

**LAPORAN AKHIR TAHUN
HASIL PENELITIAN HIBAH INTERNAL**



**ISOLASI DAN PENAPISAN BAKTERI SELULOLITIK DARI
BERBAGAI JENIS TANAH SEBAGAI PENGHASIL ENZIM
SELULASE**

Tahun Ke -1 dari Rencana 1 Tahun

TIM PENELITI

Seprianto, S.Pi, M.Si

(0309098702)



**UNIVERSITAS ESA UNGGUL
OKTOBER 2017**

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Isolasi dan Penapisan Bakteri Selulolitik dari Berbagai Jenis Tanah Sebagai Penghasil Enzim Selulase.
2. Ketua Peneliti
 - a. Nama lengkap dengan gelar : Seprianto, S.Pi, M.Si
 - b. Pangkat/Gol/NIDN : 0309098702
 - c. Jabatan Fungsional/Struktural :-
 - d. Pengalaman penelitian : (terlampir dalam CV)
 - e. Program Studi/Jurusan : Bioteknologi
 - f. Fakultas : Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan
 - g. Alamat Rumah/HP : Jl. Ks Tubun Petamburan 3 Rt/Rw 001/03 No. 30 Kel. Petamburan Kec. Tanah Abang Jakarta Pusat/ 08568942269
 - i. E-mail : seprianto@esaunggul.ac.id
3. Jumlah Tim Peneliti : 1 Orang
4. Lokasi Penelitian : Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia PAU IPB
5. Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 1 tahun
6. Biaya Penelitian : Rp 24.000.000 (Dua Puluh Empat Juta Rupiah)

Jakarta, 27 Oktober 2017

Mengetahui
Dekan Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan


(Dr. Aprillita Rina Yanti Eff., M.Biomed., Apt.)

NIK. 215020572

Peneliti


(Seprianto, S.Pi, M.Si)

NIK. 217090707

Menyetujui,

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Universitas Esa Unggul


(Dr. Hasyim, SE., ME., M.Ed.)

NIK. 0201040164

RINGKASAN

SEPRIANTO. Isolasi dan Penapisan Bakteri Selulolitik dari Berbagai Jenis Tanah Sebagai Penghasil Enzim Selulase.

Enzim selulase merupakan suatu protein yang terdiri dari 434 residu asam amino. Enzim ini dapat menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik pada molekul selulosa sehingga menghasilkan glukosa. Pemanfaatan enzim selulase saat ini semakin meningkat dalam dunia industri makanan, industri kertas, industri detergen dan industri pertanian. Enzim selulase pada umumnya diproduksi oleh mikroba selulolitik baik dari kapang maupun bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan spesies bakteri selulolitik yang potensial menghasilkan enzim selulase dan melihat aktivitas enzim hariannya serta menambah koleksi isolat bakteri dari biakan murni yang akan digunakan untuk penelitian selanjutnya.

Hasil penelitian menunjukkan penapisan bakteri selulolitik yang diisolasi dari berbagai jenis tanah, terpilih empat isolat bakteri yang baik dalam mendegradasi substrat CMC dengan ditandainya terbentuknya zona bening setelah ditambahkan Congo Red 0.1%. Isolat tersebut adalah isolat 2.3 yang diisolasi dari tanah comberan, isolat 10.1 dari tanah pembuangan sampah sedangkan 2 isolat lagi yaitu isolat 6.1 dan isolat 6.2 berasal dari tanah kandang ayam. Isolat 6.2 menunjukkan aktivitas lebih baik diantara yang lainnya dengan aktivitas enzim ekstrak kasar harian tertinggi terjadi pada hari terakhir (ke-11) dengan nilai 0,01897019 $\mu\text{mol}/\text{menit}$ dan aktivitas enzim selulase terendah pada hari kedelapan yaitu sebesar -0,130683529 $\mu\text{mol}/\text{menit}$, sedangkan kadar protein terlarut tertinggi terjadi pada hari kelima dengan nilai 0,408240784 mg/ml dan kadar protein terendah pada hari ke-1 sebesar 0,167673552 mg/ml . Aktivitas enzim spesifik tertinggi terjadi pada hari ke-11 dengan nilai 0,053867 U/mg , sedangkan aktivitas enzim spesifik terendah pada hari kedelapan dengan nilai -0,45383 U/mg . Beberapa aktivitas enzim spesifik isolat 6.2 menunjukkan tanda minus yang berarti tidak ada aktivitas enzim (aktivitas nol)

Kata Kunci : Isolasi, Penapisan, Bakteri selulolitik, Enzim Selulase,



PRAKARTA

Puji dan syukur penulis sampaikan kepada Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dengan judul “Isolasi dan Penapisan Bakteri Selulolitik dari Berbagai Jenis Tanah Sebagai Penghasil Enzim Selulase”. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Terima kasih penulis ucapkan kepada teman – teman Pasca Sarjana Bioteknologi 2013 Institut Pertanian Bogor yang telah banyak membantu dalam penelitian ini dan terkhusus kepada Ibu Dewi selaku laboran yang telah membantu dalam penyediaan bahan serta alat selama penelitian. Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang terlibat atas segala bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan penelitian ini. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penyusunan laporan ini. Penulis mengharapkan adanya saran dan kritik yang bersifat membangun dan semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Jakarta, Oktober 2017



DAFTAR ISI

Isi	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
PRAKARTA	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Karakteristik Bakteri Selulolitik	3
2.2. Enzim Selulase.....	3
2.3. Selulosa.....	5
III. TUJUAN DAN MANFAAT	6
IV. METODE PENELITIAN	7
4.1. Waktu dan Tempat	7
4.2. Bahan dan Alat	7
4.3. Prosedur Penelitian	7
4.3.1. Pengambilan Sampel dan Isolasi Bakteri	7
4.3.2. Pengamatan Morfologi dan Inokulasi Bakteri	8
4.3.3. Penapisan Bakteri Selulolitik dengan Pewarnaan Congoed 1%.....	8
4.3.4. Menghitung Nilai Indek Potensial Bakteri Terpilih	8
4.3.5. Peremajaan dan Pengkulturan Bakteri Terpilih	8
4.3.6. Pengukuran Harian Aktivitas Enzim Selulase Ekstrak Kasar	9
4.3.7. Pembuatan Kurva Standar Glukosa	9
V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	11
5.1. Hasil.....	11
5.2. Luaran yang dicapai	20
VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	21
VII. KESIMPULAN DAN SARAN	22
7.1 Kesimpulan.....	22
7.2 Saran	22
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Konsentrasi glukosa untuk pembuatan kurva standar glukosa.....	9
2. Hasil pengamatan koloni bakteri yang diisolasi pada media agar.....	11
3. Hasil pengukuran indeks potensial isolat bakteri selulolitik.....	14
4. Hasil pengukuran aktivitas enzim selulase harian isolat 6.2.....	15
5. Hasil pengukuran kadar protein terlarut Isolat 6.2.....	17
6. Aktivitas spesifik enzim selulase Isolat 6.2.....	19

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Proses pemecahan selulosa menjadi glukosa oleh enzim selulase kompleks.....	5
2. Koloni bakteri pada media agar CMC padat.....	12
3. Zona bening isolat bakteri setelah pewarnaan congoed 0.1 %	13
4 Kultur isolat 6.2 dalam media CMC cair.....	15
5. Aktivitas enzim ekstrak kasar selulase isolat 6.2.....	16
6 Kadar protein terlarut isolat 6.2 berdasarkan panen harian.....	18
7. Aktivitas enzim spesifik isolat 6.2.....	20

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kurva Standar Glukosa	25
2. Kurva Standar Protein.....	26

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Indonesia adalah negara yang kaya akan mikroorganisme yang memberikan manfaat bagi manusia terutama pemanfaatan untuk memproduksi bahan – bahan yang bernilai ekonomis salah satunya adalah enzim (Dali, 2009). Penggalan potensi mikroorganisme sebagai penghasil enzim (*enzym biosprospecting*) merupakan salah satu kegiatan yang penting dalam penelitian dibidang mikrobiologi dan enzimologi (Oetomo, 2012). Enzim pada umumnya selain dapat diperoleh dari mikroorganisme juga terdapat pada tumbuhan dan hewan. Akan tetapi, mikroorganisme merupakan yang paling banyak menghasilkan dan dimanfaatkan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Hal ini dikarenakan pertumbuhannya yang cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, serta lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik. Mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim baik dari jenis kapang dan bakteri (Akhdiya, 2003)

Tanah merupakan material yang dipenuhi oleh unsur hara yang diperoleh dari guguran daun (serasah) dan ranting-ranting akibat pelapukan serta material bahan organik lainnya membuat tanah menjadi subur. Serasah ini diduga sebagai substrat bagi bakteri yang mempunyai enzim selulase (Meryandini *et al.*, 2009). Tanah yang subur diindikasikan populasi mikroorganisme melimpah karena banyaknya sumber energi dari reduksi senyawa-senyawa organik yang dibutuhkan oleh mikroorganisme tersebut. Jenis tanah yang beragam serta kandungan unsur hara yang berbeda-beda menjadikan karakteristik mikroorganisme yang tumbuh didalamnya juga beragam serta enzim yang dihasilkan juga mempunyai karakteristik yang berbeda – beda. Salah satu enzim yang banyak dihasilkan oleh bakteri tanah adalah enzim selulase.

Selulase adalah enzim yang sebagian besar diproduksi oleh mikroorganisme antara lain kelompok bakteri maupun jamur. Pemanfaatan enzim selulase saat ini semakin meningkat dalam kegiatan industri makanan, kertas, detergen, dan industri pertanian. Pemanfaatan serasah yang ada di tanah masih dapat dimanfaatkan menjadi produk yang bernilai ekonomis. Kompos merupakan produk yang berasal dari dekomposisi limbah organik yang mengandung selulosa dengan bantuan enzim selulase yang dimiliki oleh bakteri selulolitik (Alam *et al.*, 2013). Berbagai sumber limbah selulosa seperti *vermicomposting* tandan kosong kelapa sawit (Azizah, 2013) dan sampel tanah hutan yang kaya akan serasah

tumbuhan dimanfaatkan oleh bakteri selulolitik dalam mendekomposisi bahan organik (Ashwani *et al.*, 2014).

Beberapa spesies bakteri selulolitik dilaporkan berasal dari tanah antara lain *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Bacilli*, dan beberapa *actinomycetes* (Lederberg, 2014). *Bacillus pumilis*, *lichniformis Bacillus*, *Paenibacillus dendritiformis*, *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri hasil isolasi ampas tebu yang berpotensi sebagai bakteri selulolitik dan etanologenik untuk menghasilkan etanol yang berperan dalam bidang bioenergi (Chaudhary *et al.*, 2015)

Penapisan bakteri selulolitik sebagai bakteri penghasil selulase dari berbagai jenis tanah menjadi sangat penting untuk mendapat kandidat bakteri selulolitik dengan karakteristik enzim selulase yang baik. Penelitian yang berkaitan tentang skrining bakteri selulolitik dan karakterisasi enzim selulase yang dihasilkan sudah banyak dilakukan sebelumnya, namun hanya pada jenis tanah tertentu saja. Akan tetapi, dalam penelitian ini sampel tanah yang diambil berasal dari berbagai sumber yaitu dari tanah bawah kayu lapuk, tanah comberan, tanah perkebunan, tanah disekitar kandang ayam, tanah disekitar kandang sapi, tanah kebun pisang, dan tanah pembuangan sampah. Penapisan dilakukan dengan mengisolasi bakteri selulolitik dari tanah tersebut dengan tujuan untuk memisahkan atau memindahkan mikroba tertentu dari lingkungan, sehingga diperoleh biakkan murni yang potensial menghasilkan enzim selulase dengan melakukan pengujian aktivitas enzimnya dan dari isolat terpilih tersebut nantinya akan dikembangkan ketahanan produksi dalam skala yang lebih besar.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakterisasi Bakteri Selulolitik

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang dapat menghidrolisis kompleks selulosa menjadi oligosakarida yang lebih kecil dan akhirnya menjadi glukosa. Glukosa tersebut digunakan sebagai sumber nutrisi dan karbon bagi pertumbuhan organisme ini. Bakteri selulolitik mensintesis seperangkat enzim yang dapat menghidrolisis selulosa. Enzim tersebut adalah enzim selulase. Mikroba dapat mensintesis enzim selulase selama tumbuh pada media selulosa (Ibrahim dan Al diwany, 2007)

Bakteri selulolitik dari kelompok bakteri memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi selulase menjadi lebih pendek. Selain itu, tingkat variasi genetik kelompok bakteri sangat beragam sehingga memungkinkan dilakukan rekayasa genetik untuk optimasi produksi maupun aktivitas selulasenya (Alam *et al.* 2004). Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim yang berdeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan.

Beberapa bakteri selulolitik termofilik telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi. Ibrahim dan Al diwany (2007) melaporkan telah mengisolasi bakteri selulolitik termofilik yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 75 °C dari kawah air panas Egyptian, pantai Laut Merah. Fikrinda (2000), mengisolasi bakteri selulolitik yang mampu tumbuh pada suhu 60-70°C dari ekosistem air hitam Kalimantan Tengah. Secara alami, bakteri dapat menghidrolisis selulosa baik secara aerob maupun anaerob, akan tetapi tidak dapat secara kedua-duanya. Bakteri selulolitik anaerob hanya tumbuh pada sumber selulosa dan produk hidrolitiknya. Bakteri ini tidak dapat tumbuh pada monosakarida, oligosakarida, dan polisakarida yang berasal dari gula lain selain glukosa. Bakteri selulolitik aerob dapat menggunakan sumber karbon lain di samping glukosa (Lynd *et al.*, 2002).

2.2 Enzim Selulase

Enzim selulase merupakan suatu protein yang terdiri dari 434 residu asam amino. Enzim ini memiliki beberapa sisi aktif yang terletak di beberapa bagian pada rantai protein tersebut. Sisi aktif enzim selulase antara lain pada glutamat 212, aspartat 214, glutamat 217, histidin 228, glutamat 295. Enzim selulase dapat diproduksi dari mikroba selulolitik baik kapang maupun bakteri. Kapang selulolitik yang biasa digunakan dari jenis *Trichoderma*, *Aspergillus*, dan *Penicillium*. Sedangkan bakteri yang pada umumnya menghasilkan selulase

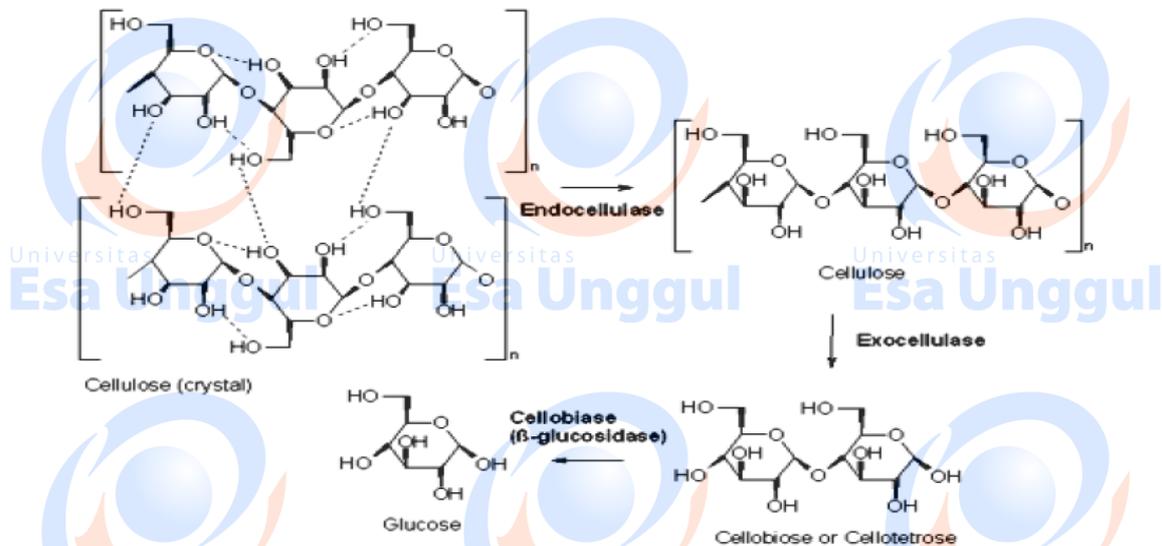
adalah *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Cellovibrio*, dan *Sporosphytophaga* (Lynd *et al.*, 2002).

Enzim selulase menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik pada molekul selulosa sehingga menghasilkan glukosa (Afsahi *et al.*, 2007). Enzim ini umumnya digunakan dalam berbagai industri seperti teknologi pangan, tekstil, pakan ternak, kertas, pertanian, dan dalam pengembangan penelitian. Selulase dapat diaplikasikan juga untuk memperhalus bubur kertas pada industri kertas, menjaga warna kain agar tetap cemerlang pada industri tekstil, meningkatkan kualitas pada industri pangan, sebagai dekomposer bahan - bahan organik, meningkatkan nutrisi pakan ternak, berperan penting dalam biokonversi selulosa menjadi berbagai komoditas senyawa kimia dan dapat mengurangi dampak negatif dari polusi limbah terhadap lingkungan (Hartanti, 2010)

Sel hidup dapat mensintesis zat yang bersifat sebagai biokatalisator yaitu enzim. Enzim selulase dapat mempercepat proses suatu reaksi tanpa mempengaruhi hasilnya. Menurut Zhang *et al* (2006), terdapat tiga tipe dari aktivitas enzim selulase pada bakteri. Komponen dari sistem selulase pertama diklasifikasikan berdasarkan pada model aksi katalitiknya dan saat sekarang diklasifikasikan berdasarkan sifat strukturalnya. Tiga tipe utama dari aktivitas enzimatik yang ditemukan yaitu:

- ✓ Endoglucanase yaitu Enzim endo- β -1,4 glukonase, memiliki nama sistimatik β -1,4-D-Glukanohidrolase (EC. 3.2.1.4). Enzim ini menghidrolisis ikatan glikosidik β -1,4 secara acak dan bekerja terutama pada daerah amorf dari serat selulosa, seperti pada Carboxy Methyl Cellulose (CMC).
- ✓ Exoglukonase terdiri dari (a) Enzim β -1,4-D-Glukan Selobiohidrolase (EC.3.2.1.91), menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan selobiosa. (b) Enzim β -1,4-D-Glukan Glukohidrolase (EC.3.2.1.74), menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan D-glukosa.
- ✓ Enzim β -1,4-Glukosidase dengan nama sistimatik β -1,4-Glukosida Glukohidrolase (EC.3.2.1.21), menghidrolisis selobiosa dan rantai pendek selo-oligosakarida dan menghasilkan D-glukosa

Ketiga enzim tersebut bekerja secara sinergis mendegradasi selulosa dan melepaskan gula reduksi (glukosa) sebagai produk akhirnya. Reaksi pemecahan selulosa menjadi glukosa, selengkapnya disajikan pada Gambar 1



Gambar 1. Proses pemecahan selulosa menjadi glukosa oleh enzim selulase kompleks (Lynd *et al.*, 2002)

2.3 Selulosa

Selulosa merupakan komponen struktural tumbuhan yang tidak dapat dicerna oleh manusia dengan rumus molekul $(C_6H_{10}O_5)_n$. Salah satu jenis polisakarida karbohidrat dari β -glukosa adalah selulosa. Tumbuhan berkayu dan berserat yang sangat melimpah di alam banyak mengandung selulosa. Karbohidrat utama yang disintesis oleh tanaman adalah selulosa dan menempati hampir 60% komponen penyusun struktur tanaman (Salma dan Gunarto, 1999). Ujung polimer (eksoselulase) atau kepingan polimer selulase dapat memecah molekul glukosa menjadi molekul yang lebih kecil melalui pencernaan internal (endoselulase).

Selulosa di alam banyak ditemukan sebagai selulosa natif yang masih berikatan dengan senyawa lainnya seperti lignin dan selulosa. Selulosa dapat dijadikan serbuk bahkan dimurnikan dengan derajat kristalinitas tinggi seperti avisel. Avisel merupakan selulosa mikrokristal yang banyak dimanfaatkan dalam industri farmasi terutama sebagai pengikat pada proses pembuatan tablet cetak langsung. Avisel bersifat sukar larut dibandingkan dengan serbuk selulosa. Selulosa adalah suatu homopolimer rantai lurus yang disusun oleh unit β -glukosa, dua molekul β -glukosa digabungkan melalui suatu ikatan 1,4 untuk membentuk β -selobiosa. Molekul selulosa adalah polimer sederhana rantai lurus yang terdiri dari 1000-10.000 unit selobiosa yang saling bergabung melalui ikatan 1,4- β -glukosidik (Fogarty dan Kelly, 1990)

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan dan sasaran

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan spesies bakteri selulolitik yang potensial menghasilkan enzim selulase dan melihat aktivitas enzim hariannya serta menambah koleksi isolat bakteri dari biakan murni yang akan digunakan untuk penelitian selanjutnya.

3.2. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini dapat dijadikan sebagai acuan penelitian lanjutan tentang pemanfaatan isolat terpilih untuk memproduksi enzim selulase serta mengkararakteristik enzim tersebut.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli – Oktober 2017 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor

4.2. Bahan dan Alat

Sampel tanah yang digunakan yang berasal dari dari tanah bawah kayu lapuk, tanah comberan, tanah perkebunan, tanah disekitar kandang ayam, tanah disekitar kandang sapi, tanah kebun pisang, dan tanah pembuangan sampah di lingkungan sekitar Institut Pertanian Bogor. Bahan yang digunakan media agar CMCA, NaCl Fisiologis, pewarna congoed 0,1% dalam alkohol 96%, media CMC 1%, larutan asam dinitrosalisilat (DNS), larutan standar glukosa, larutan standar BSA untuk pengukuran kadar protein, pereaksi Bradford, aquades dan alkohol 70%.

Adapun alat-alat yang digunakan adalah Spektrofotometer, *Lamina Air flow*, *water bath*, autoclave, inkubator, erlenmeyer, sentrifuge, hotplate, aluminium foil, mortal dan alu, plastik, vortex mixer, batang L, slides, cawan petri, neraca ohaus, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kapas, glass spreader, jarum ose, lampu busen, freezer, waterbath, mikropipet, oven pengering, mikropipet, tip, kamera digital, *cuvette*, pompa dispenser larutan DNS, penggaris, kelereng, dan stopwatch.

4.3. Prosedur Penelitian

4.3.1. Pengambilan Sampel dan Isolasi Bakteri

Sampel tanah diambil 1 gr kemudian dihaluskan dengan menambahkan 10 ml larutan fisiologis NaCl menggunakan mortal didekat nyala api busen untuk mencegah kontaminasi hingga bercampur homogen. Pengenceran dilakukan bertingkat (perbandingan 1 : 9) dengan menambahkan 9 ml larutan NaCl fisiologis pada 1 ml sampel yang digerus untuk mendapatkan pengenceran 10^{-1} . Dari pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi dengan larutan NaCl fisiologis sebanyak 9 ml. Hal ini dilakukan sampai taraf pada pengenceran 10^{-5} , sebelum diambil 1 ml vortex terlebih dahulu untuk menghomogenkan sampel. Kemudian ambil 1 ml sampel dari masing-masing tabung 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} untuk mengkulturkan bakteri sampel pada masing-masing

cawan petri yang berisi media agar, kemudian sampel disebar dengan menggunakan batang penyebar dan diinkubasi selama 24 – 48 jam pada suhu ruang.

4.3.2. Pengamatan Morfologi dan Inokulasi Bakteri

Mengamati koloni bakteri yang tumbuh pada media padat dengan mengamati koloni bakteri beserta ciri-ciri koloni yang meliputi warna koloni, bentuk tepi koloni, dan bentuk koloni. Mencatat jumlah total koloni tunggal bakteri dan menginokulasi pada media baru untuk mendapatkan biakan murni

4.3.3. Penyeleksian Bakteri Selulolitik dengan Pewarna Congored 1%

Koloni yang diambil dengan metode goresan, benar-benar koloni tunggal yang merupakan goresan pengenceran kedua atau ketiga. Koloni terpilih dipindahkan pada media agar miring dengan menggunakan jarum ose dalam kondisi aseptis. Inkubasi selama 24 – 48 jam pada suhu ruang. Totolkan isolat terpilih pada media CMC pada bagian tengah untuk melihat kemampuan bakteri untuk mendegradasi enzim selulase dengan terbentuknya zona bening pada media yang diinkubasi selama 48 jam dengan memberi larutan congored 0.1 % dalam alkohol 96% selama 15 menit, kemudian mencucinya dengan NaCl 0.2 M sebanyak 3 kali. Setelah diinkubasi selama 48 jam, bakteri yang mampu menguraikan enzim selulase akan membentuk zona bening pada pinggiran koloni.

4.3.4. Menghitung Nilai Indeks Potensial Bakteri Terseleksi

Mengamati dan menghitung rata-rata diameter koloni bakteri dan zona bening, kemudian menghitung nilai indeks potensial.

$$\text{Ø Koloni bakteri} = (d_1 + d_2) / 2$$

$$\text{Ø Koloni zona bening} = (D_1 + D_2) / 2$$

$$\text{Nilai Indeks Potensial} = \frac{\text{Ø Koloni zona bening} - \text{Ø Koloni bakteri}}$$

$$\text{Ø Koloni bakteri}$$

4.3.5. Peremajaan dan Pengkulturan Bakteri Terpilih

Peremajaan isolat bakteri terseleksi dilakukan pada media agar CMC miring, koloni bakteri dari media agar miring diinokulasikan pada media CMC cawan petri dengan cara menggores penuh pada setengah bagian media. Isolat bakteri disimpan dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 24 jam. Setelah inkubasi selama 24 jam, Isolat bakteri disubkultur dengan cara mengambil 3 *cockborer* kultur bakteri dari media agar CMC dan menginokulasikan pada media cair CMC 25 ml di dalam erlenmeyer 250 ml, inokulasi isolat dilakukan dalam *safety*

cabinet Laminar air flow, isolat yang disubkulturkan kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan dishaker pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Diambil sebanyak 10 ml yang selanjutnya dimasukkan ke dalam media cair CMC 100 ml dalam erlenmeyer 250 ml. Volume subkultur yang dimasukkan ke dalam media produksi sebesar 1 ml (10^6 sel/ml).

4.3.6. Pengukuran Harian Aktivitas Enzim Selulase Ekstrak Kasar

. Proses pengukuran aktivitas enzim harian dengan mengambil 5 ml kultur isolat bakteri yang telah ditumbuhkan pada media cair CMC 100 ml. Pengambilan kultur bakteri dengan mikropipet dilakukan secara aseptis pada lamina *air flow*, masukan ke dalam tabung sentrifuse. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit. Sebanyak 0,5 ml supernatannya untuk mengukur aktivitas enzim dan kadar protein terlarut dalam enzim ekstrak kasar. Tambahkan 0,5 CMC 1% kemudian vortek dan inkubasi pada suhu ruang selama 60 menit . Tambahkan 1 ml DNS, kemudian panaskan pada suhu 100^0 C selama 15 menit. Sampel diinginkan dan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Prosedur kerja dari sampel, kontrol dan blanko dilakukan secara bersamaan. Pengukuran aktivitas enzim selulase harian dilakukan selama 11 hari.

4.4.7. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa adalah membuat larutan stok glukosa, 1 gram (1000 mg) glukosa dilarutkan dalam 100 ml H₂O steril, berarti dalam 1 ml stok larutan mengandung 10 mg glukosa, yang diperlukan dalam membuat kurva standar glukosa adalah konsentrasi 1 mg/ml glukosa, sehingga 100 µl larutan stok diencerkan dengan 900 µl H₂O steril. Pembuatan kurva standar menggunakan pengenceran bertingkat seperti yang terdapat pada Tabel

Tabel 1. Konsentrasi glukosa untuk pembuatan kurva standar glukosa

Tabung	Kosentrasi (mg/ml)	Stok yang dipipet (ml)	H ₂ O steril (ml)
1	0.00	0	2
2	0.05	0.1	1.9
3	0.1	0.2	1.8
4	0.15	0.3	1.7
5	0.2	0.4	1.6
6	0.25	0.5	1.5
7	0.3	0.6	1.4

Pada masing-masing larutan glukosa murni dalam tabung reaksi ditambahkan 2 ml pereaksi DNS setiap tabungnya. Larutan divortex untuk membuat larutan homogen, kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit (gunakan *stopwatch*). Setelah itu diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Kurva standar dibuat dengan memplotkan data konsentrasi glukosa pada sumbu X dan data absorbansinya pada sumbu Y.



BAB V
HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil

5.1.1. Penapisan Bakteri Selulolitik

Sampel tanah yang diambil untuk isolasi bakteri selulolitik bersumber dari berbagai jenis tanah diantara bawah kayu lapuk, tanah comberan, tanah perkebunan, tanah rawa, tanah disekitar kandang ayam, tanah disekitar kandang sapi, tanah kebun pisang, tanah serasah, tanah kebun karet dan tanah pembuangan sampah. Dasar pengambilan jenis tanah yang berbeda agar didapatkan karagaman bakteri dengan karakteristik enzim selulase yang berbeda

Hasil isolasi bakteri tanah diperoleh dengan metode pengenceran bertingkat yang diambil beberapa koloni tunggal dari pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Penentuan besarnya atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel (Hadioetomo, 1993). Hasil pengamatan morfologi dari semua koloni tumbuh pada media CMCA (*Carboxymethylcellulase Agar*) yang merupakan media selektif untuk bakteri selulolitik meliputi jumlah koloni, warna koloni, tepian koloni serta bentuk koloni (Tabel 2)

Tabel 2. Hasil pengamatan koloni bakteri yang diisolasi pada media agar

Pengenceran	Σ Koloni	Ciri-ciri morfologi koloni		
		Warna/ Jumlah	Tepian	Bentuk
10^{-3}	121	Putih susu (8) Kuning (2) Cream (111)	Entire Undulate Filiform	Circular (94) Irreguler (25) Filamentos (2)
10^{-4}	81	Putih susu (8) Kuning (1) Putih (3) Cream (69)	Entire Undulate Filiform	Circular (56) Irreguler (22) Filamentos (3)
10^{-5}	20	Cream (16) Putih susu (3) Putih (1)	Entire Undulate	Circulate (16) Irreguler (4)

Penampakan koloni bakteri pada media agar menunjukkan warna, bentuk dan tepian koloni yang berbeda (Gambar 2). Perbedaan warna koloni terjadi karena pigmen intraseluler

yang dihasilkan oleh bakteri. Tepian koloni pada cawan agar dapat berupa tepian licin, tak beraturan, bergerigi dan berombak (Cappicino dan Sherman, 2005).



Gambar 2. Koloni bakteri pada media agar CMC padat

Koloni tunggal dijadikan sebagai isolat terpilih untuk dilanjutkan pada proses selanjutnya. Pemurnian dilakukan dengan metode gores (*streak plate*) menggunakan *loop ose* dan menggoreskannya ke permukaan medium agar CMC yang baru dengan pola tertentu dengan harapan pada ujung goresan, hanya sel-sel bakteri tunggal yang terlepas dari ose dan menempel ke medium. Sel-sel bakteri tunggal ini akan membentuk koloni tunggal yang kemudian dapat dipindahkan ke medium selanjutnya agar didapatkan biakan murni.

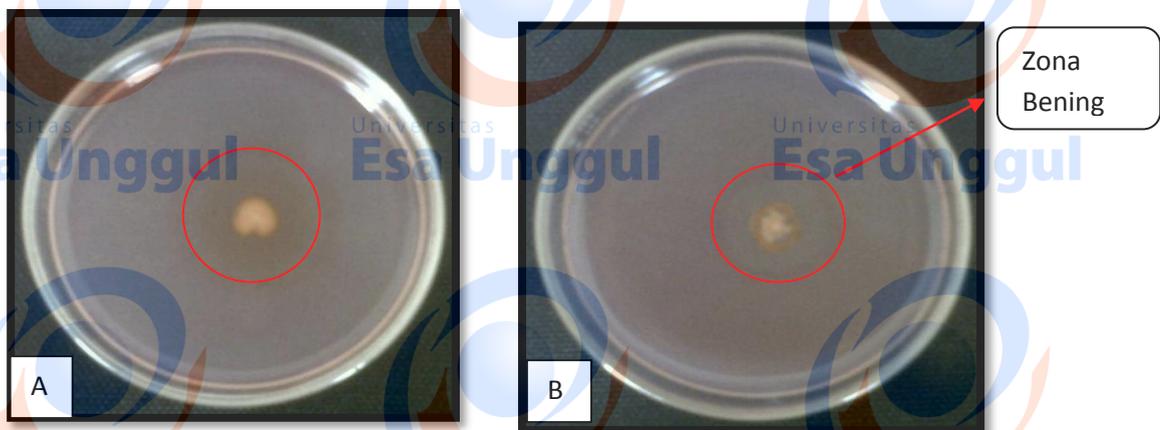
Metode gores yang digunakan adalah metode gores kuadran (*Streak quadrant*). Prinsip metode ini yaitu mendapatkan koloni yang benar-benar terpisah dari koloni yang lain, sehingga mempermudah proses isolasi. Cara ini dilakukan dengan membagi cawan petri menjadi 4 bagian. Ose steril yang telah disiapkan dilekatkan pada sumber isolat, kemudian menggoreskan ose tersebut pada cawan berisi media agar CMC. Daerah 1 merupakan goresan awal sehingga masih mengandung banyak sel bakteri, goresan selanjutnya disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal. Jadi goresan dilakukan 4 kali membentuk garis horizontal di satu sisi cawan. Langkah ini dilanjutkan hingga keempat sisi cawan tergores, kemudian menginkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Memindahkan isolat bakteri terpilih yang tumbuh di kuadran 3 atau kuadran 4. Satu koloni bakteri dipindahkan dengan menggunakan ose aseptis didekat nyala api bunsen, ujung ose bulat yang mengambil bakteri digoreskan pada media agar miring CMC. Medium agar miring adalah medium yang dibuat dalam tabung reaksi yang diletakan miring pada waktu pendinginan. (Hadioetomo, 1993)

Teknik inokulasi pada media agar miring, setiap perlakuan diusahakan dilakukan secara aseptis berfungsi agar saat inokulasi, bahan dan alat yang digunakan digunakan tetap steril. Inokulum bakteri digoreskan di permukaan media agar CMC miring di dalam tabung

reaksi yang telah disediakan menggunakan metode gores mulai dari samping arah zig-zag. (Pelczar, 1994). Arah zig-zag digunakan supaya memungkinkan koloni terbentuk tersebar merata dan tampak jelas serta tidak bertumpuk dari koloni yang akan terbentuk. Panaskan sekeliling mulut tabung dan segera di tutup dengan sumbat kapas berfungsi untuk mensterilisasi tabung reaksi dan biakan dari mikroorganisme lain. Inokulum disimpan dalam inkubator agar medium dapat tumbuh pada wadah yang steril pada suhu 37 °C sebagai suhu optimum bakteri untuk tumbuh, menginkubasinya selama empat hari. Inokulum bakteri yang telah ditumbuhkan dan diinkubasi tersebut kemudian akan dipindahkan dari media agar miring ke cawan petri berisi media CMC dengan membagi 3 kuadran, 1 kuadran berisi 1 jenis bakteri. Pengambilan 1 koloni bakteri selalu dilakukan secara aseptis.

5.1.2. Pengukuran Zona Bening dan Indeks Potensial pada Isolat Terseleksi

Penapisan secara cepat mikroba selulolitik dapat dilakukan dengan pengukuran zona bening (*clear zone*). Pengukuran diameter setiap koloni bakteri, pengukuran diameter 1 (D1) + diameter 2 (D2) kemudian dibagi 2. Setelah didapatkan rata-rata diameter koloni bakteri selanjutnya pada media ditambahkan congored 0.1 % dalam alkohol 96% selama 15 menit, kemudian mencucinya dengan NaCl 3M sebanyak 3 kali. Menyimpan koloni bakteri yang telah dicuci dalam kulkas selama 2x24 jam pada suhu 4°C. Dari sekian banyak isolat yang diperoleh, terpilih empat isolat bakteri yang baik dalam mendegradasi substrat CMC dengan ditandainya terbentuknya zona bening pada media CMC yang telah ditambahkan congored 0.1%. Isolat tersebut adalah isolat 2.3 yang diisolasi dari tanah comberan, isolat 10.1 dari tanah hasil pembuangan sampah sedang kan 2 isolat lagi yaitu isolat 6.1 dan isolat 6.2 berasal dari tanah kandang ayam (Gambar 3)



Gambar 3. Zona bening isolat bakteri setelah pewarnaan congored 0.1 % (A). Isolat 6.1 (B) isolat 6.2

Gambar 3 menunjukkan isolat 6.1 dan isolat 6.2 membentuk zona bening pada media CMC setelah ditambahkan *congo red* 0.1%. Adanya zona bening ini diakibatkan oleh proses degradasi selulosa oleh bakteri selulolitik. Selulosa yang terhidrolisis pada medium agar jika digenangi oleh *congo red* akan menghasilkan zona jernih karena *congo red* tidak dapat berikatan dengan medium tanpa adanya ikatan β -1,4-glikosidik yang terkandung dalam polimer selulosa, hal ini disebabkan karena adanya enzim selulase sehingga ikatan polimer selulosa ini terhidrolisis (Jo *et al.*, 2011). Pembilasan dengan NaCl akan melunturkan *congo red* terutama di daerah sekitar koloni yang mengandung turunan selulase yang terhidrolisis seperti selodekstrin, selobiosa dan glukosa karena *congo red* tidak terikat secara kuat sehingga terlihat zona bening. Aktivitas CMC-ase koloni bakteri selulolitik pada media agar CMC membentuk zona bening disekitar koloni. Umumnya bakteri yang diketahui dapat menghasilkan xilanase (Ardiningsih, 2002). Berikut hasil indek potensial masing masing isolat terseleksi disajikan pada Tabel 3

Tabel 3. Hasil pengukuran indeks potensial isolat bakteri selulolitik

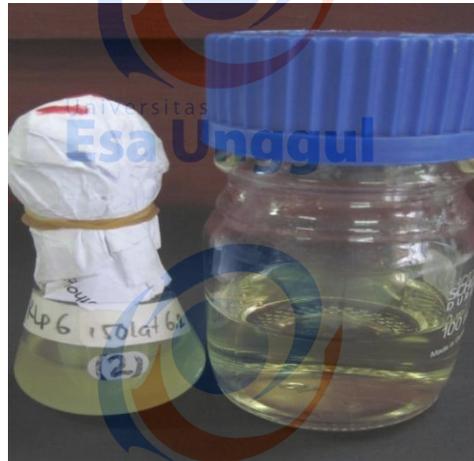
Isolat Bakteri	Diameter koloni bakteri (cm)	Diameter zona bening (cm)	Nilai Indeks Potensial
2.3	0.75	1.85	1.47
6.1	0.75	2.00	1.67
6.2	0.75	1.50	1
10.1	0.75	1.40	0.88

Zona bening dapat diukur berdasarkan indeks potensial (IP) yaitu perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni. Adanya indeks potensial ini menunjukkan bahwa adanya enzim selluase ekstraseluler yang dihasilkan dari isolat bakteri. Hasil Perhitungan diperoleh Indeks potensial selulase dari isolat koloni bakteri 6.2 sebesar 1 dengan diameter zona bening 1.50 cm dan diameter koloni 0.75 cm. Namun indeks potensial yang paling baik terdapat pada isolat 6.1 dengan indeks potensial 1.67 dengan diameter zona bening 2 cm dan diameter koloni 0.75 cm. Namun isolat 6.2 memiliki zona bening lebih terang dan lebih jelas dibandingkan dengan yang lainnya, artinya proses dedgradasi selulosa oleh isolat 6.2 lebih sempurna.

5.1.3. Pengukuran Aktivitas Enzim Ektrak Kasar (EEK) Harian

Pembuatan kurva standar glukosa dengan perhitungan kadar glukosa sebagai produk dari reaksi enzim selulase terhadap substrat CMC (Lampiran 1). Kultur isolat bakteri 6.2

dalam media CMC cair 100 ml dalam erlenmeyer 250 ml yang telah diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam akan diukur aktivitas enzim hariannya selama 11 hari berturut-turut (Gambar 4)..



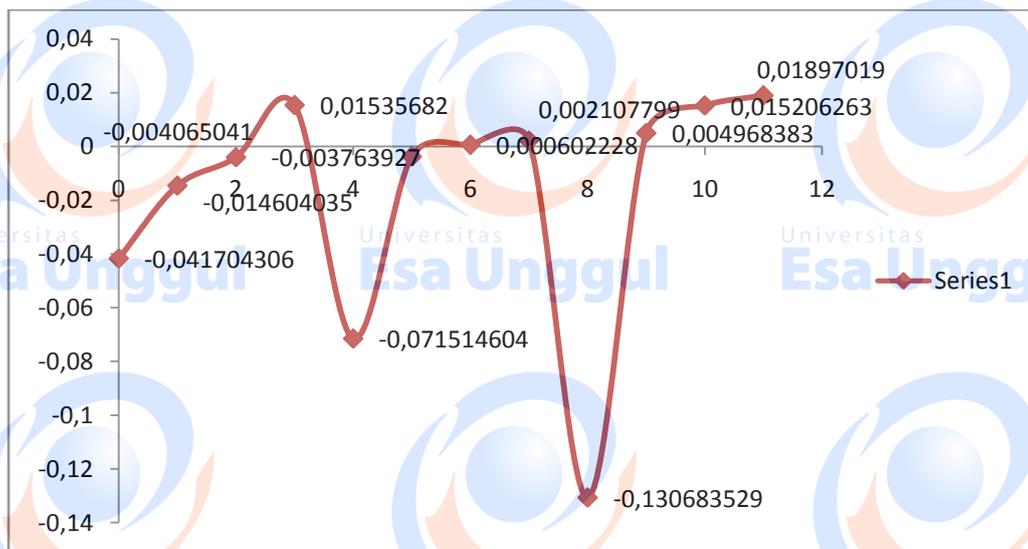
Gambar 4. Kultur isolat 6.2 dalam media CMC cair

Pengukuran dilakukan pada waktu yang sama setiap harinya yaitu sekitar pukul 12.00 WIB. Enzim ekstrak kasar didapatkan dari dalam media produksi CMC cair diambil sebanyak 5 ml, Pemisahan supernatan (enzim ekstrak kasar) dengan endapan/pelet yang mengandung sel-sel bakteri dengan teknik sentrifugasi. Hasil pengukuran Pengukuran aktivitas enzim harian dilakukan sebanyak 3 kali ulangan dengan disertakan pengukuran secara bersamaan terhadap kontrol dan blangko disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengukuran aktivitas enzim selulase harian isolat 6.2

Hari	Unit aktivitas ($\mu\text{mol}/\text{menit}$)	nKAT
1	-0,0417	-0,695211
2	-0,0146	-0,243449
3	-0,00407	-0,067764
4	0,015357	0,255998
5	-0,07151	-1,192148
6	-0,00376	-0,062745
7	0,000602	0,010039
8	0,002108	0,035137
9	-0,13068	-2,178494
10	0,004968	0,082823
11	0,015206	0,253488

Berdasarkan hasil dari Tabel 4 dapat dilihat secara nyata fluktuatif aktivitas enzim ekstrak kasar selulase dari hari pertama sampai hari kesebelas pada grafik di bawah ini (Gambar 5).



Gambar 5. Aktivitas enzim ekstrak kasar selulase isolat 6.2

Berdasarkan data hasil pengukuran aktivitas enzim selulase harian Isolat 6.2, dapat dilihat aktivitas enzim ekstrak kasar yang naik turun (fluktuasi). Namun aktivitas enzim ini cukup baik karena aktivitas tertinggi terjadi pada hari terakhir (kesebelas) dengan nilai 0,018970 $\mu\text{mol}/\text{menit}$, sedangkan aktivitas enzim selulase terendah pada hari kedelapan - 0,130684 $\mu\text{mol}/\text{menit}$. Aktivitas enzim yang menunjukkan tanda minus (-) berarti tidak ada aktivitas enzim selulase yang menghidrolisis substrat CMC menjadi glukosa. Uraian diatas juga konsisten dengan pengukuran aktivitas CMC-ase yang dilakukan seperti ditunjukkan pada Tabel 4. Hari ke-2 selulase belum diproduksi oleh bakteri tersebut karena bakteri masih pada fase adaptasi, namun pada hari ke-3 terdapat aktivitas sebesar 0,015357 $\mu\text{mol}/\text{menit}$. Setelah fase ini terlampaui maka hari ke-4 terjadi penurunan kembali. Aktivitas CMC-se terekspresi dengan baik atau dapat dikatakan bahwa produksi sistem selulase optimum pada hari ke-11. Penurunan yang sangat tajam pada hari ke-8 diduga karena sumber karbon telah berkurang sehingga selulase yang diproduksi juga menurun. Hasil pengukuran yang bervariasi juga dipengaruhi heterogenitas fisik selulosa pada substrat dan kompleksitas selulase sehingga menghasilkan uji aktivitas yang fluktuatif (Lynd *et al*, 2005)

Aktivitas CMC-ase dan aviselase ditentukan menurut metode Haggett *et al.* (1979) dengan modifikasi dimana satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang menghasilkan 1 μmol glukosa per menit dalam kondisi esay, CMC-ase terhadap substrat CMC, sedangkan aviselase terhadap substrat Sigmacell 20 (Zhang *et al.*, 2006). Kadar glukosa ditentukan dengan DNS (dinitrosalisilat) dengan standard glukosa secara spektrofotometri pada λ optimum 540 nm (Jo *et al.*, 2011).

Enzim ekstrak kasar akan bekerja dengan cara bereaksi dengan molekul substrat, sehingga akan menghasilkan senyawa glukosa. Enzim selulase menghidrolisis ikatan glikosidik β -1,4, sehingga selulosa terurai menjadi glukosa (Lynd *et al.*, 2002). Semakin tinggi nilai absorbansi yang dihasilkan, semakin banyak pula gula pereduksi (glukosa) yang terkandung dalam sampel.

Metode penentuan komposisi gula reduksi dalam enzim ekstrak kasar selulase menggunakan pereaksi asam dinitro salisilat/3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). DNS merupakan senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya untuk membentuk 3-amino-5-nitrosalicylic acid, suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada 540 nm. Semakin banyak komponen pereduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul 3-amino-5-nitrosalicylic acid yang terbentuk dan mengakibatkan serapan semakin tinggi (Sazci *et al.*, 1986).

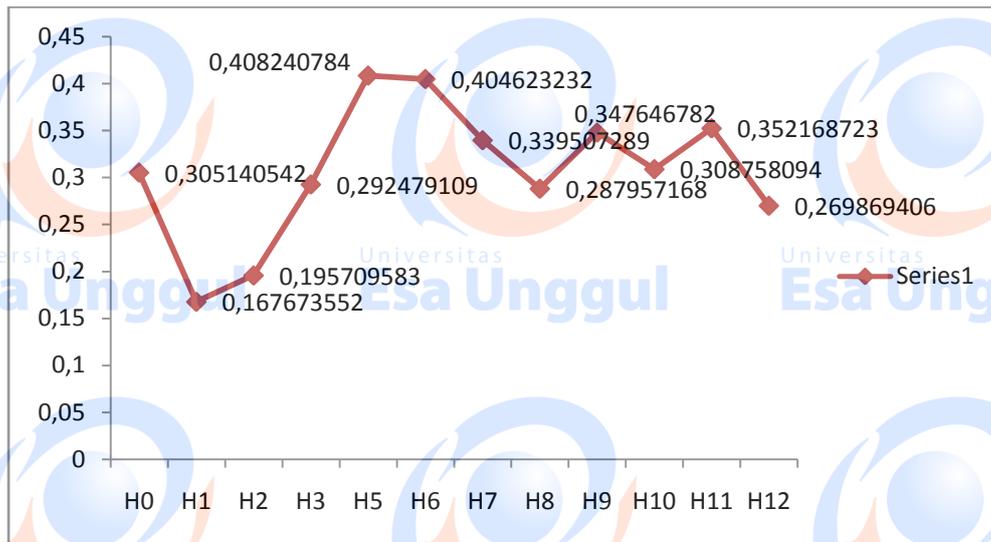
5.1.4. Pengukuran Kadar Protein Terlarut

Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar dengan persamaan $y = 2,764x + 0,020$ (Lampiran 2). Pengukuran kadar protein terlarut dimulai dengan mengambil masing-masing cairan supernatan/enzim ekstrak kasar setiap hari inkubasi dari Isolat 6.2 sebanyak 0,2 ml dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml pereaksi Bradford. Campuran dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm. Hasil pengukuran absorbansi kadar protein terlarut Isolat 6.2 disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengukuran kadar protein terlarut Isolat 6.2

Hari	Ulangan 1	Ulangan 2	Rata-rata	Blanko	Terkoreksi	Prot. Sampel ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Kadar Prot. (mg/ml)
H0	0,385	0,358	0,3715	0,16	0,189	0,061	0,305
H1	0,298	0,293	0,2955	0,16	0,113	0,034	0,168
H2	0,288	0,334	0,311	0,16	0,1285	0,039	0,196
H3	0,357	0,372	0,3645	0,16	0,182	0,058	0,292
H5	0,422	0,435	0,4285	0,16	0,246	0,082	0,408
H6	0,402	0,451	0,4265	0,16	0,244	0,081	0,405
H7	0,395	0,386	0,3905	0,16	0,208	0,068	0,340
H8	0,33	0,394	0,362	0,16	0,1795	0,058	0,288
H9	0,391	0,399	0,395	0,16	0,2125	0,070	0,348
H10	0,364	0,383	0,3735	0,16	0,191	0,062	0,309
H11	0,398	0,397	0,3975	0,16	0,215	0,070	0,352
H12	0,338	0,366	0,352	0,16	0,1695	0,054	0,270

Dari nilai absorbansi standar BSA. Pada hari ke-0 diperoleh absorbansi sampel adalah 0.385 (mg/ml) dan 0.358 (mg/ml) dari ekstrak enzim kasar yang diperoleh dari isolat 6.2. Dari nilai rata rata yang dimasukkan ke dalam persamaan regresi, maka rata-rata kadar proteinnya adalah 0.061 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dan disamakan satuan ke dalam protein terlarut menjadi 0.305 mg/ml larutan EEK. Berdasarkan data di atas dapat dilihat fluktuasi naik turunnya kadar protein terlarut pada grafik dibawah ini.



Gambar 6. Kadar protein terlarut isolat 6.2 berdasarkan panen harian

Berdasarkan data hasil pengukuran kadar protein terlarut harian Isolat 6.2 ,dapat dilihat data kadar protein yang fluktuasi (naik turun) terlihat pada grafik diatas. Kadar protein tertinggi terjadi pada hari kelima dengan nilai 0,408 mg/ml, sedangkan kadar protein terendah pada hari ke -1 sebesar 0,168 mg/ml. Peningkatan kadar protein antara hari ke-5 menunjukkan telah terjadi peningkatan jumlah sel. Hal ini diduga adalah fase adaptasi pertumbuhan bakteri. Menurut Lisdiyanti *et al.* (2012) fase adaptasi ditandai dengan kenaikan komponen makromolekul seperti protein. Sel mempersiapkan semua perangkat untuk berkembangbiakan selanjutnya termasuk mensintesis berbagai jenis enzim hidrolase ekstraselular (Brock *et al.* 1986). Sedangkan penurunan kadar protein pada hari ke-2 dan ke-8 tidak dapat dikatakan secara langsung bahwa jumlah sel menurun karena kadar protein hanya mencerminkan besarnya protein ekstraseluler yang dilepas bakteri tersebut

Penurunan kadar protein ini diduga karena dalam media pertumbuhannya yang miskin, media hanya mengandung mineral dan avicel, bakteri tersebut mendegradasi protein ekstraseluler yang tidak diperlukan seperti protease, lipase serta amilase dan hanya

mensintesis protein ekstraseluler yang dibutuhkan saja yaitu selulase. Pemikiran ini didukung oleh sifat ekspresi selulase yang harus diinduksi terlebih dahulu dalam media terbatas yang hanya mengandung sumber karbon selulosa (Susanti, 2012)

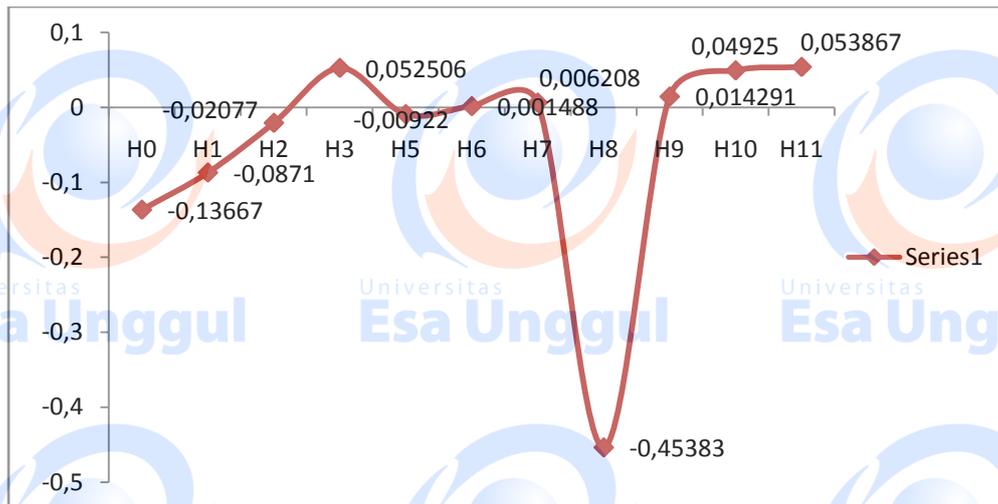
5.1.5. Aktivitas Spesifik Enzim Selulase

Berdasarkan hasil data aktivitas enzim selulase dan kadar protein terlarut, dapat ditentukan aktivitas spesifik enzim selulase. Aktivitas enzim spesifik merupakan rasio antara total aktivitas enzim selulase dengan total protein dalam satuan Unit/mg.

Tabel 6. Aktivitas spesifik enzim selulase Isolat 6.2

Waktu produksi (hari ke-)	Aktivitas enzim selulase (U/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik enzim selulase (U/mg)
H0	-0,0417043	0,305141	-0,13667
H1	-0,014604	0,167674	-0,0871
H2	-0,004065	0,19571	-0,02077
H3	0,01535682	0,292479	0,052506
H5	-0,0037639	0,408241	-0,00922
H6	0,00060223	0,404623	0,001488
H7	0,0021078	0,339507	0,006208
H8	-0,1306835	0,287957	-0,45383
H9	0,00496838	0,347647	0,014291
H10	0,01520626	0,308758	0,04925
H11	0,01897019	0,352169	0,053867

Berdasarkan data hasil pengukuran aktivitas enzim dan kadar protein terlarut harian Isolat 6.2 dapat ditentukan aktivitas spesifik yang dihasilkan oleh isolat 6.2. Data aktivitas spesifik terlihat pada Tabel 6. Aktivitas spesifik enzim tertinggi terjadi pada hari ke-11 dengan nilai 0,053867 U/mg, sedangkan aktivitas enzim spesifik terdapat pada hari kedelapan dengan nilai -0,45383 U/mg (Gambar 7). Untuk hari keempat tidak dilakukan pengujian dikarenakan sampel tidak ditemukan.



Gambar 7. Aktivitas enzim spesifik isolat 6.2

Gambar 7 menunjukkan aktivitas enzim selulase pada hari kedelapan terjadi penurunan yang sangat signifikan terhadap aktivitas enzim spesifik. Hal ini mengindikasikan kurangnya sumber karbon sebagai nutrisi oleh bakteri sehingga dapat mengganggu metabolismenya. Aktivitas juga menunjukkan grafik yang fluktuatif, selain ditentukan oleh jenis sumber enzim juga sangat ditentukan oleh komposisi medium dan konsentrasi substrat (Deswal *et al.*, 2011).

5.2. Luaran yang dicapai

Luaran penelitian ini adalah publikasi jurnal ilmiah nasional terakreditasi. Luaran lainnya dari penelitian ini adalah temuan spesies baru yang berpotensi sebagai probiotik yang akan dijadikan sebagai Hak Kekayaan Intelektual (HKI) sebagai temuan terbaru yang sebelumnya belum pernah diteliti dan dipublikasikan

BAB VI

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana tahapan penelitian berikutnya adalah:

- Memproduksi dan mengkarakterisasi serta pemurnian enzim selulase yang dihasilkan dari isolat 6.2.
- Identifikasi isolat 6.2 dengan teknik 16S rRNA
- Deteksi Gen penyandi enzim selulase menggunakan primer spesifik dengan metode PCR
- Mengkloning gen penyandi selulase ke dalam vektor kloning dan mengekspresikan gen penyandi selulase tersebut ke dalam *Escherichia coli*



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Penapisan bakteri selulolitik penghasil enzim selulase yang diisolasi dari berbagai jenis tanah, terpilih empat isolat bakteri yang baik dalam mendegradasi substrat CMCA dengan ditandainya terbentuknya zona bening (*clear zone*). Isolat tersebut adalah isolat 2.3 yang diisolasi dari tanah comberan, isolat 10.1 dari tanah pembuangan sampah sedangkan 2 isolat lagi yaitu isolat 6.1 dan isolat 6.2 berasal dari tanah kandang ayam. Isolat 6.2 menunjukkan aktivitas lebih baik diantara yang lainnya dengan aktivitas enzim ekstrak kasar harian tertinggi terjadi pada hari terakhir (ke-11) dengan nilai 0,01897019 $\mu\text{mol}/\text{menit}$ dan aktivitas enzim selulase terendah pada hari kedelapan yaitu sebesar -0,130683529, sedangkan kadar protein terlarut tertinggi terjadi pada hari kelima dengan nilai 0,408240784 mg/ml dan kadar protein terendah pada hari ke -1 sebesar 0,167673552 mg/ml. Aktivitas enzim spesifik tertinggi terjadi pada hari ke-11 dengan nilai 0,053867 U/mg, sedangkan aktivitas enzim spesifik terdapat pada hari kedelapan dengan nilai -0,45383 U/mg. Beberapa aktivitas enzim spesifik isolat 6.2 menunjukkan tanda minus yang berarti tidak ada aktivitas enzim (aktivitas enzim sama dengan nol).

5.2. Saran

Pengukuran aktivitas enzim selulase ekstrak kasar ditambahkan dengan beberapa variabel terutama suhu dan pH untuk melihat aktivitas optimum dari enzim tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

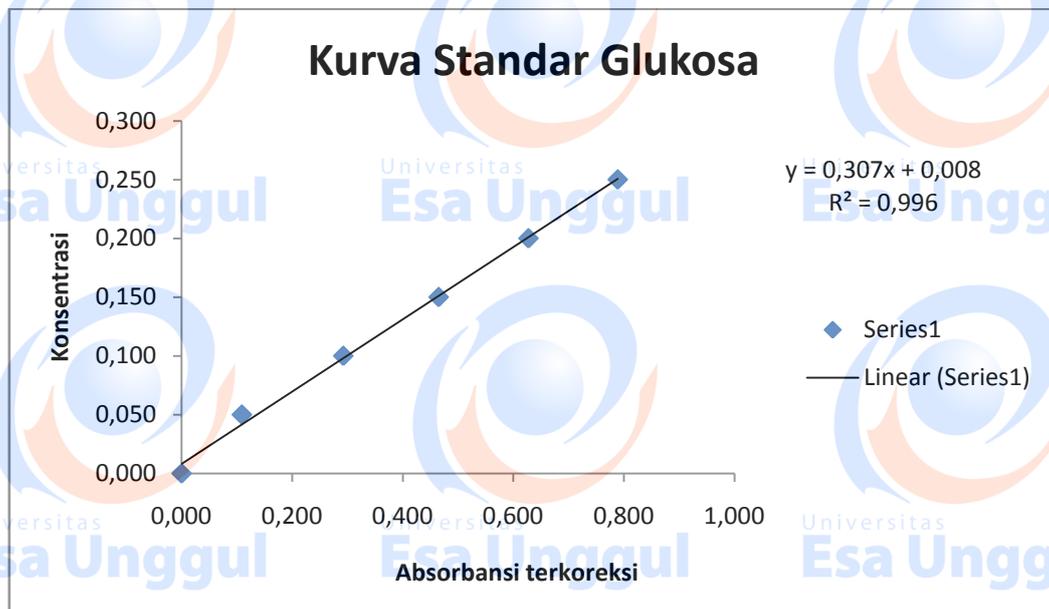
- Afsahi B, Kazemi A, Kheirrolomoom A, Nejati S. 2007. Immobilization of Cellulase on Non-Porous Ultrafine Silica Particles. *J. of Scientia Iranica*, 14(4): 379-383.
- Alam, MS., Sarjono, PR., Aminin, ALN. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Selulase dari Bakteri Selulolitik Termofilik Kompos Pertanian Desa Bayat, Klaten, Jawa Tengah. *Jurnal Sains dan Matematika*, 21(2): 48-53.
- Alam MZ, Manchur MA, Anwar MN. 2004. Isolation, purification, characterization of cellulolytic enzymes produced by *Streptomyces omiyaensis*. *J Biol Sci* 10:1647- 1653
- Akhdiya A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor
- Ardiningsih P. 2002. Produksi dan karakterisasi xilanase isolat dari rayap. Thesis. Program Pascasarjana UI, Depok, Jawa Barat
- Ashwani K, Saida L, Reddy KV. 2014. Isolation, Screening, and Characterization of Cellulolytic Bacteria from Forest Soil Sample. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(10): 679-685
- Azizah, SN. 2013. Skrining Bakteri Selulolitik Asal Vermicomposting Tandan Kosong Kelapa Sawit. Skripsi, Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Jember
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM and Parker J. 1986. *Biology of Microorganism*. Seventh Edition. New York: Prentice-Hall International, Inc
- Cappucino JG and Sherman N. 2005. *Microbiology : A Laboratory Manual International Edition 7th ed*. San Francisco: Pearson Education Inc., publishing as Benjamin Cummings
- Chaudhary N, Qazi JI, Irfan M. 2015. Isolation and Identification of Cellulolytic and Ethanologenic Bacteria from Soil. *Iranian Journal of Science and Technology Articles in Press*. [http:// ijsts.shirazu.ac.ir/article_3254.html](http://ijsts.shirazu.ac.ir/article_3254.html)
- Dali S. 2009. Karakterisasi Enzim Amilase dari Isolat Termofilik *Bacillus Subtilis*. *Jurnal Kimia*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA, Universitas Hasanuddin.
- Deswal D, Khasa YP, and Kuhad RC. 2011. Optimization of Cellulase Production by a Brown Rot Fungus *Fomitopsis sp.* RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresour. Technol.* 102: 6065–6072
- Fikrinda. 2000. Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil selulase ekstermofilik dari ekosistem air hitam [tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor
- Fogarty WM, Kelly CT. 1990. Recent advances in microbial amylases. In: Fogarty WM, Kelly CT, (eds). *Microbial enzymes and iotechnology*, London and New York, pp. 7-133
- Hadioetomo. RS. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. Jakarta: Gramedia
- Haggett D, Gray PP and Dunn NW. 1979. Crystalline Cellulose Degradation by a Strain of *Cellulomonas* and Its Mutant Derivatives. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 8, 183-190
- Hartanti, 2010. Isolasi dan Seleksi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Kawah Air Panas Gunung Pancar, Bogor. Skripsi FMIPA. Institut Pertanian Bogor, Bogor

- Ibrahim ASS and Al Dewany. 2007. Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4): 473-478
- Jo WS, Park HN, Cho DH, Yoo YB and Park SC. 2011. Optimal Media Conditions for the Detection of Extracellular Cellulase Activity in *Ganoderma neo-japonicum*. *Journal of Mycobiologi* 39(2): 129-132
- Lederberg, J. 2014. Encyclopedia of Microbiology, Four-Volume Set. New York: Academic Press
- Lisdiyanti P, Suyanto E, Gusmawati NF, and Rahayu W. 2012. Isolation and Characterization of Cellulase Produced by Cellulolytic Bacteria from Peat Soil of Ogan Komering Ilir, South Sumatera. *International Journal of Environment and Bioenergy*. 3(3): 145–153
- Lynd LR., Weimer PJ. van Zyl WH. Pretorius IS. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 506–77.
- Lynd LR , van Zyl WH , Mc Bride JE, Laser M .2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update . *Curr. Opin. Biotechnol.* 16 : 577 – 583
- Meryandini, A W. Widosari BB., Maranatha, TC., Sunarti, N. Rachmania, H. Satria. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Sains*, Vol. 13, No.1 April 2009: 33-38
- Oetomo EG. 2012. Karakterisasi Enzim dan Kloning Gen Penyandi Mananase dari *Bacillus subtilis* Asal Tempe. (Tesis). Sekolah pascasarjana Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor
- Pelczar MJ dan ECS Chan. 1994. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press
- Salma dan Gunarto. 1999. Enzim Selulase Dari *Trichoderma* spp. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. Vol. 2, No.2.
- Sazci A. Radforda A. and Erenler K. 1986. Detection of Cellulolytic Fungi by Using Congo red as an Indicator: a Comparative Study with The Dinitrosalicylic Acid Reagent Method. *Journal of Applied Bacteriology* 61. 559-562
- Susanti E. 2012. Production Optimization and Cellulose System Characterization of *Bacillus circulans* Local Strain Using Inducer Avicel. *Jurnal Ilmu Dasar*. Vol 12, No.1: 40-49
- Zhang Y-HP , Cui J-B , Lynd LR , Kuang LR .2006. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: Evidences from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure . *Biomacromolecules* 7: 644 – 648.

Lampiran 1
Kurva Standar Glukosa

Nilai Absorbansi Standar Glukosa

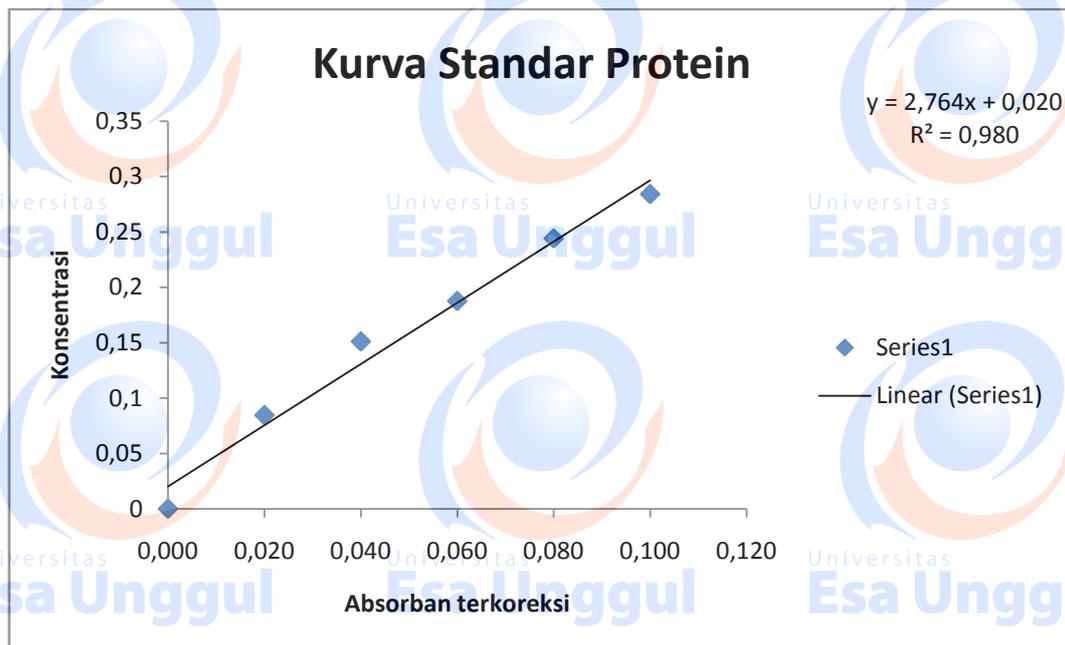
Konsentrasi (mg/ml)	Absorban 1	Absorban 2	Rata-rata	Absorban terkoreksi
0,000	0,113	0,113	0,113	0,000
0,050	0,221	0,223	0,222	0,109
0,100	0,392	0,419	0,406	0,293
0,150	0,579	0,577	0,578	0,465
0,200	0,737	0,744	0,741	0,628
0,250	0,904	0,900	0,902	0,789
0,300	0,95	1,066	1,008	0,895



Lampiran 2
Kurva Standar Protein

Nilai Absorbansi Standar Protein

Konsentrasi mg/ml	Absorban 1	Absorban 2	Rata-rata	Absorbansi terkoreksi
0,000	0,238	0,238	0,238	0
0,020	0,323	0,322	0,323	0,085
0,040	0,389	0,389	0,389	0,151
0,060	0,434	0,417	0,426	0,188
0,080	0,480	0,484	0,482	0,244
0,100	0,524	0,520	0,522	0,284



Biodata Peneliti

A. Identitas Diri

1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Seprianto, S.Pi, M.Si
2	Jenis Kelamin	L
3	Jabatan Fungsional	-
4	NIP/NIK/No. identitas lainnya	217090707/1471020909870022
5	NIDN	0309098702
6	Tempat dan Tanggal Lahir	Duku, 09 September 1987
7	E-mail	seprianto@esaunggul.ac.id
8	Nomor Telepon/HP	085213179687
9	Nama Institusi	Universitas Esa Unggul
9	Alamat Kantor	Jl Raya Arjuna no. 9 Kebun Jeruk Jakarta Barat
10	Nomor Telepon/Faks	021-5674223

B. Riwayat Pendidikan

Program:	S-1	S-2	S-3
Nama PT	Universitas Riau	Institut Pertanian Bogor	-
Bidang Ilmu	Ilmu Kelautan	Bioteknologi	-
Tahun Masuk-Lulus	2005-2010	2013-2016	-
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi	Isolasi dan identifikasi bakteri probiotik dari usus udang windu (<i>Peneus monodon</i>) dengan teknik sekuens 16S rDNA	Penapisan <i>Streptomyces</i> sp penghasil <i>Microbial Transglutaminase</i> dan pengklonan DNA penyandinya melalui konstruksi pustaka genom	
Nama Pembimbingan/Promotor	Prof. Dr. Feliatra, DEA	Prof. Dr. Suharsono, DEA	

C. Pengalaman Penelitian dalam 5 Tahun Terakhir

(Bukan Skripsi, Tesis, maupun Disertasi)

No.	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)
1	2012			
2	2013			
3	2014			
4	2015			
5	2016			

*Tuliskan sumber pendanaan baik dari skema penelitian DIKTI maupun dari sumber lainnya

D. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan

			Sumber*	Jml (Juta Rp)
1	2013			
2	2014			
3	2015			
4	2016			
5	2017	Sosialisasi Program Studi Bioteknologi (S1) di Beberapa Sekolah Tingkat SMA atau Sederajat di Jakarta dan Tangerang	Internal	1.500.000

*Tuliskan sumber pendanaan baik dari skema pengabdian kepada masyarakat DIKTI maupun dari sumber lainnya

E. Publikasi Artikel Ilmiah Dalam Jurnal dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume/ Nomor/Tahun
1	2016	Cloning of a Transglutaminase Gene from <i>Streptomyces thioluteus</i> TTA 02 SDS 14	Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest Biotechnology (P3DSPBKP-KKP)	11/I/2016
2	2016	Screening of Indonesian <i>Streptomyces</i> sp. Capable of Secreting Transglutaminase (MTGase) and Optimization of MTGase Prodction Using Different Growth Media.	Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest Biotechnology (P3DSPBKP-KKP)	11/I/2016
3				
Dst				

F. Pemakalah Seminar Ilmiah (Oral Presentation) dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Nama Pertemuan Ilmiah/Seminar	Jurnal Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1			
2			
3			
Dst			

G. Karya Buku dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit
1				
2				
3				
Dst				

H. Perolehan HKI dalam 5-10 Tahun Terakhir

No.	Judul/Tema HKI	Tahun	Jenis	Nomor P/ID
1				
2				
3				
Dst				

I. Pengalaman Merumuskan Kebijakan Publik/Rekayasa Sosial Lainnya dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Judul/Tema/Jenis Rekayasa Sosial Lainnya yang Telah Diterapkan	Tahun	Tempat Penerapan	Respon Masyarakat

J. Penghargaan dalam 10 Tahun Terakhir (dari pemerintah, asosiasi atau institusi lainnya)

No.	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun
1			
2			
3			
Dst			

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi

Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan penugasan penelitian dosen pemula.

Jakarta, 28 Oktober 2017

Ketua Pengusul

(Seprianto, S.Pi, M.Si)