang mempunyai berat molekul yang tinggi, dikarenakan ukurannya yang besar, polisakarida tidak mampu diserap oleh membran sel. Zona bening menunjukkan bahwa bakteri mampu menghidrolisis pati atau amilum menjadi gula sederhana (Cappucino & Sherman, 2014).

Uji *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) digunakan untuk mengetahui aktivitas bakteri terhadap selulosa. Menurut hasil pengamatan, seluruh isolat bakteri dengan kode menunjukkan hasil negatif (Tabel 4). Hasil positif ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni setelah ditetesi larutan indikator *Congo Red* 1% kemudian dibilas dengan larutan NaCl 1%. Sedangkan hasil negatif, jika tidak terbentuk zona bening di sekitar koloni bakteri. Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang mampu menghasilkan selulase yang menghidrolisis selulosa menjadi produk yang lebih sederhana yakni glukosa (Baharuddin dkk., 2010). Aktivitas selulolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media pertumbuhan bakteri. Besarnya zona bening yang dihasilkan disebabkan oleh kemampuan masing-masing isolat bakteri dalam menghasilkan enzim selulase. Hal ini disebabkan antara Congo Red dan selulosa mempunyai ikatan kovalen (Mushoffa, 2012).

Uji sitrat digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber energi. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, seluruh isolat bakteri dengan menunjukkan hasil negatif. Reaksi positif ditandai dengan adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Sedangkan, reaksi negatif ditunjukkan dengan tidak terjadi

perubahan warna pada media. Sitrat adalah salah satu komponen utama pada siklus Krebs yang merupakan hasil reaksi antara asetil koenzim A (CoA) dengan asam oksaloasetat (4C). Sitrat dibuat oleh enzim sitrase yang menghasilkan asam oksaloasetat dan asetat kemudian melalui proses enzimatik diubah menjadi asam piruvat dan karbon dioksida (Syauqi, 2017). Media yang digunakan untuk uji sitrat ialah *Simmons Citrate Agar* yang merupakan medium sintetik dengan Na sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon, NH_4^+ sebagai sumber N dan *bromthymol blue* sebagai indikator pH (Cappucino & Sherman, 2014).

Tabel 5. Hasil Uji Fermentasi Karbohidrat Isolat Bakteri

No.	Kode Isolat	Glukosa		Maltosa		Laktosa	
		Asam	Gas	Asam	Gas	Asam	Gas
1.	B.45.1	+	-	+	-	+	-
2.	B.90.1	+	-	+	-	+	-
3.	B.90.2	+	-	+	-	+	-
4.	B.90.3	+	-	+	-	+	-
5.	B.90.4	+	-	+	-	+	-

Keterangan: + (Positif); - (Negatif)

Uji fermentasi karbohidrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasikan beberapa jenis karbohidrat diantaranya glukosa, maltosa, dan laktosa. Pada penelitian ini, dilakukan 3 macam uji karbohidrat yaitu glukosa, maltosa, dan laktosa yang didapatkan hasil pada semua uji karbohidrat, seluruh isolat bakteri yang menunjukkan reaksi positif dalam memfermentasikan karbohidrat dengan sifat asam. Tidak dihasilkan gelembung gas di tabung durham pada semua isolat bakteri. Warna kuning yang terbentuk disebabkan pada saat melakukan metabolisme akan menghasilkan asam sehingga menurunkan pH pada media. Bakteri pada umumnya memfermentasikan sumber gula sederhana dan ketika sumber karbon sederhana tidak tersedia, maka bakteri akan memfermentasikan sumber karbon lebih kompleks. Energi yang dihasilkan dari fermentasi gula oleh bakteri akan membentuk asam piruvat dan asam asetat, disertai oleh gelembung gas CO_2 pada media (Apriani, 2015).

Tabel 6. Morfologi Koloni Isolat Kapang

No.	Karakter	K.45.2	K.90.1	K.45.1
		<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Mycelia sterillia</i>
1	Warna permukaan	Hijau, putih	Hijau, putih	Putih
2	Warna sebalik	Kuning, putih	Kuning, putih	Putih
3	Tekstur	Granula	Karpet	Kapas
4	Permukaan	Cembung	Cembung	Cembung
5	<i>Radial furrow</i>	-	+	-
6	<i>Growing zone</i>	-	+	-
7	Zonasi	+	+	-
8	Eksudat	-	-	-

Keterangan: + (Ada) – (Tidak Ada)

Identifikasi pada kapang meliputi morfologi koloni dan morfologi sel kapang. Identifikasi morfologi koloni pada kapang diinokulasikan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) plate yang masing-masing memiliki karakteristik morfologi koloni yang berbeda-beda. Pengamatan morfologi koloni kapang meliputi warna permukaan koloni, warna sebalik koloni, tekstur koloni, jenis permukaan koloni, *radial furrow*, zonasi, *growing zone*, dan ada tidaknya *exudate drops* (Roisah, 2017). Pengamatan morfologi sel pada kapang dilakukan dengan metode *slide culture* meliputi pengamatan ada atau tidaknya sekat pada hifa, jenis alat reproduksi yang dimiliki, warna spora atau konidianya ada tidaknya alat tambahan (rhizoid, sel kaki), dan ada tidaknya percabangan konidiofora atau sporangiofora (Sundari, 2012). Hasil pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis isolat kapang selanjutnya diidentifikasi menggunakan metode *profile matching* dengan membandingkan karakter morfologi koloni dan morfologi sel pada buku literatur identifikasi kapang diantaranya Pengenalan Kapang Tropik Umum (Gandjar, 2000) dan jurnal penelitian terkait. Kapang yang berhasil diisolasi dari sampel ekonzim berjumlah 3 isolat yang diidentifikasi menjadi 3 genus yang berbeda dengan deskripsinya sebagai berikut.

Tabel 7. Morfologi Koloni Yeast

No.	Karakter	Y.90.1
		<i>Saccharomyces</i>
1	Warna	Putih
2	Bentuk	Round
3	Tepi	Entire
4	Elevasi	Flat
5	Permukaan	Mengkilap, halus, lembab

Identifikasi pada *yeast* meliputi morfologi koloni dan morfologi sel *yeast*. Identifikasi morfologi koloni pada *yeast* dengan diinokulasikan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) plate. Pengamatan morfologi koloni pada *yeast* meliputi bentuk, warna, tepi, elevasi, dan permukaan koloni (Kreger, 1987; dalam Widiastutik, 2014). Sedangkan pengamatan sel *yeast* berupa bentuk, ukuran sel, dan *budding* (pertunasan) (Kreger, 1987; dalam Widiastutik, 2014). Pengamatan morfologi sel *yeast* menggunakan bantuan pewarna *methylene blue*. Pemberian pewarna *methylene blue* dilakukan untuk membedakan sel *yeast* yang hidup dan yang mati. Berdasarkan penelitian yang dilakukan, terdapat 1 isolat *yeast* yang berhasil diisolasi dari sampel ekoenzim dan diduga merupakan genus *Saccharomyces*.

Data yang dihasilkan berdistribusi normal dan homogen. Oleh karena itu, pengolahan data dapat dilanjutkan ke uji *One-Way* Anova. Tujuan dari pengujian Anova satu arah adalah untuk mengetahui apakah ada pengaruh dari kriteria yang diuji terhadap hasil yang diinginkan (Furqon, 2009). Dari output uji *one-way* anova dengan taraf signifikansi 5%, didapatkan nilai signifikansi $0.00 < 0.05$ dan F hitung sebesar 125,866 serta F tabel sebesar 2,82 sehingga F hitung $>$ F tabel yang artinya H1 diterima, maka terdapat pengaruh lama fermentasi terhadap jumlah mikroorganisme yang ada pada ekoenzim (Tabel 8). Interaksi antar perlakuan lama fermentasi dan faktor pengenceran berbeda secara signifikan karena memiliki nilai signifikansi $0.00 < 0.05$ (Tabel 8). R Squared merupakan nilai determinasi berganda semua variabel independen/bebas dan dependen/terikat. Berdasarkan output *one-way* anova, nilai R Squared adalah 0.972 dimana nilai tersebut mendekati 1, yang artinya lama fermentasi memiliki korelasi yang kuat dengan jumlah mikroorganisme. Hasil uji *one-way* anova dengan perlakuan lama fermentasi dan penambahan lerak adalah berpengaruh nyata terhadap jumlah mikroorganisme.

Tabel 9. Uji Tukey TPC Mikroorganisme pada Faktor Pengenceran 10^{-6}

No.	Sampel Ekoenzim	TPC Mikroorganisme
1	P 45	341 ^a
2	P 90	175 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom menunjukkan perbedaan secara nyata ($P < 0,05$).

Berdasarkan output pengujian Tukey dengan aplikasi statistik diperoleh tiap sampel ekoenzim dengan faktor pengenceran 10^{-6} memiliki perbedaan yang nyata ditunjukkan dengan huruf di belakang angka pada kolom tidak sama. Nilai tertinggi *Total Plate Count* (TPC) mikroorganisme adalah sampel dengan lama fermentasi 45 hari dengan nilai 341, sehingga dapat diketahui bahwa lama fermentasi 45 hari menghasilkan mikroorganisme dengan jumlah

yang optimum. Berdasarkan tabel 9, seiring dengan bertambahnya lama fermentasi, *total plate count* (TPC) mikroorganisme berkurang. Hal ini sejalan dengan literatur Purwasasmita (2009), yang menyatakan bahwa lama fermentasi berhubungan dengan waktu logaritmik yang dimiliki oleh mikroorganisme untuk berada dalam jumlah yang banyak dalam merombak glukosa menjadi etanol. Proses fermentasi yang lama menyebabkan jumlah nutrisi dan cadangan energi berkurang karena dimanfaatkan oleh mikroorganisme didalamnya. Hal ini dapat menyebabkan penurunan laju pertumbuhan mikroorganisme yang pada akhirnya dapat mengakibatkan kematian pada sel mikroorganisme tersebut. Selain itu, produk hasil metabolisme berupa asam organik seperti asam laktat, asam piruvat, asam asetat dan produk samping dari proses fermentasi anaerobik berupa CO₂ dan alkohol dapat menjadi toksik bagi mikroorganisme itu sendiri (Yuliana, 2008).

Pembahasan

Identifikasi Mikroorganisme

Penelitian ini melakukan identifikasi fisiologis dan morfologi pada isolat bakteri dan kapang. Uji biokimiawi seperti uji motilitas, katalase, dan fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mengetahui sifat fisiologis bakteri. Hasil menunjukkan bahwa seluruh isolat bakteri bersifat non-motil, yang berarti tidak memiliki alat gerak seperti flagella.

Karakteristik Kapang dan Yeast

Identifikasi morfologi sel pada kapang dan yeast dilakukan melalui pewarnaan gram dan metode slide culture. Karakter yang diamati meliputi warna, bentuk, dan struktur sel, yang memberikan informasi penting tentang jenis mikroorganisme yang terlibat dalam proses fermentasi

Pengaruh Lama Fermentasi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama fermentasi berpengaruh terhadap jumlah MOL. Seiring bertambahnya waktu fermentasi, jumlah MOL mengalami penurunan, terutama saat memasuki fase kematian. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun fermentasi awal dapat meningkatkan jumlah mikroorganisme, kondisi lingkungan yang tidak mendukung pada fase akhir dapat menyebabkan penurunan jumlah tersebut

Uji Sitrat dan Enzim

Uji sitrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat

sebagai sumber energi. Hasil menunjukkan bahwa seluruh isolat bakteri memberikan hasil negatif, yang berarti tidak dapat menggunakan sitrat. Ini penting untuk memahami potensi bakteri dalam proses fermentasi dan produksi enzim

Relevansi Penelitian

Penelitian ini relevan dalam konteks pengelolaan limbah organik, yang merupakan masalah serius di Indonesia. Dengan memanfaatkan limbah buah dan sayur untuk menghasilkan ekoenzim, penelitian ini memberikan alternatif yang berkelanjutan dan ramah lingkungan dalam pengelolaan limbah

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan mengenai pengaruh lama fermentasi terhadap keberadaan mikroorganisme lokal (MOL) pada ekoenzim, dapat disimpulkan bahwa:

1. Lama fermentasi berpengaruh terhadap keberadaan mikroorganisme lokal (MOL) pada ekoenzim. Semakin lama waktu fermentasi, maka jumlah mikroorganisme lokal (MOL) semakin berkurang. Hal tersebut dikarenakan pada hari ke-45 mikroorganisme berada pada awal fase stasioner sedangkan pada hari ke-90 mikroorganisme memasuki fase kematian.
2. Dari hasil identifikasi morfologi koloni, morfologi sel, dan sifat fisiologis yang diisolasi dari sampel ekoenzim hari ke-45 didapatkan jumlah mikroorganisme $2,57 \times 10^8$ cfu/gr (Bakteri) dan $1,78 \times 10^6$ cfu/gr (Kapang/*Yeast*) dengan genus yang ditemukan *Cellulomonas* (Bakteri), *Aspergillus* dan *Mycellia sterillia* (Kapang). Pada hari ke-90 didapatkan jumlah mikroorganisme $1,22 \times 10^8$ cfu/gr (Bakteri) dan $1,75 \times 10^6$ cfu/gr (Kapang/*Yeast*) dengan genus yang ditemukan adalah *Megasphaera*, *Lactobacillus* (Bakteri), *Penicillium* (Kapang), dan *Saccharomyces* (*Yeast*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ir. Suhartini, M.S. selaku dosen pembimbing Tugas Akhir Skripsi dan sebagai payung penelitian serta pihak yang turut membantu keberhasilan penelitian dan penyusunan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

Baharuddin, Razak, Hock, Ahmad, Aziz, Rahman, Shah, Hassan, Sakai dan Shirai. (2010).
Isolasi and Characterization of Thermophilic Cellulase-Producing Bacteria from

- Empty Bunches-Palm Oil Mill Effluent Compost. *Journal of Applied Science*. Vol.7(1): 56-62.
- Destyana Larasati, Andari Puji Astuti, Endang Triwahyuni Maharani. (2020). Uji Organoleptik Produk Eco-Enzyme Dari Limbah Kulit Buah (Studi Kasus Di Kota Semarang. *Seminar Nasional Edusainstek*, FMIPA UNIMUS. ISBN :978-602-5614-35-4.
- Cappuccino, JG. dan Sherman, N. (2014). *Manual Laboratorium Mikrobiologi Edisi Kedelapan*. Alih Bahasa: Nur Miftahurrahman. Jakarta: EGC.
- Fitriani A.A. (2015). *Evaluasi Penggunaan Antibiotik Pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 Dengan Komplikasi Foot Ulcer Di Instalasi Rawat Inap Rsup Dr. Soeradji Tirtonegoro Tahun 2014*. Skripsi. Surakarta: Fakultas Farmasi, ed., Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Furqon. (2009). *Statistika Terapan untuk Penelitian*. Bandung: Alfabeta.
- Indriyanti, D. R., Banowati, E., & Margunani, M. (2015). Pengolahan Limbah Organik Sampah Pasar Menjadi Kompos. *Jurnal Abdimas*, 19 (1), 25526.
- Irianto, K. (2013). *Mikrobiologi Menguak Dunia Mikroorganisme Jilid 1*. Bandung: Yrama Widya.
- Kusuma, G. P. A. W., Nocianitri, K. A., & Pratiwi, I. D. P. K. (2020). Pengaruh lama fermentasi terhadap karakteristik Fermented Rice Drink sebagai minuman probiotik dengann isolat *Lactobacillus* sp. F213. *Jurnal Itepa*, 9(2), 181-192.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms (15th ed.)*. Malaysia: Perason Education.
- Mardalena. (2016). Fase pertumbuhan isolat bakteri asam laktat (BAL) tempoyak asal jambi yang disimpan pada suhu kamar. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia* 11(1): 58-66. Fakultas Peternakan Universitas Jambi.
- Mushoffa. (2012). *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik dari Feses Kambing*. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Panudju, T. I. (2011). *Pedoman Teknis Pengembangan Rumah Kompos Tahun Anggaran 2011*. Jakarta: Direktorat Perluasan dan Pengelolaan Lahan, Direktorat Jenderal Prasarana Dan Sarana Pertanian Kementerian Pertanian.
- Rahayu, Sri, and F Tamtomo. (2017). Efektivitas Mikro Organisme Lokal (MOL) dalam Meningkatkan Kualitas Kompos, Produksi dan Efisiensi Pemupukan N, P, K Pada Tanaman Ubi Jalar (*Ipomea batatas* L. *Jurnal AGROSAINS* 13(2)., L. (2013). *Teknologi Fermentasi*. Edisi 2. Yogyakarta: Graha Ilmu.

- Roisah, M K. (2017). *Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi Kapang Kontaminan pada Kultur in Vitro Bambu Dendrocalamus asper, Gigantochloa apus, dan Schizostachyum iraten di PT Bambu Nusa Verde Tebonan, Harjobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta.* Yogyakarta: FMIPA UNY.
- Sabdaningsih, A., Budiharjo, A., & Kusdiyantini, E. (2013). Isolasi dan karakterisasi morfologi koloni bakteri asosiasi alga merah (Rhodophyta) dari perairan Kutuh Bali. *Jurnal Akademika Biologi*, 2(2), 11-17.
- Sundari, S. (2012). Suatu Model Pengembangan Media Pembelajaran Slide Culture untuk Pengamatan Struktur Mikroskopis Kapang pada Matakuliah Mycologi. *Jurnal Bioedukasi*, 1(1), 39–47.
- Suprihatin. (2010). *Teknologi Fermentasi*. Surabaya: UNESA Press.
- Syauqi, A. (2017). *Mikrobiologi Lingkungan: Peranan Mikroorganisme dalam Kehidupan*. Yogyakarta: Andi.
- Wahyuningsih, N., & Zulaika, E. (2019). Perbandingan Pertumbuhan Bakteri Selulolitik pada Media Nutrient Broth dan Carboxy Methyl Cellulose. *Jurnal sains dan Seni ITS*, 7(2), 36-38.
- Widiastutik, N., & Alami, N. H. (2014). Isolasi dan Identifikasi Yeast dari Rhizosfer *Rhizophora mucronata* Wonorejo. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 3(1), 11–16. <https://databoks.katadata.co.id/datapublish/2019/11/01/komposisi-sampah-di-indonesia-didominasi-sampah-organik> (Diakses pada 6 Februari 2022 pukul 19.47 WIB).