

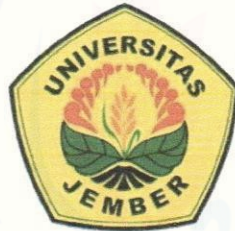
Laporan Akhir Penelitian

Penelitian Skema Tesis Magister

Pendanaan DRPM Tahun 2020

Identifikasi bakteri Endosibion Sistem Pencernaan Hama Biji Kopi

Hypothenemus hampei Ferr.



Oleh Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Jember

Tahun 2020

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Riset : Identifikasi bakteri Endosibion Sisrem Pencernaan Hama Biji Kopi
Hypothenemus hampei Fer.

Nama Rumpun Ilmu : Biologi (Bioteknologi)

Skema Riset : Hibah Penelitian Tesis Magister DRPM 2020

Ketua Periset:

a. Nama Lengkap : Dr. Kahar Muzakhar, S.Si
b. NIDN/NIDK : 0003056808
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Program Studi : PS Magister (S2) Biologi, FMIPA (Bidang Keilmuan: Enzimologi)
e. Nomor HP : 081216060778
f. Alamat surel (e-mail) : kaharmzk@unej.ac.id

Mahasiswa

Nama Mahasiswa : Azizah
Program Studi : PS Magister (S2) Biologi, FMIPA

Pembiayaan : DRPM – RistekDikti

Jember, Desember 2020

Mengetahui
a.n. Dekan FMIPA
Wakil Dekan I

Pelaksana



Dr. Siswoyo, M.Sc. Ph.D.,
196605291993031003

Dr. Kahar Muzakhar.
196805031994011001

Menyetujui,
Lembaga Penelitian
Universitas Jember



Dr. Yuli Witono, S.TP., MP.
196912121998021001



PROTEKSI ISI LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Dilarang menyalin, menyimpan, memperbanyak sebagian atau seluruh isi laporan ini dalam bentuk apapun kecuali oleh peneliti dan pengelola administrasi penelitian

LAPORAN AKHIR PENELITIAN TAHUN TUNGGAL

ID Proposal: 0b68651b-c054-448e-babe-afb61096f94b
Laporan Akhir Penelitian: tahun ke-1 dari 1 tahun

1. IDENTITAS PENELITIAN

A. JUDUL PENELITIAN

Identifikasi bakteri Endosibion Sistem Pencernaan Hama Biji Kopi *Hypothenemus hampei* Ferr

B. BIDANG, TEMA, TOPIK, DAN RUMPUN BIDANG ILMU

Bidang Fokus RIRN / Bidang Unggulan Perguruan Tinggi	Tema	Topik (jika ada)	Rumpun Bidang Ilmu
Pangan	Teknologi Ketahanan dan Kemandirian Pangan	Pendukung kemandirian pangan (padi, jagung, dan kedelai) dan tanaman perkebunan	Biologi (dan Bioteknologi Umum)

C. KATEGORI, SKEMA, SBK, TARGET TKT DAN LAMA PENELITIAN

Kategori (Kompetitif Nasional/ Desentralisasi/ Penugasan)	Skema Penelitian	Strata (Dasar/ Terapan/ Pengembangan)	SBK (Dasar, Terapan, Pengembangan)	Target Akhir TKT	Lama Penelitian (Tahun)
Penelitian Kompetitif Nasional	Penelitian Tesis Magister	SBK Riset Dasar	SBK Riset Dasar	2	1

2. IDENTITAS PENGUSUL

Nama, Peran	Perguruan Tinggi/ Institusi	Program Studi/ Bagian	Bidang Tugas	ID Sinta	H-Index
KAHAR MUZAKHAR Ketua Pengusul	Universitas Jember	Biologi		5989819	3
Umi Wasilah Mahasiswa Bimbingan 1	Mahasiswa S2 Biologi	-	Isolasi dan Analisis molekuler bakteri endosimbion pada pencernaan <i>H. Hampei</i> penghasil selulase	0	0
PURWATININGSIH S.Si, M.Si, Ph.D	Universitas Jember	Biologi	Membantu pembibingan isolasi <i>H. Hampei</i>	5982555	1

Dosen Pembimbing Anggota 1			dan identifikasi		
----------------------------	--	--	------------------	--	--

3. MITRA KERJASAMA PENELITIAN (JIKA ADA)

Pelaksanaan penelitian dapat melibatkan mitra kerjasama, yaitu mitra kerjasama dalam melaksanakan penelitian, mitra sebagai calon pengguna hasil penelitian, atau mitra investor

Mitra	Nama Mitra
-------	------------

4. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

Luaran Wajib

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (<i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (<i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i>)
1	Artikel di Jurnal Internasional Terindeks di Pengindeks Bereputasi	Accepted	Journal of Mathematical and Fundamental Sciences - ITB Journal (http://journals.itb.ac.id/index.php/jmfs)

Luaran Tambahan

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (<i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (<i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i>)
1	Artikel pada Conference/Seminar Internasional di Pengindeks Bereputasi	Terbit dalam Prosiding	The 10th Basic Science International Conference (Universitas Brawijaya)

5. ANGGARAN

Rencana anggaran biaya penelitian mengacu pada PMK yang berlaku dengan besaran minimum dan maksimum sebagaimana diatur pada buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Edisi 12.

Total RAB 1 Tahun Rp. 39,350,000

Tahun 1 Total Rp. 39,350,000

Jenis Pembelanjaan	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	ATK	Paket	1	1,550,000	1,550,000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Unit	1	31,300,000	31,300,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar internasional	Paket	1	5,000,000	5,000,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Publikasi artikel di Jurnal Internasional	Paket	1	1,500,000	1,500,000

6. HASIL PENELITIAN

A. RINGKASAN: Tuliskan secara ringkas latar belakang penelitian, tujuan dan tahapan metode penelitian, luaran yang ditargetkan, serta uraian TKT penelitian.

Kopi merupakan salah satu komoditas ekspor penting di Indonesia. Sama halnya dengan tanaman perkebunan lainnya, pada kopi juga terdapat hama utama yang

menyebabkan penurunan kualitas dan kuantitas kopi itu sendiri. Hama utama tersebut adalah *Hypothenemus hampei* Ferr., yang termasuk kelompok kumbang kayu yang seluruh siklus hidupnya berada di dalam biji kopi.

Selama ini usaha yang dilakukan dalam pengendalian hama ini dikalangan petani yaitu menggunakan insektisida, baik insektisida kimia maupun insektisida botani. Penggunaan insektisida ini kurang efektif dikarenakan siklus hidup *H. hampei* berada di dalam biji kopi tersebut. Oleh sebab itu perlu adanya alternatif lain yang dapat mengendalikan *H. hampei* yang siklus hidupnya terjadi di dalam biji kopi dengan pengendalian melalui jalur metabolismenya. Kemampuan *H. hampei* untuk dapat hidup di dalam biji kopi yang diketahui mengandung beberapa senyawa toksik bagi beberapa serangga seperti kafein, dikarenakan di dalam sistem pencernaan *H. hampei* bersimbiosis dengan bakteri pendegradasi kafein.

Selain kafein, *H. hampei* juga menggunakan komponen kimia lainnya dari biji kopi untuk memenuhi kebutuhan karbon dalam metabolismenya. Salah satu komponen tersebut adalah selulosa. Selulosa merupakan polisakarida kompleks yang tidak dapat dicerna secara langsung oleh beberapa organisme. Oleh sebab itu perlu adanya organisme simbiotik yang mampu mendegradasi selulosa tersebut seperti bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik mampu menghasilkan enzim selulase yang mampu mendegradasi selulosa menjadi senyawa monosakarida sehingga dapat dicerna oleh *H. hampei* untuk metabolismenya. Oleh karena itu dengan diketahuinya bakteri selulolitik serta aktivitas enzim selulasenya dari sistem pencernaan *H. hampei* menjadi tahapan awal untuk mengeragui alternatif lain dalam pengendalian serangga ini melalui jalur metabolismenya.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan 17 isolat bakteri selulolitik pada sistem pencernaan *H. hampei* yang ditumbuhkan pada media CMC 0,5% dengan kondisi aerob. Lima isolat, dari 17 bakteri selulolitik yang ada, memiliki aktivitas selulolitik semi kuantitatif tertinggi yaitu, ISH 08 (1,22), ISH 10 (1,45), ISH 13 (1,37), ISH 16 (4,12), dan ISH 19 (2,38). Tiga isolat memiliki aktivitas tertinggi yang berbeda nyata berdasarkan hasil analisis SPSS yaitu ISH 10, ISH 16, dan ISH 19, sehingga dipilih untuk diidentifikasi lebih lanjut. Tiga isolat bakteri yang telah diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi dan biokimia didapatkan bahwa ISH 10 mendekati genus *Brochothrix*, ISH 16 mendekati genus *Listeria* berdasarkan karakter yang telah diamati, dan ISH 19 mendekati genus *Neisseria*. Berdasarkan hasil aktivitas crude enzim selulase secara kuantitatif yang dihasilkan oleh ketiga bakteri yang teridentifikasi, ISH 16 merupakan bakteri dengan aktivitas selulase tertinggi pada waktu inkubasi relatif singkat yaitu sebesar 0,078 U/ml pada waktu inkubasi 48 jam. Crude enzim yang dihasilkan oleh ISH 16 dipurifikasi lebih lanjut untuk mendapatkan aktivitas spesifik enzim selulasenya. Hasil tahapan purifikasi pertama yaitu dialisis 10 kDa, enzim selulase isolat 16 memiliki aktivitas tertinggi pada fraksi >10 kDa yaitu sebesar 0,042 U/ml. Purifikasi lanjutan dengan anion exchanger chromatography menggunakan MA Q-75, enzim selulase ISH 16 menghasilkan tiga peak enzim yang berbeda yaitu peak 1 dengan purification fold sebesar 9,39% dengan yield 36,83%; Peak 2 memiliki purification fold 11,89% dengan yield 30,85%, dan Peak 3 memiliki purification fold 47,26 % dengan yield 42,80% dibandingkan crude enzim yang dihasilkan.

B. KATA KUNCI: Tuliskan maksimal 5 kata kunci.

Bakteri; Endosimbion; Hama; Sistem Pencernaan; *Hypothenemus hampei* Ferr.

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan ringkas mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN: Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai

Digital Repository Universitas Jember

sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian dapat berupa data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.



Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan ringkas mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. **HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian meliputi data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

1. Latar Belakang

Kopi (*Coffea* sp.) merupakan salah satu komoditas ekspor penting di Indonesia. Beberapa jenis kopi yang terdapat di Indonesia diantaranya yaitu kopi arabica (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*C. canephora*) (Prastowo *et al.*, 2010). Sama halnya dengan tanaman perkebunan lainnya, pada kopi terdapat hama utama yang menyebabkan penurunan kualitas dan kuantitas buah kopi itu sendiri. Hama utama tersebut adalah *Hypothenemus hampei* Ferr.

H. hampei termasuk kumbang kayu yang menjadi hama penggerek buah kopi. *H. hampei* betina yang dewasa akan menggerek buah kopi dan meletakkan telurnya di dalam endosperma buah kopi. Larva *H. hampei* ini nantinya akan tetap berada di dalam biji kopi dan memakan biji kopi tersebut. Aktivitas makan dari larva *H. hampei* inilah yang menyebabkan rontoknya buah kopi dan penurunan kualitas buah kopi hingga 40% (Vega *et al.*, 2009). Siklus hidup dari *H. hampei* lebih banyak dilakukan di dalam biji kopi walaupun pada buah kopi mengandung kadar kafein yang tinggi yang memiliki sifat toksik terhadap serangga sehingga sulitnya penanganan hama tersebut (Ceja-Navarro *et al.*, 2015).

Selama ini usaha yang dilakukan untuk mengendalikan *H. hampei* dikalangan petani kopi yaitu dengan menggunakan insektisida kimia (Novizan, 2004). Pemakaian insektisida kimia dapat menimbulkan berbagai permasalahan mulai dari munculnya resistensi, resurgensi, ledakan hama sekunder, timbulnya pencemaran air dan tanah, serta ancaman terhadap kesehatan manusia (Rukmana dan Saputra, 1997). Salah satu alternatif pengganti insektisida kimia yang telah digunakan yaitu penggunaan insektisida botani. Penggunaan insektisida botani lebih ramah lingkungan, namun hasil dari aplikasinya relatif lebih lama, sehingga masih menjadi permasalahan dikalangan petani. Berdasarkan hasil beberapa penelitian,

insektisida botani yang digunakan seperti cyantraniliprole (Wiryadiputra, 2012), mimba (Vijayalakshmi *et al.*, 2014), ekstrak tembakau (Prajusha *et al.*, 2014), dan minyak esensial beberapa tanaman (Mendesil *et al.* 2012; Mawussi *et al.*, 2009) dapat menghambat atau membunuh *H. hampei* dengan baik dalam skala laboratorium, namun tidak terlalu efektif jika digunakan pada skala lapangan. Selain itu kerja insektisida botani yang digunakan tidak dapat menyebabkan kematian *H. hampei* hingga 100% meski dalam skala laboratorium. Selain itu penurunan intensitas serangan *H. hampei* pada buah kopi dilapangan setelah aplikasi *crude* ekstrak fraksi hexane rimpang dringu (*Acorus calamus* L.) pada pohon kopi dikatakan rendah karena nilai penurunan kurang dari 10% (Purwatiningsih, *et al.*, 2017). Oleh sebab itu perlu adanya usaha lain dalam pengendalian *H. hampei* yang seluruh siklus hidupnya terjadi pada biji kopi dengan pengendalian melalui jalur metabolismenya.

Siklus hidup *H. hampei* yang dominan pada biji kopi dengan kandungan kafein tinggi menunjukkan bahwa serangga ini memiliki kemampuan adaptasi dan toleransi tinggi terhadap kondisi biji kopi. Kemampuan hidup dari *H. hampei* pada biji kopi ini dikarenakan terdapatnya simbiotik antara *H. hampei* dengan bakteri pendegradasi di dalam sistem pencernaanya. Salah satu bakteri endosimbion yang terdapat pada *H. hampei* yaitu bakteri pendegradasi kafein pada kelompok *Pseudomonas* (Ceja-Navarro *et al.*, 2015). Selain bakteri endosimbion yang membantu untuk mendegradasi kafein, *H. hampei* juga memerlukan sumber karbon sederhana untuk metabolismenya. Sumber karbon sederhana dapat diperoleh dengan memecah substrat polisakarida menjadi monomer sederhana yang dapat diserap oleh *H. hampei*. Salah satu sumber karbon sederhana yang terdapat di dalam buah kopi yaitu selulosa. Kandungan selulosa pada buah kopi robusta sebesar 32-42%, sedangkan pada kopi arabika sebesar 41-43% (Belitz *et al.*, 2009).

Perlu adanya simbiosis antara *H. hampei* dengan bakteri pendegradasi selulosa (bakteri selulolitik) untuk memenuhi kebutuhan sumber karbon dalam metabolismenya. Bakteri selulolitik tersebut mampu mensekresikan enzim yang dapat menghidrolisis selulosa menjadi gula sederhana (Himmel, 2015). Hal tersebut dapat dijadikan strategi baru dalam pengendalian *H. hampei* dengan mengganggu

sistem pencernaan *H. hampei* melalui enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik endosimbion sistem pencernaan. Terganggunya aktivitas selulase tersebut, diharapkan tidak akan terjadi proses pemecahan selulosa dalam sistem pencernaan *H. hampei*. Hal tersebut dapat menyebabkan fungsi metabolisme pada pencernaan *H. hampei* terganggu.

Salah satu jenis kumbang kayu yang telah diketahui jenis bakteri selulolitik pada sistem pencernaannya yaitu *Dendroctonus rhizophagus* (hama pada pinus). Menurut Morales-Jimenez *et al.* (2012) terdapat 9 jenis bakteri dari kelas γ -Proteobacteria dan Actinobacteria pada sistem pencernaan *D. rhizophagus* dengan 3 spesies bakteri yaitu *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ponticoccus gilvus*, dan *Kocuria marina* menunjukkan aktivitas selulolitik secara in vitro. Indeks aktivitas enzim masing-masing isolat berturut-turut yaitu $8,2 \pm 2,45$; $4,18 \pm 0,28$; dan $3,8 \pm 0,65$.

Pengetahuan tentang interaksi antara mikroba endosimbion dan serangga inang dapat dieksploitasi dengan dua cara berbeda. Salah satunya adalah dengan menargetkan atau memanfaatkan interaksi simbiosis tersebut untuk mengendalikan hama pertanian. Pengendalian tersebut dapat dilakukan dari interaksi mikroba maupun dengan merusak enzim pencernaan serangga (Berasatehui *et al.*, 2016; Macedo dan Freire, 2011). Beberapa ekstrak dari tanaman seperti *Psidium guajava*, *Azadirachta indica*, *Eucalyptus camaldulensis* dan *Vitis vulpina* merupakan inhibitor yang ampuh bagi enzim selulase yang diekstraksi dari tubuh beberapa serangga (Sami dan Shakoori, 2017). Aktivitas selulase dari pencernaan kumbang palem merah (*Rhynchophorus ferrugineus*) menurun secara signifikan dengan adanya *ethyldiaminetetraacetic acid* (EDTA) dan *Sodium dodecyl sulphate* (SDS) (Vantaparast *et al.*, 2014).

Penelitian mengenai identifikasi bakteri selulolitik dan enzim selulase yang dihasilkan pada pencernaan *H. hampei* selama ini belum dilakukan. Oleh sebab itu perlu dilakukannya penelitian mengenai skrining bakteri selulolitik sebagai bakteri simbiosis pada sistem pencernaan *H. hampei* serta aktivitas selulolitik dari bakteri tersebut sebagai alternatif pengendalian hama tersebut.

2. Isolasi Bakteri Selulolitik Endosimbion Pencernaan *H. hampei*

Skrining tahap awal bakteri selulolitik endosimbion pada usus *H. hampei* dilakukan dengan menggunakan media selektif yaitu *Carboxymethyl Cellulose* (CMC). CMC merupakan turunan dari selulosa yang mampu larut dalam air. CMC ini berfungsi untuk mendeteksi adanya produksi enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang dapat mendegradasi selulosa (Eveleigh *et al.*, 2009). Media CMC merupakan media yang umum digunakan dalam penelitian untuk mengidentifikasi mikroba selulolitik karena tingkat kelarutannya yang tinggi di dalam air. Namun, terdapat beberapa indikasi bahwa kemampuan mikroorganisme untuk menggunakan selulosa murni lebih terbatas daripada kemampuan mikroba untuk menggunakan turunan selulosa (Reese *et al.*, 1950 dalam Delalibera *et al.*, 2005). Hasil isolasi bakteri pada media CMC didapatkan 17 isolat bakteri yang mampu tumbuh. Tujuh belas isolat ini merupakan bakteri endosimbion pada usus *H. hampei* yang dimungkinkan dapat menghasilkan enzim selulase (bakteri selulolitik).

Tujuh belas isolat bakteri selulolitik yang didapatkan, diuji aktivitas degradasi selulosa secara semi kuantitatifnya dengan berdasarkan zona bening yang terbentuk pada media CMC. Uji ini dilakukan dengan menggunakan media CMC dan larutan pewarna iodine 0.33%. Menurut Kasana *et al.* (2008) larutan iodine digunakan untuk menguji aktivitas enzim selulase dari mikroorganisme. Pewarna iodine membentuk warna hitam kebiruan sebagai reaksi dengan selulosa (polisakarida) pada media CMC dan tidak terbentuk reaksi dengan monosakarida. Pewarna iodine merupakan pewarna yang lebih baik digunakan dibandingkan pewarna lain seperti Congo red. Pada penelitian yang dilakukan oleh Gohel *et al.*, (2014) pewarna iodine merupakan pewarna terbaik untuk melakukan uji aktivitas selulolitik dengan menghasilkan hasil zona bening yang menonjol dan berbeda dalam waktu 2-3 menit saja. Selain itu pewarna iodine tidak bersifat toksik pada sel bakteri.

Hasil uji aktivitas selulolitik semi kuantitatif menunjukkan bahwa dari 17 isolat bakteri selulolitik hanya 5 isolat bakteri yang menunjukkan aktivitas degradasi tinggi yaitu isolat dengan kode ISH 08, ISH 10, ISH 13, ISH 16, dan ISH 19. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri tersebut menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu menggunakan selulosa yang terdapat pada media untuk pertumbuhannya. Hal ini menyebabkan selulosa di sekitar koloni bakteri telah habis terpakai sehingga terbentuk zona bening. Semakin tinggi nilai indeks selulase, maka semakin tinggi pula aktivitas selulolitik yang dihasilkan oleh bakteri tersebut (Apun *et al.*, 2000). Menurut Gohel *et al.* (2014), zona bening yang terbentuk di sekitar koloni menunjukkan adanya aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik pada media. Enzim selulase tersebut memecah polisakarida (selulosa) yang ada disekitar koloni sehingga selulosa tersebut habis dan diganti dengan monosakarida (glukosa) dan disakarida. Pewarna yang digunakan dalam uji ini tidak dapat mengikat secara efisien pada kelompok monosakarida dan disakarida, sehingga terbentuk zona bening disekitar koloni. Aktivitas degradasi tinggi ditunjukkan dengan pembentukan zona bening yang semakin besar disekitar koloni bakteri. Nilai indeks aktivitas enzim pada 5 isolat tersebut menunjukkan bahwa ISH 16 memiliki aktivitas degradasi selulosa tertinggi dengan nilai indeks sebesar 4,12. Hasil aktivitas isolat bakteri selulolitik lainnya berturut-turut yaitu ISH 19 (2.4), ISH 10 (1.5), ISH 13 (1.4), dan ISH 08 (1.2).

Hasil nilai indeks aktivitas enzim yang telah didapatkan kemudian dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA ($\alpha = 0,05$). Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa aktivitas degradasi selulosa dari ISH 16 dan ISH 19 berbeda nyata dengan isolat lainnya (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat menghasilkan aktivitas selulolitik lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya secara semi kuantitatif.

Tabel 1. Hasil analisis uji Duncan ($\alpha = 5\%$) nilai indeks aktivitas enzim pada 17 isolat bakteri selulolitik dengan menggunakan *SPSS for Windows Version 15.0*

No.	Kode Isolat	Rata-rata \pm SD
1.	ISH 01	1,2 \pm 0,3 ^{ab}
2.	ISH 02	1,6 \pm 1,0 ^{ab}
3.	ISH 04	1,0 \pm 0,0 ^a
4.	ISH 05	1,0 \pm 0,0 ^a
5.	ISH 07	1,0 \pm 0,0 ^a
6.	ISH 08	1,2 \pm 0,5 ^{ab}
7.	ISH 09	1,0 \pm 0,0 ^a
8.	ISH 10	1,5 \pm 0,5 ^{ab}
9.	ISH 11	1,0 \pm 0,0 ^a
10.	ISH 13	1,4 \pm 0,3 ^a
11.	ISH 14	1,0 \pm 0,0 ^a
12.	ISH 15	1,0 \pm 0,0 ^a
13.	ISH 16	4,1 \pm 0,3 ^d
14.	ISH 17	1,0 \pm 0,0 ^a
15.	ISH 18	1,0 \pm 0,0 ^a
16.	ISH 19	2,4 \pm 0,1 ^c
17.	ISH 20	1,0 \pm 0,0 ^a

Keterangan : Huruf *superscrip* yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan nilai yang berbeda nyata (Uji ANOVA, dilanjutkan uji Duncan pada $\alpha=5\%$)

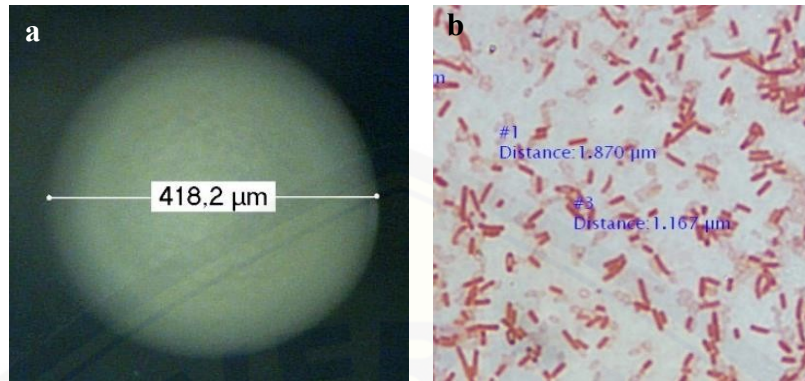
3. Identifikasi Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih Berdasarkan Karakter Morfologi dan Biokimia

Isolat bakteri selulolitik yang diidentifikasi dipilih berdasarkan hasil analisis aktivitas selulase yang berbeda nyata dengan isolat lainnya, sehingga isolat bakteri terpilih yang diidentifikasi pada penelitian ini yaitu ISH 10, ISH 16, dan ISH 19.

Identifikasi bakteri selulolitik dilakukan berdasarkan morfologi makroskopis, mikroskopis dan karakteristik biokimianya.

4. Karakteri Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis dan **Biokimia** ISH 10

Berdasarkan karakter morfologi makroskopis ISH 10 memiliki bentuk koloni *circular* (bentuk bulat). Elevasi dari koloni isolat 10 yaitu *flat* atau datar dengan tepi koloni entire (penuh). Diameter koloni ISH 10 yaitu sebesar 418,2 μm (Gambar 1 a). Bentuk sel hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa ISH 10 memiliki bentuk basil (batang) dengan panjang sebesar 1870 μm (Gambar 1 b.)



a) Karakteristik koloni ISH 10 pada media *nutrient agar* umur 24 jam, perbesaran 20x mikroskop stereo, kamera optilab v21, b) bentuk sel ISH 10, perbesaran 1000x, Mikroskop Olympus BX53 F

Gambar 1 Karakter morfologi makroskopis dan mikroskopis ISH 10

Berdasarkan hasil uji biokimia menunjukkan bahwa ISH 10 termasuk bakteri gram positif dengan ditunjukkan hasil uji KOH tidak berlendir. ISH 10 memiliki sifat katalase positif dengan ditunjukkan munculnya gelembung pada uji katalase. Menurut Hemraj *et al.*, (2013), pada bakteri yang menunjukkan reaksi positif pada uji katalase, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan oksigen dengan adanya enzim katalase. Hasil uji oksidase isolat 10 menunjukkan bahwa ISH 10 bersifat oksidase negatif. Hal ini berarti bahwa ISH 10 tidak menghasilkan enzim oksidase yang mampu bereaksi dengan oksigen pada proses respirasi (Hemraj *et al.*, 2013). Pada uji karbohidrat ISH 10 hanya bereaksi positif pada media glukosa, sukrosa, fruktosa, dan manitol. Hal ini menunjukkan bahwa ISH 10 mampu memfermentasi pada beberapa media karbohidrat tersebut. Hasil uji simon sitrat menunjukkan bahwa ISH 10 mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya, yang ditunjukkan dengan munculnya warna biru pada uji simon sitrat (Hemraj *et al.*, 2013). Sedangkan pada uji urease ISH 10 hanya 29-71% dari isolat yang mampu menghasilkan enzim urease. Hal ini ditunjukkan dengan hanya 20% media uji mengalami perubahan warna menjadi kuning. Pada uji reduksi nitrat dan pembentukan indol, ISH 10 bereaksi negatif. Hal ini menunjukkan bahwa ISH 10 tidak mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit

(Talaiekhazani *et al.*, 2015) serta tidak mampu mendegradasi asam amino triptofan (Alatawi *et al.*, 2015).

Berdasarkan hasil identifikasi dengan alur identifikasi, ISH 10 mendekati dengan ciri-ciri karakter dari genus *Brochothrix* (Tabel 2). *Brochothrix* termasuk ke dalam famili Lactobacillaceae. Genus *Brochothrix* memiliki bentuk sel batang teratur yang tidak bercabang dengan ukuran 0,6-0,7 x 1-2 μm , biasanya tersusun sendiri, dalam rantai atau rantai panjang yang menggulung membentuk simpul. Genus ini dapat berbentuk bulat (*coccus*) pada kultur umur tua. *Brochothrix* memiliki gram positif, selnya tidak berkapsul, tidak motil, dan tidak berspora. Spesies dari genus *Brochothrix* merupakan anaerob fakultatif, namun tumbuh lebih baik secara aerobik dan tidak memiliki pigmen. Genus *Brochothrix* tumbuh pada suhu 0-30°C (optimum pada 20-25°C). Genus ini mampu memproduksi asam dari beberapa jenis gula dan hasil utama fermentasi dari glukosa adalah laktat. Sel dari genus ini bersifat katalase positif dan mengandung sitokrom. Genus *Brochothrix* tidak dapat menggunakan urea, tidak membentuk indol dan H₂S, dan tidak mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit. Spesies dari genus *Brochothrix* ini terdapat terutama pada produk daging namun tersebar luas di lingkungan (Holt *et al.*, 1994; Stackebrand dan Jones, 2006).

Tabel 2. Perbandingan karakteristik morfologi dan biokimia ISH 10 dengan isolat bakteri tertentu

Karakteristik	Penelitian ini	<i>Brochothrix</i> (Holt, 1994)	<i>Carnobacterium</i> (Holt, 1994)
Gram	+	+	+
Bentuk Sel	<i>Basil</i>	<i>Slender rods, often filaments</i>	<i>Coccus</i>
Motilitas	-	-	D
Katalase	+	+	-
Oksidase	-	-	-
Asam dari pemecahan karohidrat (produk fermentasi)	+	+ (<i>Mainly lactate</i>)	+ (<i>Mainly L(+)-lactate</i>)
Spora	NT	-	-
Reduksi nitrat	-	-	-
Pembentukan indol	-	-	-
Uji Urease	d	-	-

Uji Simon Sitrat

+

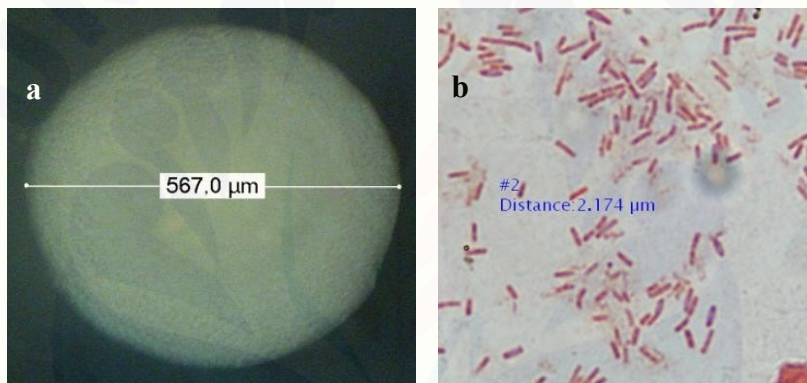
-

-

Keterangan : NT : non testes; D: proporsi substansial spesies berbeda; + : 100-80% strain positif; - : 20-0% strain positif; d : 79-21% strain positif

5. Karakteri Morfologi **Makroskopis** dan Mikroskopis dan Biokimia ISH 16

Berdasarkan karakter morfologi makroskopis ISH 16 memiliki bentuk koloni *circular* (bentuk bulat). Elevasi dari koloni ISH 16 yaitu *flat* atau datar dengan tepi koloni entire (penuh). Diameter koloni isolat 16 yaitu sebesar 567,0 μm (Gambar 2 a). Bentuk sel hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa ISH 16 memiliki bentuk basil (batang) dengan panjang sebesar 2174 μm (Gambar 4.2 b.)



a) Karakteristik koloni ISH 16 pada media *nutrient agar* umur 24 jam, perbesaran 20x mikroskop stereo, kamera optilab v21, b) bentuk sel ISH 16, perbesaran 1000x, Mikroskop Olympus BX53 F

Gambar 2. Karakter morfologi makroskopis dan mikroskopis ISH 16

Berdasarkan hasil uji biokimia menunjukkan bahwa ISH 16 termasuk bakteri gram positif dengan ditunjukkan hasil uji KOH tidak berlendir. ISH 16 memiliki sifat katalase positif dan oksidase negatif. Hal ini menunjukkan bahwa ISH 16 tersebut mampu memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan oksigen dengan adanya enzim katalase. Hasil uji oksidase negatif menunjukkan bahwa ISH 16 tidak menghasilkan enzim oksidase yang mampu bereaksi dengan oksigen pada proses respirasi (Hemraj *et al.*, 2013). Pada uji karbohidrat ISH 16 hanya bereaksi positif pada media glukosa, sukrosa, fruktosa, maltosa dan manitol. Hasil uji simon sitrat dan

urease menunjukkan bahwa ISH 16 bersifat negatif. Hal ini menunjukkan bahwa ISH 16 tidak mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya, yang ditunjukkan dengan tidak munculnya warna biru pada media uji simon sitrat. Serta ISH 16 tidak mampu menghasilkan enzim urease dengan ditunjukkan pada uji urease negatif (Hemraj *et al.*, 2013). Pada uji reduksi nitrat ISH 16 bereaksi positif. Hal ini menunjukkan bahwa isolat 16 mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit dengan adanya enzim nitrat reduktase yang ditunjukkan dengan berubahnya media uji berwarna merah setelah penambahan reagen (Talaiekhosani *et al.*, 2015). ISH 16 tidak mampu mendegradasi asam amino triptofan dan membentuk indol, hal ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya cincin merah pada uji indol (Alatawi *et al.*, 2015).

Pada ISH 16 dilakukan uji endospora dan uji *acid fast* untuk karakter lebih lanjut. Berdasarkan hasil uji endospora dan *acid fast*, menunjukkan bahwa ISH 16 bersifat negatif yang berarti ISH 16 tidak mampu memproduksi endospora dan tidak memiliki asam mikolik pada dinding selnya (Wanger *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil identifikasi dengan alur identifikasi, ISH 16 mendekati dengan karakter dari genus *Listeria* (Tabel 3). *Listeria* termasuk ke dalam filum Firmicutes, kelas Bacilli, dan ordo Bacillales. Genus *Listeria* memiliki karakter bentuk yang teratur, batang pendek dengan ukuran 0,4-0,5 x 0,5-2 μm dengan ujung yang membulat, dan terkadang berbentuk bulat, tersusun atas single sel atau dalam rantai pendek dan jarang dalam bentuk filamen panjang. Sel dari genus ini gram positif, tidak berspora, tidak membentuk *acid-fast*, dan tidak berkapsul. Genus *Listeria* ini bergerak dengan beberapa flagel peritrichous ketika tumbuh pada 20-25 °C. Bakteri yang termasuk genus ini bersifat fakultatif anaerob. Koloni pada media nutrisi agar memiliki permukaan yang cembung, berwarna transparan, dan tepi penuh (entire). *Listeria* bersifat kemoorganotrof, selnya memiliki metabolisme fermentatif pada glukosa yang menghasilkan L(+)-laktat. Sel bakteri dari genus ini bersifat katalase positif dan oksidase negatif. Suhu optimum pertumbuhan bakteri ini 30-37°C. *Listeria* terdistribusi secara luas di lingkungan, beberapa spesies bersifat patogen untuk hewan dan manusia (Holt *et al.*, 1994).

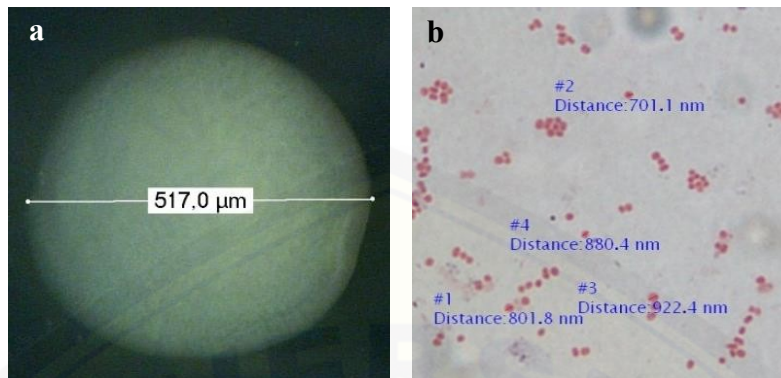
Tabel 3. Perbandingan karakteristik morfologi dan biokimia ISH 16 dengan isolat bakteri tertentu

Karakteristik	Penelitian ini	<i>Listeria</i> (Holt, 1994; Cowan dan Steel, 1970*)	<i>Kurthia</i> (Holt, 1994; Cowan dan Steel, 1970*)
Gram	+	+	+
Bentuk Sel	<i>Rods</i>	<i>Short rods, often short chain, and filaments</i>	<i>Regular rods in chain, cocci in old cultures</i>
Motilitas	+	+ ^b	- ^d
Pertumbuhan udara*	di +	+	+
Katalase	+	+	+
Oksidase*	-	-	-
Glukosa (asam)*	+	+	-
Acid-fast	-	-	-
Spora	-	-	-
Uji Urease	-	-	-
Uji Simon Sitrat**	-	-	-
Reduksi Nitrat**	+	-	-
Pembentukan indol**	-	-	-

Keterangan : + : 100-80% strain positif; - : 20-0% strain positif; * : parameter dari Cowen and Steel, 1970, ^b : *Numerous flagella*; ^c : *Rhizoid colonies*; ** : tidak sebagai karakter genus pada buku identifikasi

6. Karakteri Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis dan Biokimia ISH 19

Berdasarkan karakter morfologi makroskopis ISH 19 memiliki bentuk koloni *circular* (bentuk bulat). Elevasi dari koloni ISH 19 yaitu *flat* atau datar dengan tepi koloni entire (penuh). Diameter koloni ISH 19 yaitu sebesar 517,0 μm (Gambar 3 a). Bentuk sel hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa ISH 19 memiliki bentuk coccus (bulat) dengan diameter sebesar 700 hingga 900 μm (Gambar 3 b.)



a) Karakteristik koloni ISH 19 pada media *nutrient agar* umur 24 jam, perbesaran 20x mikroskop stereo, kamera optilab v21, b) bentuk sel ISH 19, perbesaran 1000x, Mikroskop Olympus BX53 F

Gambar 3 Karakter morfologi makroskopis dan mikroskopis ISH 19

Berdasarkan hasil uji biokimia menunjukkan bahwa ISH 19 termasuk bakteri gram negatif dengan ditunjukkan hasil uji KOH yang berlendir. ISH 19 memiliki sifat katalase positif dan oksidase positif hanya 21-79% strain isolat. Hal ini menunjukkan bahwa ISH 19 mampu menghasilkan enzim katalase yang mampu memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan oksigen. Selain itu, 21-79% dari ISH 19 juga menghasilkan enzim oksidase yang mampu bereaksi dengan oksigen pada proses respirasi tahapan transport elektron (Hemraj *et al.*, 2013). Pada uji karbohidrat ISH 19 bereaksi positif semua media uji karbohidrat. Hal ini ditunjukkan dengan perubahan warna media dari merah menjadi kuning. Perubahan ini menunjukkan adanya proses fermentasi yang dilakukan oleh isolat bakteri tersebut. Fermentasi merupakan aktivitas biokimia yang dilakukan oleh mikroorganisme dengan mengubah senyawa makromolekul organik menjadi senyawa yang lebih sederhana dalam kondisi anaerob. Fermentasi karbohidrat dapat menghasilkan berbagai senyawa asam seperti asam laktat dan propionat, ester, keton dan gas (Alatawi *et al.*, 2015).

Hasil uji simon sitrat menunjukkan bahwa ISH 19 bersifat positif. Hal ini ditunjukkan dengan mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya, yang ditunjukkan dengan terbentuk warna biru pada media. Menurut Hemraj *et al.*, (2013) apabila reaksi pada uji simon sitrat positif, hal ini menunjukkan bahwa bakteri uji dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya. Pada uji urease ISH 19

bereaksi positif yang ditunjukkan dengan warna media merah berubah menjadi warna kuning. Hal ini menunjukkan bahwa ISH 19 mampu menghasilkan enzim urease yang termasuk enzim hidrolitik dan mampu memutus ikatan amida dan melepaskan amonia. Pada uji reduksi nitrat dan pembentukan indol, ISH 19 bereaksi positif. Hal ini menunjukkan bahwa ISH 19 mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit menggunakan enzim nitrat reduktase pada kondisi anaerob (Talaiekhosani *et al.*, 2015) serta mampu mendegradasi asam amino triptofan secara enzimatik dan membentuk indol (Alatawi *et al.*, 2015).

ISH 19 ini berdasarkan hasil identifikasi dengan alur identifikasi, ISH 19 mendekati dengan genus *Neisseria* (Tabel 4). *Neisseria* termasuk ke dalam filum Proteobacteria, kelas β -Proteobacteria, dan ordo Neisseriaceae. Genus *Neisseria* memiliki bentuk sel coccus dengan diameter 0,6-1,0 μm , tunggal namun lebih sering perpasangan dengan sisi yang berdekatan rata. Pada genus ini mungkin memiliki kapsul dan fli, namun tidak memiliki endospora. Sel dari *Neisseria* bersifat gram negatif, namun beberapa cenderung tahan terhadap *decolorization*. Motilitas pada genus ini tidak terjadi dan tidak memiliki flagel. Bersifat aerobik. Beberapa spesies memproduksi pigmen karoten kuning kehijauan. Suhu optimum pertumbuhan adalah 35-57°C. Genus *Listeria* ini bersifat oksidase positif dan katalase. Semua spesies dari genus ini memproduksi karbonat anhidrase, dan mampu mereduksi nitrat. Genus *Listeria* bersifat kemoorganotrofik dan beberapa spesies memiliki sifat saccharolitik. Bakteri yang tergolong genus ini terdapat di selaput lendir pada mamalia dan beberapa spesies bersifat patogen pada manusia (Holt *et al.*, 1994).

Genus *Neisseria* juga ditemukan pada beberapa kelompok serangga, seperti nyamuk *Anopheles gambiae* pada bagian *midgut* (Boissière *et al.*, 2012), *An. Culicifacies* pada kelenjar ludahnya (Sharma *et al.*, 2014), dan nyamuk *Aedes albopictus* pada ekstraksi seluruh bagian tubuhnya (Valiente Moro, *et al.*, 2013). Selain ditemukan pada kelompok nyamuk, genus *Neisseria* ini juga ditemukan pada 12 jenis lalat dari permukaan tubuhnya (Föster *et al.*, 2007), pada fase pupa *Musca domestica* (Wei *et al.*, 2013). Pada penelitian Andreotti *et al.*, (2011), genus *Neisseria* ditemukan pada kutu ternak (*Rhipicephalus microplus*) pada fase telur dan

jantan dewasa, selain itu juga ditemukan pada kutu kayu (*Porcellio scaber*) pada bagian *hindgutnya* dengan spesies yang ditemukan yaitu *N. perflava*, *N. mucosa*, dan *N. flavescens* (Kostanjšek *et al*, 2002).

Tabel 4. Perbandingan karakteristik morfologi dan biokimia ISH 19 dengan isolat bakteri tertentu

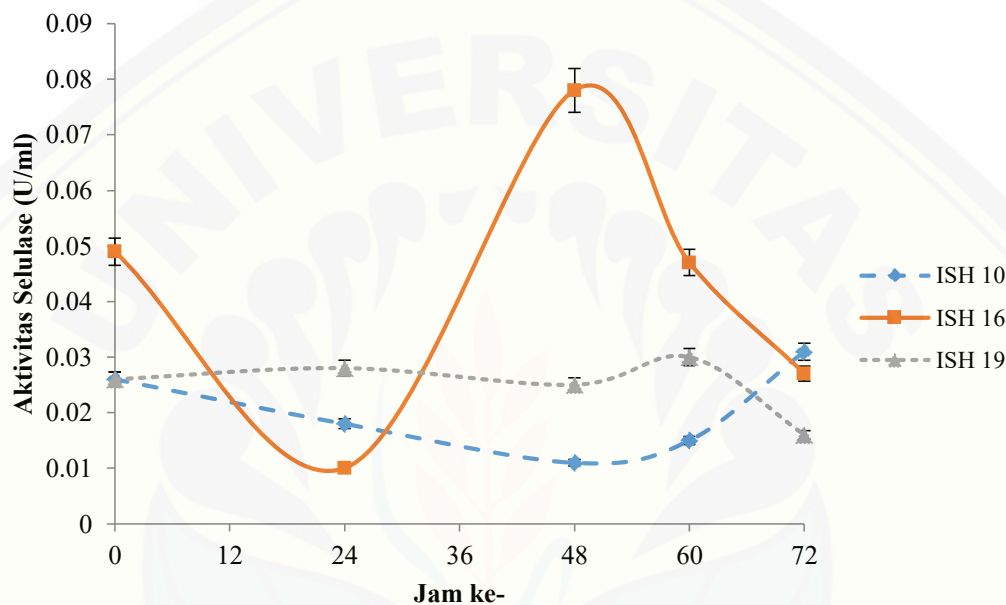
Karakteristik	Penelitian ini	<i>Neisseria</i> (Holt, 1994)	<i>Paracoccus</i> (Holt, 1994)
Gram	-	-	-
Bentuk Sel (Coccus)	+	+ atau -	+ atau -
Motilitas di media cair	-	-	-
Koloni pigmen kuning	-	+ atau -	-
Oksidase	d	+	+
Katalase	+	+	+
Asam dari glukosa	+	+	-
Sukrosa*	+(AG)		
Fruktosa*	+(AG)		
Uji Karbohidrat			
Maltosa*	+(AG)		
Arabinosa*	+(AG)		
Laktosa*	+(AG)		
Manitol*	+(AG)		
Reduksi nitrat	+	+	+
Uji Simon Sitrat*	+		
Uji Urease*	+		
Pembentukan Indol*	+		

Keterangan : + : 100-80% strain positif; - : 20-0% strain positif; +(AG): Positif fermentasi terbentuk Asam dan Gas; * : tidak sebagai karakter penentu genus pada buku identifikasi

7. Optimasi **Produksi Crude Enzim Selulase ISH 10, ISH 16, dan ISH 19**

Optimasi produksi *crude* enzim selulase dilakukan untuk mengetahui waktu inkubasi optimum dalam menghasilkan *crude* enzim selulase pada media CMC. Setiap isolat bakteri selulolitik menunjukkan waktu optimum yang berbeda untuk menghasilkan *crude* enzim dengan aktivitas yang tinggi. ISH 10 menghasilkan *crude* enzim dengan aktivitas tertinggi (0,031 U/ml) pada waktu inkubasi 72 jam. ISH 16 menghasilkan *crude* enzim dengan aktivitas tertinggi (0,078 U/ml) pada waktu inkubasi 48 jam. ISH 19 menghasilkan *crude* enzim dengan aktivitas

tertinggi (0,03 U/ml) pada waktu inkubasi 60 jam (Gambar 4). Aktivitas *crude* enzim dari tiap isolat termasuk kecil (nilai aktivitas kurang dari 0,1 U/ml) dibandingkan bakteri lainnya seperti *Bacillus* sp. Pada penelitian Nema *et al.*, (2016) menunjukkan bahwa hasil aktivitas *crude* enzim selulase *Bacillus cereus* sebesar 0,104 U/ml.



Gambar 4 Kurva aktivitas enzim hasil optimasi *crude* enzim selulase isolat bakteri selulolitik endosimbion pencernaan *Hypothenemus hampei* Ferr.

Berdasarkan Gambar 4 dapat diketahui bahwa pada ISH 16 dan ISH 19 aktivitas enzim menurun setelah waktu optimumnya. Periode fermentasi merupakan parameter penting agar enzim tidak melebihi produksi oleh mikroba (Gautam *et al.*, 2011). Secara umum produksi selulase oleh bakteri terjadi selama fase eksponensial akhir pertumbuhan suatu organisme (Shanmughapriya *et al.*, 2012). Data optimasi produksi enzim dari ketiga isolat yaitu ISH 10, ISH 16, dan ISH 19 menunjukkan bahwa ISH 16 mampu menghasilkan enzim dengan aktivitas lebih tinggi dalam waktu inkubasi optimum yang relatif lebih cepat dibandingkan dengan isolat lainnya. Hasil optimasi ini sesuai dengan hasil uji aktivitas selulolitik secara semi kuantitatif ketiga isolat yang menunjukkan bahwa ISH 16 menghasilkan nilai indeks aktivitas tertinggi dibandingkan isolat lainnya. Oleh sebab itu, ISH 16 dipilih untuk produksi enzim skala besar.

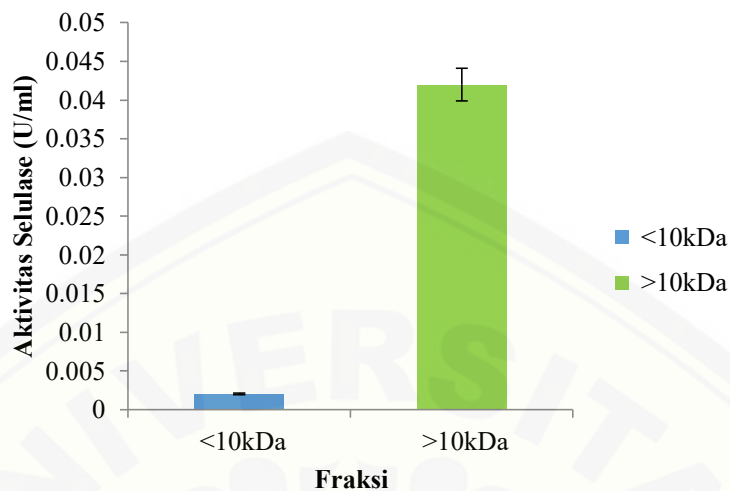
Tiga isolat bakteri selulolitik terpilih pada penelitian ini menunjukkan bahwa pada masing-masing isolat memang memiliki aktivitas selulase yang berbeda walaupun nilainya kecil. Spesies bakteri yang mendekati dengan isolat bakteri selulolitik terpilih dari hasil identifikasi juga telah diketahui memiliki aktivitas selulase. Menurut Stackebrandt dan Jones (2006) *Brochothrix thermosphacta* mampu menghidrolisis selulosa. Hal ini menunjukkan bahwa beberapa spesies dari genus *Brochothrix* mampu menghasilkan enzim selulase, namun belum ada penelitian yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas selulolitiknya. Enzim Endo 1,4 glukonase hasil purifikasi yang dihasilkan oleh *Neisseria sicca* pada media selulosa asetat memiliki aktivitas spesifik sebesar 1,83 U/mg sedangkan *crude* enzim memiliki aktivitas 0,11 U/mg (Moriyoshi *et al.*, 2002). *Listeria* sp. merupakan kelompok bakteri yang masih belum banyak diketahui aktivitas selulasenya. Pada penelitian Sirisena dan Manamendra (1995) memiliki aktivitas hidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan kadar glukosa yang diproduksi sebesar 1,8 mmol/l dengan media selulosa dan 1,5 mmol/l dengan media CMC.

8. Hasil Purifikasi Parsial Enzim Selulase ISH 16

Crude enzim selulase hasil produksi skala besar dari ISH 16 dipurifikasi parsial. Purifikasi enzim selulase dilakukan dengan dua tahap purifikasi yaitu dialisis *crude* enzim selulase dan *anion exchanger chromatography*.

a. Dialisis *Crude* Enzim Selulase dengan Kolom Dialisis 10 kDa.

Tahapan dialisis pada penelitian ini menggunakan kolom dialisis 10 kDa dan diuji aktivitasnya. Pada proses dialisis ini menghasilkan dua fraksi utama yaitu fraksi yang memiliki ukuran <10 kDa, dan fraksi yang >10 kDa (kisaran 10-50 kDa). Hasil dialisis diuji aktivitasnya untuk menentukan aktivitas selulase dari setiap fraksi. Hasil uji aktivitas fraksi dialisis dapat dilihat pada Gambar 5.

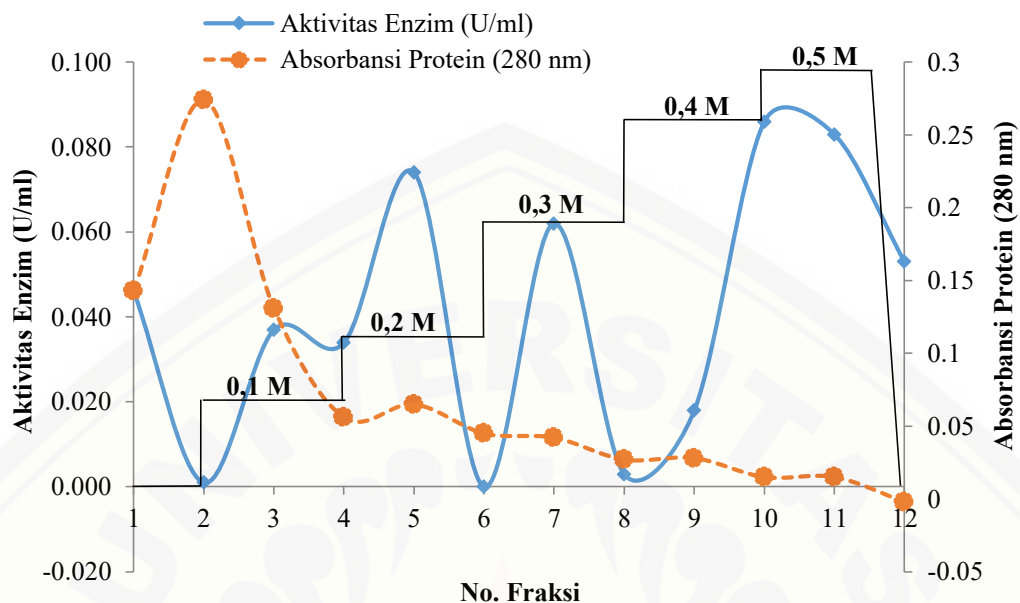


Gambar 5. Aktivitas enzim selulase ISH 16 hasil dialisis 10 kDa

Hasil pengujian aktivitas selulase ISH 16 pada tahapan dialisis 10 kDa menunjukkan bahwa enzim selulase ISH 16 fraksi >10 kDa memiliki aktivitas jauh lebih tinggi yaitu sebesar 0,042 U/ml dibandingkan hasil uji fraksi yang lolos pada membran (<10 kDa) dengan aktivitas hanya 0,002 U/ml. Berat molekul enzim selulase yang dihasilkan oleh *Penobacillus* sp. memiliki ukuran 67kDa (Islam dan Roy, 2018). Dialisis merupakan teknik pemisahan molekul kecil dari molekul besar dengan memungkinkan difusi hanya dari molekul kecil melalui membran selektif permeabel. Molekul dari sampel yang lebih besar dibandingkan pori-pori membran akan bertahan pada sisi membran, tetapi molekul kecil dan larutan *buffer* akan melewati secara bebas melalui pori-pori membran dialisis (Coligan *et al.*, 1997).

b. *Anion Exchanger Chromatography* Menggunakan *Sartobind Macroporous Absorben Quaternary Ammonium 75 cm²* (MA Q-75)

Enzim selulase hasil dialisis dipurifikasi kembali dengan menggunakan *anion exchanger chromatography* MA Q-75. Pada tahapan ini didapatkan 12 fraksi dari elusi dengan *buffer acetat* pH 5 20mM dan NaCl 0,1-0,5 M. Tiap fraksi yang dihasilkan diuji aktivitasnya untuk mengetahui aktivitas selulase setiap fraksi. Hasil uji aktivitas fraksi MA Q-75 dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Kurva aktivitas enzim tiap fraksi hasil pemurnian enzim selulase ISH 16 menggunakan *Sartobind Macroporous Absorben Quaternary Ammonium 75 cm² (MA Q-75)*

Berdasarkan Gambar 6 dapat diketahui bahwa terdapat puncak (*Peak*) yang muncul dari proses pemurnian. *Peak 1* muncul dengan menggunakan eluen NaCl 0,2 M. *Peak 2* muncul pada eluen NaCl 0,3 M, yang berarti protein terelusi pada konsentrasi tersebut. Protein pada *Peak 3* terelusi dengan konsentrasi NaCl 0,5 M. Hasil pemurnian dengan menggunakan MA Q-75 menghasilkan tingkat kemurnian 9,39 kali dengan *yield* 36,83% untuk *Peak 1*, *Peak 2* memiliki kemurnian 11,89 kali dengan *yield* 30,85%, dan 47,26 kali lebih tinggi dengan *yield* 42,80% untuk *Peak 3* dibandingkan dengan *crude* enzim tanpa pemurnian. Munculnya 3 *Peak* yang berbeda dengan konsentrasi NaCl tertentu pada hasil purifikasi dimungkinkan karena secara umum enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri tersusun atas kompleks selulase yaitu endo β -1,4 glukonase, ekso β -1,4 glukonase, dan β -glukosidase) dalam struktur yang terpisah. Pada penelitian Xu *et al.*, (200) menunjukkan bahwa hasil purifikasi β -1,4-glukanase dari *Mytilus edulis* hanya menunjukkan satu *peak* pada tahap purifikasi gel filtrasi. Berdasarkan penelitian tersebut, dapat dimungkinkan bahwa 3 *peak* yang muncul dari hasil purifikasi enzim selulase ISH 16 merupakan komponen enzim selulase kompleks.

9. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa

1. Hasil skrining didapatkan 17 isolat bakteri selulolitik pada sistem pencernaan *H. hampei* yang diisolasi menggunakan media CMC 0,5% dengan kondisi aerob. Tiga isolat bakteri yang telah diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi dan biokimia didapatkan bahwa ISH 10 mendekati genus *Brochothrix*, ISH 16 mendekati genus *Listeria*, dan ISH 19 mendekati genus *Neisseria*.
2. ISH 16 yang mendekati genus *Listeria* memiliki aktivitas selulolitik secara semi kuantitatif terbesar dibandingkan isolat lainya dengan nilai indeks aktivitasnya yaitu 4,1. Berdasarkan hasil aktivitas *crude* enzim selulase, ISH 16 merupakan bakteri dengan aktivitas selulase tertinggi yaitu 0,078 U/ml.
3. Hasil dialisis enzim selulase ISH 16 menunjukkan bahwa enzim selulase fraksi >10 kDa memiliki aktivitas lebih tinggi yaitu sebesar 0,042 U/ml dibandingkan fraksi <10 kDa dengan aktivitas sebesar 0,002 U/ml. Purifikasi enzim selulase isolat 16 menghasilkan tiga *peak* enzim yang berbeda yaitu *peak* 1 dengan kemurnian sebesar 9,39 kali dengan *yield* 36,83%; *Peak* 2 memiliki kemurnian 11,89 kali dengan *yield* 30,85%, dan *Peak* 3 memiliki kemurnian 47,26 kali dengan *yield* 42,80% dibandingkan *crude* enzim.

D. **STATUS LUARAN:** Tuliskan jenis, identitas dan status ketercapaian setiap luaran wajib dan luaran tambahan (jika ada) yang dijanjikan. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan bukti kemajuan ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan serta mengunggah bukti dokumen ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan melalui Simlitabmas.

Publikasi Prosiding terindeks SCOPUS (proses terbit) melalui keikut-sertaan International Conference on Science and Applied Science, Surakarta, Indonesia Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Sebelas Maret, 7 July 2020. Bukti terlampir

E. **PERAN MITRA:** Tuliskan realisasi kerjasama dan kontribusi Mitra baik *in-kind* maupun *in-cash* (untuk Penelitian Terapan, Penelitian Pengembangan, PTUPT, PPUPT serta KRUPPT). Bukti pendukung realisasi kerjasama dan realisasi kontribusi mitra dilaporkan sesuai dengan kondisi yang sebenarnya. Bukti dokumen realisasi kerjasama dengan Mitra diunggah melalui Simlitabmas.

- Tidak Mitra dalam Skema Thesis Magister.....

F. **KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan, termasuk penjelasan jika pelaksanaan penelitian dan luaran penelitian tidak sesuai dengan yang direncanakan atau dijanjikan.

- Tidak ada

G. **RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA:** Tuliskan dan uraikan rencana penelitian di tahun berikutnya berdasarkan indikator luaran yang telah dicapai, rencana realisasi luaran wajib yang dijanjikan dan tambahan (jika ada) di tahun berikutnya serta *roadmap* penelitian keseluruhan. Pada bagian ini diperbolehkan untuk melengkapi penjelasan dari setiap tahapan dalam metoda yang akan direncanakan termasuk jadwal berkaitan dengan strategi untuk mencapai luaran seperti yang telah dijanjikan dalam proposal. Jika diperlukan, penjelasan dapat juga dilengkapi dengan gambar, tabel, diagram, serta pustaka yang relevan. Jika laporan kemajuan merupakan laporan pelaksanaan tahun terakhir, pada bagian ini dapat dituliskan rencana penyelesaian target yang belum tercapai.

Kegiatan sedang dilakukan dengan proses identifikasi bakteri endosimbion secara molekuler. Dan sedang disusun artikel paper dalam internasional jurnal internasional terindeks bereputasi.

H. **DAFTAR PUSTAKA:** Penyusunan Daftar Pustaka berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada laporan kemajuan yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

[PHE] Public Health England. 2018. UK Standrats for Microbiology Investigations : Motility Test. *Bacteriology – Test Procedures* 4: 1-16.

Alatawi, A. R. A., Sutarno, Susilowati, A., dan Hailu, H., W. 2015. Biochemical and Molecular Characteristization from Food Stall Vegetables. *British Microbiology Research Journal* 5(5) : 405-411.

Alberts, Johnson, Lewis, Morgan, Raff, Roberts, dan Walter. 2015. *Molecular Biology of The Cell 6th Edition*. USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.

Andreotti, R., Pérez de León, A. A., Dowd, S. E., Guerrero, F. D., Bendele, K. G. dan Scoles, G. A. 2011. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick

- Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiology* 11 (6): 1-11.
- Apun, K., Jong, B., C., dan Salleh, M., A. 2000. Screening and Isolation of A Cellulolytic and Amylolytic *Bacillus* from Sago Pith Waste. *Journal of General and Applied Microbiology* 46 (5): 263-267.
- Arimurti, S., Nurani, Y., Ardyati, T. dan Suharjono, S. Screening and Identification of Indigenous Cellulolytic Bacteria from Indonesian Coffee Pulp and Investigation of Its Caffeine Tolerance Ability. *Malaysian Journal of Microbiology* 13 (2): 109-116.
- Bakare, M., K., Adewale, I.O., Ajayi, A. dan Shonukan, O., O. 2005. Purification and Characterization of Cellulase from The Wild-type and Two Improved Mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology* 4(9): 898-904.
- Baker, P. S., Barrera J. F., dan Rivas, A. 1992. Life-history Studies Of The Coffee Berry Borrer (*Hypothenemus hampei*, Scolytidae) On Coffee Trees In Southern Mexico. *Journal of Applied Ecology*. 29: 656-662.
- Begum, K., Mannan, S., J., Rezwan, R., Rahman, M., Rahman, S. dan Kamal, A., N. 2017. Isolation and Characterization of Bacteria with Biochemical and Pharmacological Importance fom Soil Samples of Dhaka City. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* 16(1): 1291-36
- Belitz, H. D., Grosch W., dan Schieberle P. 2009. *Food Chemistry*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Berasategui, A., Shukla, S., Salem, H. dan Kaltenpoth, M. 2016. Potential Application of Insect Symbionts in Biotechnology. *Applied Microniology and Biotechnology* 100(4): 1567-1577.

- Biosciences, A. 2001. *Protein Purification – Handbook*. Swedwn: Snits & design AB.
- Bio-Sciences, GE. H. 2010. *Strategies for Protein Putification – Handbook*. Sweden: General Electric Company.
- Boissière, A., Tchioffo, M. T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S., E., Shahbazkia, H., R., Awono-Ambene, P., H. dan Levashina, E., A. 2012. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PloS Pathogens* 8 (5): 1-12
- Ceja-Navarro, J., Vega, F.E., Karaoz, U., Hao, Z., Jenkins, S., Lim, H. C., Kosina, P., Infante, F., Northen, T. R. dan Brodie, E. L. 2015. Gut Microbiota Mediate Caffeine Detoxification in The Primary Insect Pest of Coffee. *Nature Communication* 6: 7618-7626.
- Coligan, J., E., Bierer, B., E., Margulies, D., H., Shevach, E., M. dan Strober, W. 1997. *Current Protocols in Immunology-Dialysis and Concentration of Protein Solutions*. New York : John Willey & Sons Inc.
- Cowan, S., T. dan Steel, K., J. 1970. *Manual for Identification of Medical Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Delalibera, I., Handelsman, J. dan Raffa, K. F. 2005. Contrast in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms Between the Wood Borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the Bark Beetles, *Ips pini* dan *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculinidae). *Journal of Environment Entomology* 34(3): 541-547.
- Eveleigh, D., E., Mandels, M., Andreotti, R. dan Roche, C. 2009. Measurement of Saccharifying Cellulase. *Biotechnology for Biofuels* 2(1): 1-8.
- Förster, M., Klimpel, S., Mehlhorn, H., Sievert, K., Messler, S. dan Pfeffer, K. 2007. Pilot Study on synantrophic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic micro-organisms. *Parsitology Research* 101 (1): 243-246.
- Gautam, S., P., Bundela, P., S., PaNdey, A., K., Khan, J., Awasthi, K. dan Sarsaiya, S. 2011. Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. *Biotechnology Research International* 2011: 1-8.
- Gembecka, M., Malinowska, E., dan Szefer, P. 2007. Differentiation of market Coffee and Its Infusions in View of Their Mineral Composition. *Science of The Total Environment* 383(1-3): 59-69.
- Gohel, H. R., Contractor, C. N., Ghosh, S., K. Dan Braganza, V., J. 2014. A Comparative Study of Various Staining Techniques for Determination of Extracellular Cellulase Activity on Carboxy Methyl Cellulose (CMC) Agar Plates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(5): 261-266.
- Gullan, P. J. dan Cranston, P. S. 2010. *The Insect : An Outline of Entomologyth4 Edition*. United Kingdom: Willey-Blackwell.
- Hemraj, V., Diksha, S., dan Anveet G. 2013. A Revie on Commonly Used Biochemical Test for Bacteria. *Innovare Journal of Life Science* 1(1): 1-7.
- Himmel, M., E. 2015. *Direct Microbial Conversion of Biomass to Advanced Biofuels*. USA: Elsevier B. V.

- Hindayana, Judawi, Priharyanto, Luther, Purnayasa, Mangan, Untung, Sianturi, Mundy, dan Riyanto. 2002. *Musuh Alami, Hama dan Penyakit Tanaman Kopi*. Jakarta: Proyek Pengendalian Hama Terpadu Perkebunan Rakyat. Direktorat Perlindungan Perkebunan, Direktorat Jenderal Bina Produksi Perkebunan. Departemen Pertanian.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P. H., Staley, J. dan Williams, S. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9^{ed}. Philadelphia: A Wolters Kluwer Company.
- Hu, X., Yu, J., Wang, C., dan Chen, H. 2014. Cellulolytic Bacteria Associated with the Gut of *Dendroctonus armandi* Larvae (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Forest*. 5(3): 455-465.
- Irulandi, Rajendran, Chinniah, dan Samuel. 2007. Influence Of Water Factors On The Incidence Of Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Scolytidae: Coleoptera) in Pulney Hills, Tamil Nadu. *Journal Madras Agricultural*. 94(7-12): 218-231.
- Islam, F. dan Roy, N. 2018. Screening, purification, and Characterization of Cellulase from Cellulase Producing Bacteria in Molasses. *BMC Res Notes* 11(1):1-6.
- Kalshoven, L. G. E. 1981. *Pests of Crops In Indonesia*. Jakarta: P.T. Ichtiar Baru-Van Hoeve
- Kasana, R., C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. dan Gulati, A. 2008. A Rapid and Easy Method for The Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology* 57(5): 503-507.
- Kostanjšek, R., Štrus, J. dan Avguštin, G. 2002. Genetic diversity of bacteria associated with the hidgut of terrestrial crustacean *Procellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *FEMS Microbiology Ecology* 40 (3): 171-179.
- Lehninger, A., Nelson, D.L, dan Cox, M. M. 2005. *Principles of Biochemistry 4th Edition*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Macedo. R. ML. dan Freire, G. M. 2011. Insect Digestive Enzymes as A Target for Pest Control. *Invertebrate Survival Journal* 8: 190-198.
- Mawussi, Vilarem, Raynaud, Merlina, Gbongli, Wegbe, dan Sanda. 2009. Chemical composition and insecticidal activity of *Aellanthus pubescens* essential oil against coffee berry borer (*Hypothenemus hampei* Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* Vol. 12 (3):327-332.
- Mendesil, E., Tadesse, M., and Negash, M. 2012. Efficacy of Plant Essential Oils Against Two Major Insect Pest Coffee (Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, and Antestia Bug, *Antestiopsis intricata*) and Maize Weevil, *Sitophilus zeamidis*. *Archieves of Phytopathology and Plant Protection*. Vol 45 (3): 366-372.
- Morales-Jimenez, J., Zuniga, G., Ramirez-Saad, H. C., dan Hernandez-Rodriguez, C. 2012. Gut Associated Bacteria Throughout the Life Cycle of The Bark Beetel *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and Their Cellulolytic Activities. *Microbial Ecology* 64(1): 268-278.
- Morales-Jimenez, J., Zuniga, G., Villa-Tanaca, L., dan Hernandez-Rodriguez, C. 2009. Bacterial Community and Nitrogen Fixation in the Red Turpentine Beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Microbial Ecology* 58(4): 879-891.
- Moriyoshi, K., Ohmoto, T., Ohe, T. dan Sakai, K. 2002. Purification and Characterization of

- an Endo-1,4- β -Glucanase from *Neisseria sicca* SB that Hydrolyzes β -1,4 Linkages in Cellulose Acetat. *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemical* 66 (3): 508-515
- Murray, Granner, Mayes, dan Rodwell. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry 26th Edition*. USA: Mc-Graw Hill Companies Inc.
- Nelson, N. 1994. A photometric Adaptation of The Somogyi Method for The Determination of Glucose. *Biol. Chem* 153: 375-380.
- Nema, N., Alamir, L., dan Mohammad, M. 2016. Partial Purification and Molecular Weight Determination of Cellulase from *Bacillus cereus*. *Internation Food Research Journal* 23(2): 894-898.
- Novizan. 2004. *Membuat dan Memanfaatkan Pestisida Ramah Lingkungan*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Prajusha, Tintumol, Vijayalakshmi, and Rahiman. 2014. Studies on The Effect of Tobacco Extract and Hot and Cold Water Immersion on The Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. Vol 2 (1): 51-53.
- Prastowo, Karmawati, Rubijo, Siswanto, Indrawanto, dan Munarso. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Purwatiningsih, Azizah, dan Laksa, B., E., S., P. 2017. The Intensity of attack of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei* Ferr.) After Application of *Acorus calamus* L. and Organic Insecticide in Coffee Plantation. *Proceeding The 2nd International Conference on Life Sciences and Biotechnology (ICOLIB)*. ISBN: 978-602-5617-14-0
- Reese, E. T., Siu, R. G. H., dan Levinson, H. S. 1950. The Biological Interaction of Soluble Cellulose Derivates and Its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis *dalam* Delalibera, I., Handelsman, J. dan Raffa, K. F. 2005. Contrast in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms Between the Wood Borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the Bark Beetles, *Ips pini* dan *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculinidae). *Journal of Environment Entomology* 34 (3): 541-547.
- Rubio, J. D., Bustillo, A. E., Vallejo, L. F. E., Acuna, J. R. Z., dan Benavides, P. M. 2008. Alimentary Canal and Reproductive Tract of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Neotropical Entomology* 31 (2): 143-151.
- Rukmana, R. dan Saputra U. S. 1997. *Hama Tanaman dan Teknik Pengendalian*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sami, A. J. dan Shakoori, R. 2007. Extract of Plnts Leaves Have Inhibitory Effect on The Cellulase Activity of Whole Body Extract of Insect – A Possible Recepte for Bioinsecticides. *Pakistan Journal in Zoology* 27: 105-118.
- Santos, E., J., dan Oliveira, E. 2001. Determination of Mineral Nutrients and Toxic Elements Brazilian Soluble Coffee by ICP-AES. *Journal of Food Composition and Analysis* 14 (5): 523-531.
- Sartorius Stedium Biotech. 2011. *Sartobind[®] Membrane Adsorbers for Rapid Purification of Proteins*. Jerman: Sartorius Stedim Biotech GmbH No Publikasi: SL-1513-e11122.
- Serisena, D.M., dan Manamendra, T. P. 1995. Isolation and Characterization of Cellulolytic Bacteria from Decomposing Rice Straw. *J. Natn. Sci.Coun. Sri Lanka* 23 (1): 25-30.

- Shanmugapriya, K., Saravana P. S., Krishnapriya, Manoharan, M., Mythili, A. dan Joseph, S. 2012. Isolation, Screening and Partial Purification of Cellulase from Cellulase Producing Bacteria. *International of Advance Biotechnology and Research* 3(1): 509-514.
- Sharma, P., Sharma, S., Maurya, R., K., Das De, T., Thomas, T., Lata, S., Singh, N., Pandey, K., C., Valecha, N. dan Dixit, R. 2014. Salivary glands harbor more diverse microbial communities than gut in *Anopheles culicifacies*. *Parasit and Vectors* 7 (235): 1-7.
- Srinivas, R., dan Panda, T. 1998. pH and Thermal Stability Studies of Carboxymethyl Cellulase from Intergeneric Fusants of *Trichoderma reesei/Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21: 178–183.
- Stackebrandt, E. dan Jones, D. 2006. The Genus *Brochothrix*. *Prokaryotes* 4: 477-491.
- Talaiekhosani, A., Alae, S. dan Ponraj, M. 2015. Guidelines for Quick Application of Biochemical Tests to Identify Unknown Bacteria. *Accounts of Biotechnology Reseaech* 2(2): 65-82.
- Valiente Moro, C., Tran, F., H., Raharimalala, F. N., Ravelonandro, P. dan Mavingui P. 2013. Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Microbiology* 13 (70): 1-11
- Vasanthakumar, A., Delalibera, I., Handelsman, J., Klepzig, K. D., Schloss, P. D., dan Raffa, K. F. 2006. Characterization of Gut Associated Bacteria in Larvae and Adults of the Southern Pine Beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann. *Environmental Entomology* 35 (6): 1710-1717.
- Vatanparast M., Hosseinaveh, V., Ghadamyari, M. dan Sajjadian, S., M. 2014. Plant Cell Wall Degrading Enzymes, Pectinase and Cellulase, in the Digestive System of Red Pal Weevil, *Rhyncophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Plant Protection Science* 50(4): 190-198.
- Vega, F. E. dan Hofstetter, R. W. 2015. *Bark Beetles Biology and Ecology of Native and Invasive Species*. USA: Elsevier Inc.
- Vega, F. E., Infante, F., Castillo, A. dan Jaramillo, J. 2009. The Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): A Short Review, with Recent Findings and Future Research Directions. *Terrestrial Arthropod Reviews*. 2: 129-147.
- Vijayalakshmi, C., K., Tintumol, K. Dan Vinodkhumar, P., K. 2014. Effect of few Commercial Neem-Based Insecticide in the Management of Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae). *The Journal of Zoology Studies* Vol 1 (1): 22-25.
- Vijayalaksmi, C.K., Tintumol, K., dan Saibu, U. 2013. Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari): A Review. *International Journal of Innovative Research & Development*. 2: 358-361
- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., S., P., Wahed, A., Actor, J., K. Dasgupta, A. 2017. *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology : A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice*. United States: Elsevier Inc.
- Wei, T., Hu, J., Miyanaga, K. dan Tanji, Y. 2013. Comparative analysis of bacterial community and antibiotic-resistant strains in different developmental stages of the housefly (*Musca domestica*). *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (4): 1775-1783.

- Wiradiputra, S. 2007. Pengelolaan Hama Terpadu Pada Hama Penggerek Buah Kopi, *Hypothenemus hampei* (Ferr.) dengan Komponen Utama Pada Penggunaan Brocap Trap. *Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia Jember*, Jawa Timur.p.2-9.
- Wiradiputra, S. 2012. Keefektifan insektisida cyantraniliprole terhadap hama penggerek buah kopi (*Hypothenemus hampei*) pada kopi arabika. *Pelita Perkebunan* 28 (2): 100-110.
- Wood, S. L. 2007. *Bark and Ambrosia Beetles Of South America (Coleoptera, Scolytidae)*. Utah: Brigham Young University.
- Xu, B., Hellman, U., Ersson, B. dan Janson, J., C. 2000. Purification, Characterization and Amino Acid Sequence Analysis of A Thermostable, Low Molecular Mass Endo- β -1,4-Glucanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*. *European Journal of Biochemistry* 267(16): 4970-4977.
- Yi, J. C., Sandra, J. C., John, A. B., dan Shu, T. C. 1999. Production and Distribution of Endoglucanase, Cellobiohydrolase, and β -glucosidase Components of The Cellulolytic System of *Volvariella volavacea*, The Edible Strawmushroom. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 553-559.
- Zhang, X. dan Zhang, Y. P. 2013. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In S.-T. Yang, H. A. El-Enshasy, & N. Thongchul (Eds.), *Bioprocessing Technology in Biorefinery for Sustainable Production of Fuel, Chemical and Polymers* (First Edit, pp. 131–146). John Wiley & Sons, Inc.

LAMPIRAN





The International Conference on Science and Applied Science

Secretariat: Physics Department, Graduate Program,

Universitas Sebelas Maret

Jl. Ir. Sutami 36A Kentingan Surakarta, 57126.Telp./Fax (0271) 632450

Psw 308

Email: icsas.uns@gmail.com Web: <https://icsas.uns.ac.id>

LATTER OF ACCEPTMENT

Dear Ms Atim Ainul Hidayah, et al

Congratulations! We are pleased to inform you that your manuscript entitle :

"Utilization Of Coffee Pulp As Substrate For Pectinase Production By Aspergillus Sp. VTM5 Through Solid State Fermentation"

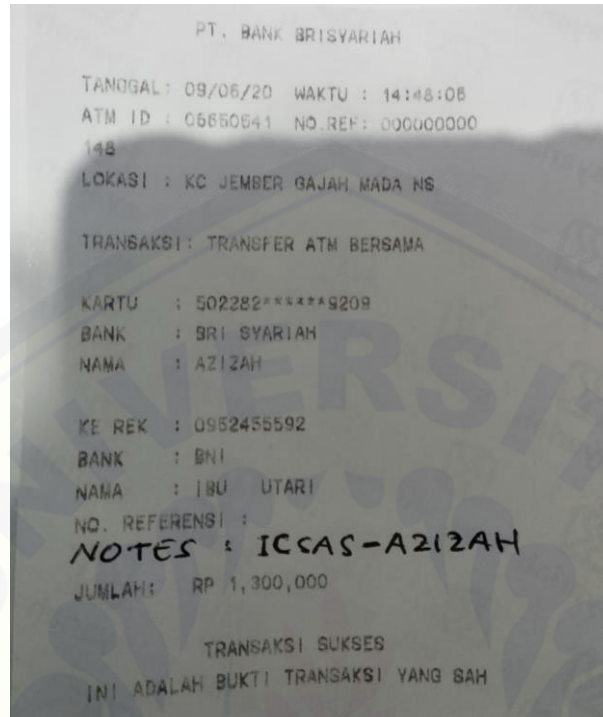
Has been has passed the reviewing process and accepted to be presented at the The International Conference on Science and Applied Science (ICSAS) 2020 which have been held online on 7 July 2020. The presented manuscript will be published in indexed Journal or AIP Proceeding indexed by Scopus

For educational fields, please add some analysis about the concept which are related to your fields. Thank you and looking forward to your participation in this event.

Surakarta, 10 June 2020
Chairman,

Prof.Dr.Eng.Budi
Purnama,S.Si.,M.Si.

Bukti Pembayaran *The International Conference on Science and Applied Science (ICSAS) 2020*



No. : XX-7028/P/ICSAS/2020

RECEIPT

Received from : Azizah

Amount paid : One Million Rupiah

For the payment of : Scopus indexed publication (AIP Conference Proceeding) of
International Conference on Science and Applied Science (ICSAS)
2020

IDR 1,000,000

Surakarta, 14 July 2020



Prof. Dr. Eng Budi Purnama, S.Si.

Morphological and Biochemical Characteristic of Endosymbiont Cellulolytic Bacteria from Gut of *Hypothenemus hampei* Ferr. and Its Enzyme Activity

Azizah¹, Purwatiningsih¹, Hidayat Teguh Wiyono¹, and Kahar Muzakhar^{1,a)}

¹ Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Jember

^{a)}Corresponding author: kaharmzk@unej.ac.id

Abstract. *Hypothenemus hampei* Ferr. is one of the most destruction pest in coffee berry. To control this pest by synthetic insecticide is harmful and damage for environment. A strategy to control *H. hampei* is by studying its life cycle. The egg stage until adult of *H. hampei* lives inside coffee beans and utilize polysaccharides of coffee beans as source of its metabolism. The result of investigation showed that in gut of *H. hampei* was found cellulolytic bacteria Isolate 10 (ISH 10) which is suspected as endosymbiont bacteria that helps in the digestive process and metabolism of *H. hampei*. Morphological characters of ISH10 colony are circular, flat elevation, edge of entire colony, and the cell shape is rod. ISH 10 was gram positive bacteria which gave positive results in catalase and negative for oxidase test. In addition, ISH 10 is able to ferment some sugars media test such as glucose, sucrose, fructose and mannitol. ISH10 produced positive reaction in simmon citrate and urease test, and ISH 10 unable to reduce nitrate. Based on results, ISH 10 similar to genus *Brochothrix*. ISH 10 can also produce cellulase with the highest activity of the crude enzyme 0,031 U/ml only in 72 hours of incubation at 30°C against 0,5% CMC in 20 mM acetate buffer pH 5. Further characterization of this cellulase is needed so that it can interfere the digestion of *H. hampei* through endosymbiont cellulolytic bacteria by using inhibitor or environmental factor of its cellulase enzyme.

INTRODUCTION

Coffee is one of important commodities in Indonesia. Coffee production in Indonesia is around 6,6% of production in the world, so that making Indonesia as the third largest coffee producing country [1]. However, in recent years (2013-2018) coffee production in Indonesia has declined significantly. This significant decline caused the decline in Indonesia's position as the third coffee producer in the world to become the fourth position in the world after Colombia [2]. One of the reasons for the decline in coffee production is caused by the activity of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei* Ferr.).

H. hampei is a main and most destructive pest in coffee beans. Adult females of *H. Hampei* make hole on coffee fruit and lay eggs in the coffee fruit. After the eggs hatch, the larvae of *H. hampei* eat the endosperm of coffee beans. Feeding activity of this pest causing a decrease in the quality and quantity of coffee fruit up to 40% [3]. All life cycle of *H. hampei* occur inside of coffee beans even though there are some toxic content in coffee such as caffeine

So far, synthetic insecticide is used to control *H. hampei*. The use of synthetic insecticide can cause some problems such as resistance and resurgence of the pest, water and soil pollution, as well as threats to human health [4]. One of the alternative to change synthetic insecticide is the use of botanical insecticide. The use of botanical insecticide is more environmentally friendly, however the results of botanical insecticide application are relatively longer, so that it is still a problems among coffee farmers. Therefore need another way to control this pest that the entire life cycle occurs inside coffee bean with control through its metabolism.

Life cycle of *H. hampei* which is dominant in coffee beans with high caffeine content shows that this insect has high adaptability and tolerance to environmental conditions in coffee beans. This ability is due to symbiotic between *H. hampei* with degrading bacteria in the digestive tract. One of endosymbiont bacteria in *H. hampei* is caffeine

degrading bacteria such as group of *Pseudomonas* [5]. In addition to endosymbiont bacteria that help to degrade caffeine, *H. hampei* also need a simple carbon source for its metabolism. Simple carbon source can be obtained by breaking down polysaccharide substrate into simple monomer that can be absorbed by *H. hampei*. One of simple carbon source in coffee fruit is cellulose. Cellulose content of robusta coffee is 32-42%, while in arabica coffee is 41-43% [6].

Research on endosymbiont cellulolytic bacteria in gut of *H. hampei* has never been done, so that the aim of this study are to identify endosymbiont cellulolytic bacteria from gut of *H. hampei* based on morphological and biochemical characteristics and to know the activity of its cellulase enzyme. This research will be very useful as a study for the new strategy of handling *H. hampei*.

MATERIALS AND METHODS

H. hampei Collection

H. hampei was obtained from Coffee plantation Durjo, District of Jember. *H. hampei* was pooled from infected coffee berry. Collected *H. hampei*, were killed and disinfected using alcohol 70% to avoid external contamination.

Isolation of Endosymbiont Cellulolytic Bacteria

To dissect *H. hampei*, the methods of Morales-Jimenez *et al.*, [7] with slight modification was employed. Ten *H. hampei* specimens were submerged in 100 µl sterilized phosphate buffer solution (PBS) pH 7.50 mM to avoid external contamination. Adults of *H. hampei* were dissected under sterile condition. Gut of *H. hampei* were obtained by removing the elytra, wings and pulling the last segment of its abdomen. The guts were transferred to 1.5 ml microcentrifuge tube with 200 µl PBS. Gut extraction was crushed with sterile micropipette and suspended using the vortex about 5 minutes. Suspension was diluted in phosphate buffer at a proportion of 1:10. Fifty microlitres of suspension was inoculated on CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) agar plate (CMC 0.5%; NaH₂PO₄ 6 g; KH₂PO₄ 3 g; NaCl 0.5 g; MgSO₄ 0.25 g; NH₄Cl 1 g; and agar 23 g), and then incubated at 37°C for 5-7 days [5]. A single colony of bacteria grown on CMC media was recultured on Nutrient Agar (NA) medium to obtain pure isolate by picking up one loop of a single colony. Every pure culture of the bacteria was maintained on slant medium as stock bacteria culture and stored at 4°C for further analysis [8]. Each bacteria isolate were given code ISH (*Isolat Selulolitik Hypothenemus hampei*) with number on each isolates.

Cellulolytic Degrading Activity Assay

The experiment was adapted from Arimurti *et al.* [9]. Each cellulolytic bacteria was inoculated into 10 mL of Nutrient Broth (NB) as many as one loop each isolates, and then incubated overnight. CMC media 0.5% on plate was made holes by cork borer 0.5 cm. 20 µl culture suspension with equal cell density (1.9 optical density/OD at 600 nm) were filled into each hole then incubated at 30°C for 3 days.

Cellulolytic activity based on clear zone can be known by flooding 10 mL iodine 0.33% on the agar plate for 5 minutes [10]. A clear zone which surrounded the hole were observed and measured using calipers. A clear zone indicated as carboxymethylcellulose degrading activity. Values of Cellulolytic activity index can be calculated using the following equation [11].

$$\text{Cellulolytic Activity Index} = \frac{\text{colony diameter with clear zone (mm)}}{\text{colony diameter (mm)}} \quad (1)$$

Bacterial isolates with the highest cellulolytic activity (the largest clear zone) were selected to identify and test the produced enzyme activity.

Identification of Selected Bacteria

Identification of selected cellulolytic bacteria was based on morphological and biochemical characters. Morphological characters include colony shape, elevation, edge of colony, and cell shape. Biochemical characters include gram staining, catalase, oxidase, motility, carbohydrate urease, indol, reduction of nitrate, and simon

citrate test. Observations results were compared using *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th, Microbiology: A Laboratory Manual*.

Cellulase Production

Production of cellulase methods were adapted from Bakare *et al.*, [12]. The selected cellulolytic bacteria was cultured in CMC 0,5% Broth and incubated for 24 h on shaker (120 rev/min) at room temperature. Crude enzyme was obtained by centrifuging the culture at 8.000 rpm for 10 min [13]. The supernatant is used for testing the specific activity of cellulase enzyme.

Optimization of crude cellulase enzyme production

Optimization of the enzyme was carried out to determine the optimum incubation time in producing cellulase enzyme on CMC media by selected cellulolytic bacteria. Crude enzyme was harvested every 24 hours for 3 days. However after harvesting at 48 hours, the harvesting was done at 60 hours. Crude enzyme obtained were tested for specific activity of cellulase based on their reducing sugars by Nelson-Somogy method.

Specific activity of cellulase were carried out based on Nelson [14] that have been modified. 500 μ l of 0,5 % CMC dissolved in 20 mM phosphate buffer (pH 5) was mixed with 100 μ l of the crude enzyme, and incubated at 37°C for 2 h. After that 500 μ l Somogy reagent were added, then boiled for 15 minutes. The negative control was prepared by adding boiled enzyme. After the solution was cold, added 500 μ l Nelson reagent and 2,5 ml H₂O. The solution were centrifuged at 8.000 rpm for 10 min. 1 ml sampel was used for absorbance measurement using UV-VIS spectrophotometer at 500 nm. The absorbance value converted to glucose concentration based on standart curve [15].

Specific activity of cellulase was determined using the reduced sugar levels. This activity is known in U/ml. One unit of cellulase enzyme activity means the amount of enzyme needed to release 1 μ mol reducing sugar (glucose) per minute, said to be unit per milliliter [9]. Cellulase activity was calculated using the following equation

$$\text{Cellulase activity } \frac{\text{U}}{\text{ml}} = \frac{\text{Reducing sugar values} \times \text{dilution factor}}{V \times t \times \text{BM}} \quad (2)$$

Note : V = volume of enzyme (0,1 ml)
t = time of incubation (120 min)
BM = molecule weight of glucose (180 g/mol)

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the bacterial isolation on CMC media were obtained 17 bacterial isolates that were able to grow. The 17 isolates are endosymbiont bacteria in gut of *H. hampei* that is possible to produce cellulase enzymes. All 17 isolates were tested their cellulose degrading activity based on clear zone formed in CMC media. Based on clear zone test, only 5 isolates showed high degrading activity from 17 isolates. One of selected cellulolytic bacteria that have been characterized is ISH 10.

Morphological and Biochemical Characteristics of ISH 10

Based on macroscopic morphological characters of ISH 10 colony are circular, flat elevation, edge of entire colony. Colony diameter of ISH 10 is 418,2 μ m (Fig 1 a). Cell shape of ISH 10 based on microscopic observation showed that the cell is rod with length 1870 μ m (Fig 1 b).

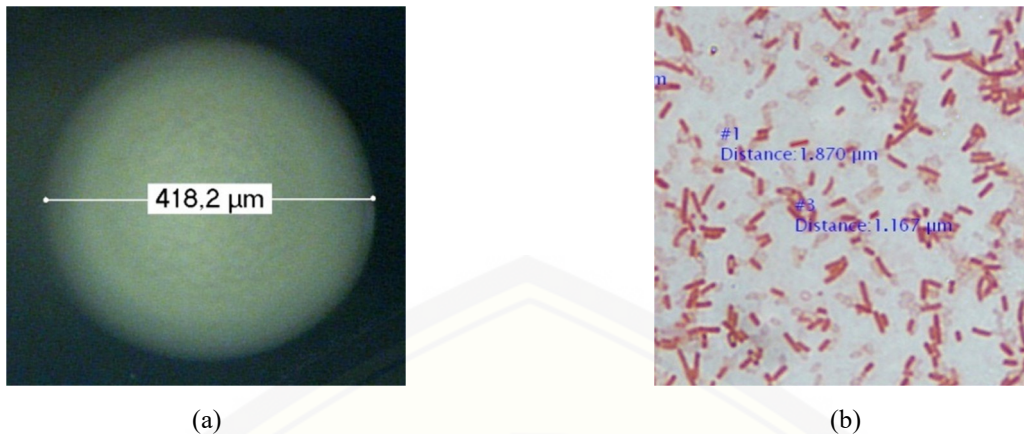


FIGURE 1. Macroscopic and microscopic morphological characters of ISH 10, (a). Colony characteristic of ISH 10 on nutrient agar media 24 hours; (b). Cell shape of ISH 10, 1000x magnification, Olynmpus BX53 F Microscope

Based on biochemical tests, ISH 10 was gram positive bacteria with not slimy KOH test results shown. ISH 10 showed positive result for catalase test with the appearance of bubbles in this test. This is showed that ISH 10 can produce catalase that can break down H_2O_2 to H_2O and O_2 [16]. Beside that ISH 10 showed negative result of oxidase test. It means that ISH 10 does not produces oxidase enzyme which is able to react with oxygen in the respiration process [16]. ISH 10 gave positiv reaction to some media in carbohydrate test such as glucose, sucrose, fructose, and mannitol. This is indicated by the change in color of the media from red to yellow. The change means that ISH 10 was able to ferment some sugar media test. Microbial fermentation is a biochemical activity that is carried out by microbes which convert organic macromolecul compounds into simpler compounds in anaerobic conditions. Carbohydrate fermentation can produce various acidic compound such as lactic acid and propionic, ester, ketons, and gas [17].

Result of simmon citrate test showed that ISH 10 can utilize citrate as its carbon source by forming blue in test media. Based on Hemraj *et al.*, [16] when the colour of medium changed from green to blue, this indicated that microorganisms can utilize citrate as their carbon source. In urease test, ISH 10 gave positive reaction only 21-79 % strain positive by the change color of the media to yellow from red only 20%. ISH 10 gave negative reation in nitrate and indol test. This showed that ISH 10 unable to reduce NO_3 to NO_2 [18], and ISH 10 can not degrade amino acid tryptophan [17]. Based on identification results, ISH 10 similar to genus *Brochrothrix* (Table 1.)

Genus *Brochrothrix* belongs to family Lactobacillaceae. Genus *Brochrothrix* has regular, unbranched rods cell shape with the lenght 0,6-0,7 x 1-2 μm and occurs singlu, in chains, or in long filamentous chains that fold into knotted masses. Coccoid forms appears in old cultures. Genus *Brochrothrix* is gram positive, the cells are not encapsulated, are nonmotile, and are nonsporing. *Brochrothrix* species are facultative anaerobes and are nonpigmented. They grow at a temperature of 0-30°C (optimum 20-25°C). The major fermentation product from glucose is $L(+)$ -lactate. Cells are catalase positive and contain cytochromes. They stain methyl red and Voges-Proskauer positive. *Brochrothrix* species occur mainly in meat product but are widely distributed in the environment [19].

TABLE 1. Comparison of ISH 10 morphological and biochemical characteristics with certain bacterial isolates

Characteristics	Results	<i>Brochrothrix</i> (Holt, 1994)	<i>Carnobacterium</i> (Holt, 1994)
Gram	-	-	-
Cell shape	Rod	Slender rods, often filaments	Coccus
Motility in liquid media	-	-	D
Oxidase	-	-	-
Catalase	+	+	-
Acid from breakdown of carbohydrate (fermentation product)	+	+ (Mainly lactate)	+(Mainly $L(+)$ -lactate)
Carbohydrate Test	Glucose* Sucrose*	+(A) +(A)	

Characteristics	Results	<i>Brochothrix</i> (Holt, 1994)	<i>Carnobacterium</i> (Holt, 1994)
Fructose*	+(A)		
Maltose*	-		
Arabinose*	-		
Lactose*	-		
Mannose*	+(A)		
Spore	NT	-	-
Nitrate reduction	-	-	-
Simmon Citrate Test*	+	-	-
Urease Test*	d	-	-
Indol Test*	-	-	-

Notes : NT : non testes; + : 100-80% strain positive; - : 20-0% strain positive; d : 79-21% strain positive; D : substantial proportion of different species; +(A): positive fermentation with formed acid; * : not as a genus determining character in the identification book

Optimization of crude cellulase enzyme production ISH 10

Optimization of the enzyme was carried out to determine the optimum incubation time in producing cellulase enzyme on CMC media. ISH 10 produced crude enzyme with the highest activity (0,031 U/ml) at 72 hours incubation time (Fig. 2). The crude enzyme activity of ISH 10 is small because the activity value is less than 0,1 U/ml. thi is different from cellulase enzyme produced by *Bacillus* sp. Based on the research of [20] showed that the result of cellulase crude enzyme activity produced by *Bacillus cereus* were 0,104 U/ml.

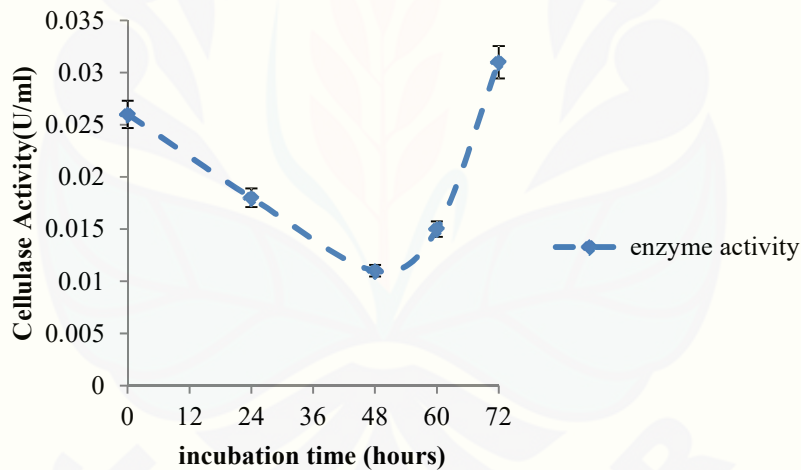


FIGURE 2. Curve of activity enzyme from the optimization of cellulase crude enzyme by ISH 10

This result indicated that ISH 10 has cellulase activity although the value is small. Some species of *Brochothrix*, *Brochothrix thermosphacta* was known to be able to hydrolyze cellulose [21]. This showed that some species of *Brochothrix* are able to produce cellulase, but no research has been conducted to find out specific activity of this enzyme. This result can be used as preliminary research on alternative control of *H. hampei*. Based on Berasategui *et al.*, [22] and Macedo and Freire [23], knowledge about interaction between endosymbiont microbe and host insect can be exploited in two different ways. One way is by targeting or utilizing symbiotic interaction to control agricultural pests. This control can be done from microbial interactions or by damaging insect digestive enzymes.

CONCLUSION

ISH 10 is an endosymbiont cellulolytic bacteria from gut of *H. hampei*. Based on the morphological and biochemical characteristics, ISH 10 is similar to genus *Brochothrix*. ISH 10 has highest cellulase activity 0,031 U/ml in 72 hours of incubation time at 30°C in broth medium of CMC 1%. This results indicate can be used as preliminary research on alternative control of *H. hampei* Further characterization of this cellulase is needed so that it can interfere the digestion of *H. hampei* through endosymbiont cellulolytic bacteria by using inhibitor or environmental factor of its cellulase enzyme.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors convey respect and thank to the Biological Interaction Group in KeRis (Kelompok Riset) on behalf Purwatiningsih, Ph.D which has funded this study.

REFERENCES

- [1] Kemenperin. Produksi Kopi Nusantara Ketiga Terbesar di Dunia. <http://www.kemenperin.go.id/artikel/6611/Produksi-Kopi-Nusantara-Ketiga-Terbesar-Di-Dunia>. (2013). [accessed on September 27th, 2018]
- [2] Indonesia-investment. Coffee in Indonesia, Production and Export Indonesia Coffee. <https://www.indonesia-investment.com>. (2017). [accessed on September 27th, 2018]
- [3] F. E. Vega, F. Infante, A. Castillo, dan J. Jaramillo. The Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): A Short Review, with Recent Findings and Future Research Directions. *Terrestrial Arthropod Reviews* **2**, 129-147 (2009).
- [4] R. Rukmana dan U. S. Saputra. *Hama Tanaman dan Tenik Pengendalian* (Kanisius, Yogyakarta, 1997).
- [5] J. Ceja-Navarro, F. E. Vega, U. Karaoz, Z. Hao, S. Jenkins, H. C. Lim, P. Kosina, F. Infante, T. R. Northen and E. L. Brodie. Gut Microbiota Mediate Caffeine Detoxification in The Primary Insect Pest of Coffee. *Nature Communication* **6**, 7618-7626 (2015).
- [6] H. D. Belitz, W. Grosch and P. Schieberle. *Food Chemistry*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 2009).
- [7] J. Morales-Jimenez, G. Zuniga, L. Villa-Tanaca and C. Hernandez-Rodriguez. Bacterial Community and Nitrogen Fixation in the Red Turpentine Beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Scolytinae). *Microbial Ecology* **58**(4), 879-891 (2009).
- [8] K. Muzakhar, Sutoyo and A. B. Saragih. Phosphate Solubilizing Bacteria Adaptive to Vinasse. *Journal of Mathematical and Fundamental Science* **47**(2), 219-225 (2015).
- [9] S. Arimurti, Y. Nurani, T. Ardyati and S. Suharjo. Screening and Identification of Indigenous Cellulolytic Bacteria from Indonesian Coffee Pulp and Investigation of Its Caffeine Tolerance Ability. *Malaysian Journal of Microbiology* **13** (2), 109-116 (2017).
- [10] R. C. Kasana, R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt and A. A. Gulati. Rapid and Easy Method for The Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology* **57**(5), 503-507 (2008).
- [11] I. Delalibera, J. Handelsman and K. F. Raffa. Contrast in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms Between the Wood Borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the Bark Beetles, *Ips pini* dan *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Environment Entomology* **34**(3), 541-547 (2005).
- [12] M. K. Bakare, I. O. Adewale, A. Ajayi and O. O. Shonukan. Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology* **4**(9), 898-904 (2005).
- [13] N. Nelson. A photometric adaptation of the somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* **153**, 375-380 (1994).
- [14] K. Muzakhar. A Consortium of Three Enzymes: Xylanase, Arabinofuranosidase, and Cellulase from *Aspergillus* sp. which Liquefied Coffee Pulp Wastes. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* **546**, 1-7 (2019).
- [15] S. Ubaidillah and KI. Muzakhar. Sugar-Rich Hydrolyzates from Coffee Pulp Waste which Produced under Solid State Fermentation of *Pestalotia* sp. VM9 and *Aspergillus* sp. VTM5, and Its Efficiency as Medium for Single Cell Protein *Saccharomyces cerevisiae*. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* **546**, 1-7 (2019).
- [16] V. Hemraj, S. Diksha, and G. Anveet. A Review on Commonly Used Biochemical Test for Bacteria. *Innovare Journal of Life Science* **1**(1), 1-7 (2013).
- [17] A. Talaiekhozani, S. Alaei and M. Ponraj. Guidelines for Quick Application of Biochemical Tests to Identify Unknown Bacteria. *Accounts of Biotechnology Research* **2**(2), 65-82 (2015).
- [18] A. R. A. Alatawi, Sutarno, A. Susilowati, and H. W. Hailu. Biochemical and Molecular Characterization from Food Stall Vegetables. *British Microbiology Research Journal* **5**(5), 405-411 (2015).

- [19] J. Holt, N. Krieg, P. H. Sneath, J. Staley and S. Williams. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9^{ed}. (A Wolters Kluwer Company, Philadelphia, 1994).
- [20] N. Nema, L. Alamir and M. Mohammad. Partial Purification and Molecular Weight Determination of Cellulase from *Bacillus cereus*. *Internation Food Research Journal* **23(2)**, 894-898 (2016).
- [21] E. Stackebrand and D. Jones. The Genus *Brochothrix*. *Prokaryotes* **4**, 477-491 (2006).
- [22] A. Berasategui, S. Shukla, H. Salem and M. Kaltenpoth. Potential Application of Insect Symbionts in Biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100 (4)**, 1567-1577 (2016).
- [23] ML. R. Macedo and M. G. Freire. Insect Digestive Enzyme as A Target for Pest Control. *Invertebrate Survival Journal* **8**, 190-198 (2011)



Certificate of Attendance

029/ICSAS/VI/2020

to

Azizah

as

Speaker

in "International Conference on Science and Applied Science"
Surakarta, Indonesia on July 7th, 2020
organized by Physics Department, Graduate Program, Faculty of Mathematics
and Natural Sciences Universitas Sebelas Maret



Dean of FMIPA UNS

Drs. Harjana, M.Si., M.Sc., Ph.D.

Chairman



Prof. Dr. Eng. Budi Purnama

Dokumen pendukung luaran Wajib #1

Luaran dijanjikan: Artikel di Jurnal Internasional Terindeks di Pengindeks Bereputasi

Target: Accepted

Dicapai: Published

Dokumen wajib diunggah:

1. Artikel yang terbit

Dokumen sudah diunggah:

1. Artikel yang terbit

Dokumen belum diunggah:

- Sudah lengkap

Nama jurnal: AIP Conference Proc.

Peran penulis: corresponding author | EISSN: 978-0-7354-4030-2

Nama Lembaga Pengindek: SCOPUS

URL jurnal: <https://aip.scitation.org/doi/pdf/10.1063/5.0030576>

Judul artikel: Morphological and Biochemical Characteristic of Endosymbiont Cellulolytic Bacteria from Gut of Hypothenemus hampei Ferr. and Its Enzyme Activity

Tahun: 2020 | Volume: 2296 | Nomor: 20013

Halaman awal: 0 | akhir: 0

URL artikel: <https://doi.org/10.1063/5.0030576>

DOI: <https://doi.org/10.1063/5.0030576>

Morphological and biochemical characteristic of endosymbiont cellulolytic bacteria from gut of *Hypothenemus hampei* Ferr. and its enzyme activity

Cite as: AIP Conference Proceedings **2296**, 020013 (2020); <https://doi.org/10.1063/5.0030576>
Published Online: 16 November 2020

Azizah, Purwatiningsih, Hidayat Teguh Wiyono, and Kahar Muzakhar



View Online



Export Citation

ARTICLES YOU MAY BE INTERESTED IN

Utilization of coffee pulp as a substrate for pectinase production by *Aspergillus* sp. VTMS through solid state fermentation

AIP Conference Proceedings **2296**, 020012 (2020); <https://doi.org/10.1063/5.0030474>

Efficiency of cellulase production using coffee pulp waste under solid state fermentation by *Aspergillus* sp. VT12

AIP Conference Proceedings **2296**, 020020 (2020); <https://doi.org/10.1063/5.0030482>

Crackle detection in lung sound using statistical feature of variogram

AIP Conference Proceedings **2296**, 020014 (2020); <https://doi.org/10.1063/5.0030369>



SHFQA
Quantum Analyzer
8.5 GHz

Zurich Instruments

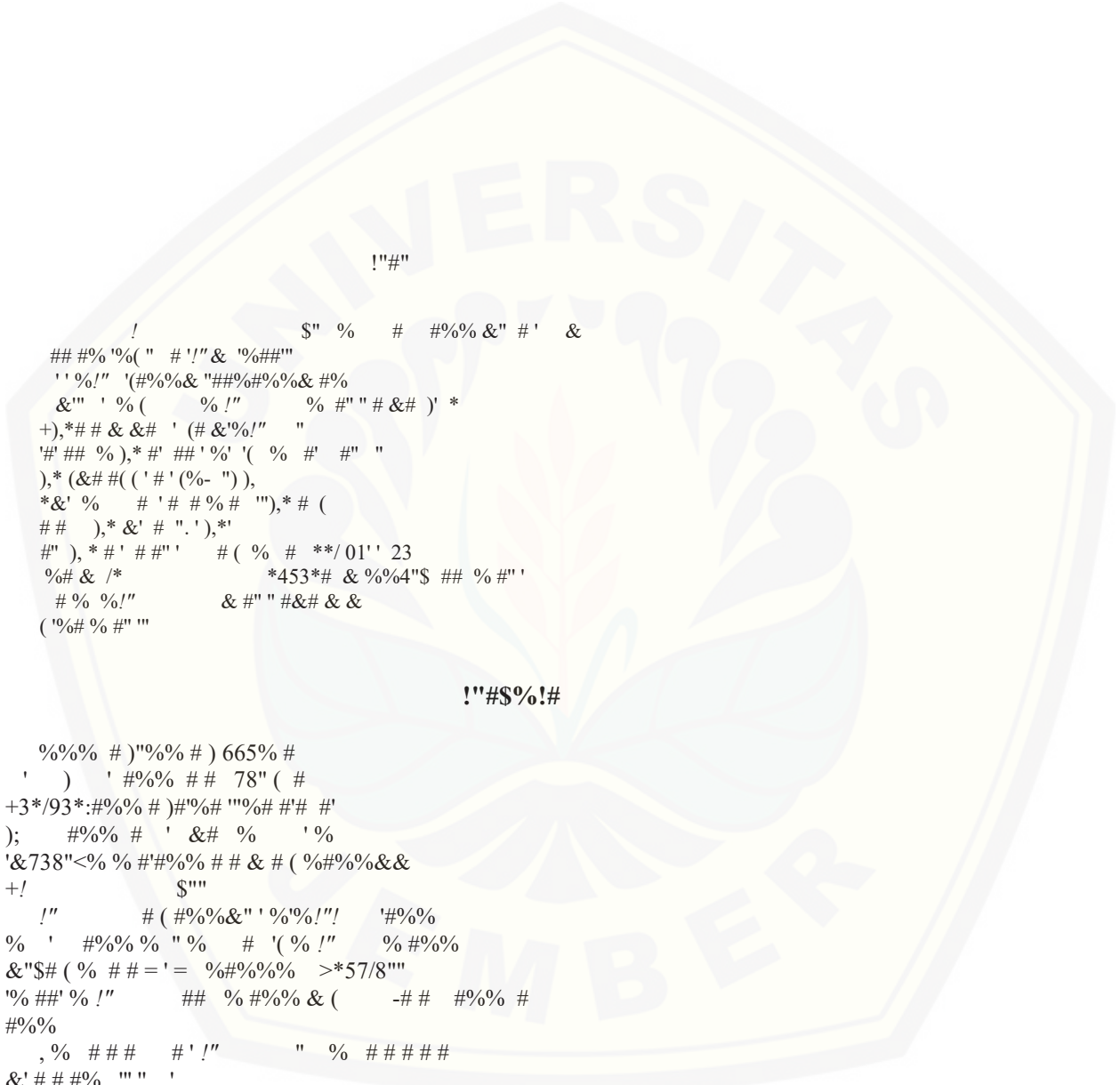
Your Qubits. Measured.

Meet the next generation of quantum analyzers

- Readout for up to 64 qubits
- Operation at up to 8.5 GHz, mixer-calibration-free
- Signal optimization with minimal latency

[Find out more](#)

Zurich Instruments



!"#"

! \$" % # #%%&" #' &
##%%"(" #'!"& '%##"
' '%!" '(##%& "###%#%&#%
&" ' %(%!" % #" "#&#) *
+),*## &# ' (#&'!" " "
'## %),*# #' '% '(% #' #' "
) ,*(&##(('# '(%- ") ,
&' % # '# #%# "'),# (
) ,*&' # ". ') ,*
#'') ,*# ' #'' ' # (% # **/01' ' 23
%# & /* *453*# & %4"\$ ## % #' "
% %!" & # " "#&# & &
('%# % #' "

!"#\$%&#

%%% #)"%%#) 665% #
') ' #%% # # 78" (#
+3*/93*:#%% #)#%# ""%# ## #
) ; #%% # ' &# % ' %
'&738"<% # #%% # # & # (%#%&&&
+! \$"
'" # (#%%&" ' %!" ' ' #%%
% ' #%% % " % # '(% !" % #%%
&"\$# (% # # = ' = %#% % % >*57/8"
'%##' % !" ## % #%% & (-# # %%% #
#% %
, % ### #' !" " % #####
&'###% "" " '
7>8" < % ' (# ### % & #' ## " % & #'
("% (' % & #' ## #' '(
' "&'#% % % "% #'
'%### ## % & #' &"
'?%##'!" # #%%& #%% # #
&' '# (# #%%&"&' & #&
!" &# (# "< % & &# !" #%%

&# # % \$ 748") & &# ' #%%!" ' '#& #% &"',#& ##&& & & '## & ' #&&& &!" "<% ' &##%#% % #'""# %& #%%/39>35 '&##%>9>/5768"
@#&#" "#&# %!" (& %
% & #" "#&# % %!" & '#
&### # # (%#" ""#&(% '
% %!" "

!'"&' \$!(#S'

!" &%%%' A !A # %B&!"!""%# #%%&""#!" "%# '#2*5 (-# "

#!" %'9B"728' %# ""!" # & ** C' ' &%%%' + ., 2 4* (-# ""%!" # '# "D %!" & & (' " ' % &" % 4' ## % & 3**C' .,"D-## '#' (- & 4 ", ' &%% % %*" \$% #' % #' +%# %' +*45EF F'*4E 3,< >*"34EF >'E3/# & /2 %&## ' F +F & ' &# '%#"G(#' % &# ' #&# #' > % % '7:8" G# &# ' (#), + & ! &# " "

³ >6E < ₃ >'E < %492748""#

\$

- % " 7H8" G# #" "# &# #' *? % F .+F.'# # & ("*45' '&##*4#"3*C#' = '#'+H #' 1<A 6** %" #' # & /* %/" ""## (& #' # & &' *? *//5 ' % 4 7*8" #' # ' &(#' #' #&- '#"'# ("I'%" ""## (-#&##' %"= 78"

""## (-)J $\frac{\# \# +}{\# +}$ +

.#'' #' "## (+ ' #' #' % ## ("

,

)%# % '# #' "# &# & #' &## ## " #' ## #' #' (% #' #' "# ## #' #' - ' #& ' # %

" <&(' # ' ()
)*+ ")

% #' ' % . " 738" ' # #' " # &#
'*45. # & %3>+3*(1 " & & # #' : " *** % * 7/8" %
#%## (%#' " "

#

< % # # & # #' '
& '# #' "# &# " ((3> % / "
(% (>: (6* " & %
#%## (%#' '& # &F'9, "
,#%## (%#' ' # & F' 7>8 (& %" 4** C' % *4 5
'(3* & %% +4 - ** C' % # # &
/2 % 3 " % 4** C', &'%4 " (#'
&&' "% '#4**C'F' 34'
' # % : " ***%*" "%&&# 0I9I),
4** " &&# (' # ## & # (748"
,#%## (%#' ' # ' (" # (01" <
%#' '# (% 'C' # + '#
& " 7H8"" '# (#' ' %" =

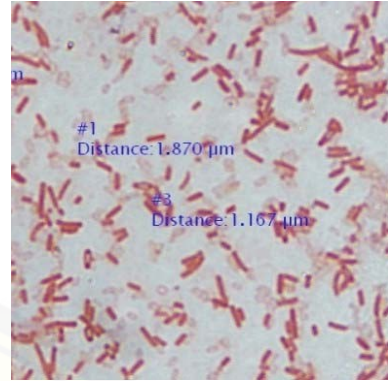
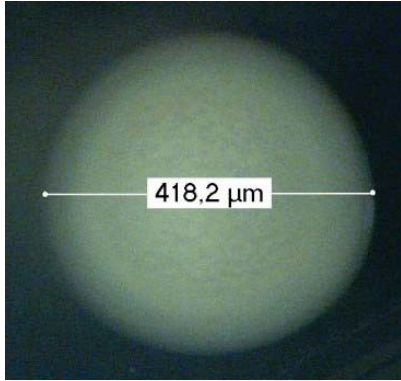
"# ($\frac{0}{1} J \frac{@#('-%#}{1-} +3$
FI J('%+*'
J%# & +3*
. J' #' % #+:*1'

""%&!' \$\$%' '#

'% &# " & 2&# " &' "
2' & &# %!' " &' ##' ""'2
' #' ' # (& #' % " . #
'4' # (%2' "<%#' #' " #&#
(&##),*"

'(*+

. ### '# ## %), * # #' #' %' '(%
#"" %),H),>:3C+\$""%),*&###&(#
#"' :2*C+\$&"



+

+&

%"*#####'### %),*+### #%),*
3> E+&'""%),***-.%# <' .K4/\$##

. &##'),* (&# '< ' "),*
(' % #' # % & &&' "),* #
##' #& 3<3 3<< 3768".),* ('%-
)),* # - # &' # -
#768",*((# #& #' # % #
"'# & ##%' % ""#),*
&' % "#&' % &##' (# &##&
(##' #' ' # &## " &
% # # (### #' # ### 728"
@ ' % #),* # ' # # & # % & '
" . ! 768 #' % # % &' #
' # # & # "),*((# '392H5
(& ##%' "%'3*5"),*((' "),* &' #F< / F< 37:8),*## #
728". % # '),*# #+&'"
D #&' %'?# &##'"D #' &##"
' *69*2 - 93 ## ' # ' % ' # %'
"##%' #' "D # (#' #'
" ##%' #' (& "
% *9/* + 3*934 " !% # % '# ?+L 9# " "
'(## #' 'I9 (" ##
' # &' & (7H8"

!&*%),*#'&### ## &# "

	"	,(-*..0	,(-*..0
D	9	9	9
"	@	,% %'	##
' =	9	9	A
<-	9	9	9
'	L	L	9
#%&%			
#& +%	L	L+"#	L+ ?+L 9
#			
&	D' # M	L+	
	, #M	L+	

	"	,(-*./0	,(-*./0
\$ # M	L+		
' M	9		
& M	9		
?# M	9		
M	L+		
,	F	9	9
F #	9	9	9
, M	L	9	9
0 M		9	9
)' M	9	9	9

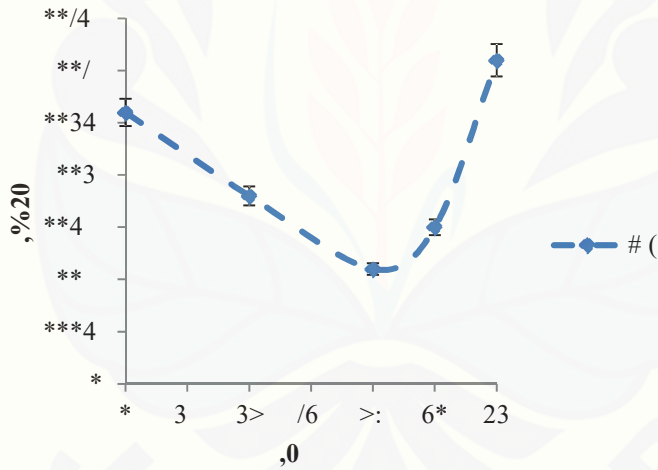
FF EL**9:*5 (E93*9*5 (E2H935 (EA & ' %%% #EL+ (% % #EM ##

%# &

#

'(*+

< % # # & # #' '
 "), * ## # (+**/ 01' 23
 # & +\$ " 3" # # (%), * " & # # (' ' *
 01" % % % # " ' # & ". # % 73 * 8
 ' % # " ' # # (# & ** > 01"



%"1 (%# (% % # " ' # &),*

' #), * # " ' # (' (" " , # % #
 # & & ' ' # " ' 738" # %
 # & ' # # " ' & # & # # % # % # # (%
 " ' # & ' # (# % ! " " ..
 " 7338 # \$ 73/8 ' & # & & # &
 # # & - ' % % " < & ' & # # # '
 # ' ' " # # & % # & ' # & # ("

&%'#

), * & #' "#&# % % !" " . '#
&### #),*# #),*# #' (**/01'
23 % # & /* & % 5" ' # # &
'# (# '%!' \$ ## % #' '
% % !" & #' "# &# & &
('%# % #' "

3 #4&\$!'

#(# .#')# D @ +' @ &'%
"A#% "

"" '

78 " 11""1 '1661 99F 9 9&9A9A " F & A "
7##, &32 3*:8 +3*/"
738)9(" %%)) # G-) %%" 11"9 3*:8
("#"+3*2"7##, &32
7/8 \$"G"IS"% " "B"B""%%.! +\$
' # !, @(@# \$\$ @#A# ",
*-"13H9>2+3**H"
7>8 @@" 0", " ! , &\$ +N HH2"
748 B"!9F(\$ "G"IO"O", "B"?? "\$")% "@F
G" ?" . " D #& %%% A -%#)# %%%"
% 526:92636+3*4"
768 "A". "D# ",#&"% "+,9I."&.'3**H"
728 B" '9B D" O ?" I"9# " 9@ " .#'
F \$- @ .: ? +' #'
,# " /67,0:2H9:H+3**H"
7:8 " , ".", " ;' &.'# (I"
/8,103H9334+3*4"
7H8 " N" F " , , !", #) %# %) "" #
,# %)%%% ') (%)%%#&' "
*9,10*H96+3*2"
7*8 @"" @' ' " A, " A " " D" " @ G % A # %
#&" " ' 0D;)"% 68,604*/94*2+3**."
78)" A"& B" " " \$" @%%%" " "## (% D #
. . '+' &# . . '
' # " / / 9,90-4>94>2+3**4"
738 "".)"<""!<"<" , " %%% ## %##" "%
'9 (%\$ " * /,0
:H:9H*>+3**4"
7/8 F" F" " # % % % ' #"
% *69/249/!*+HH>"
7>8 " " % G K' &% " " %
*"#=?= %%% " " 0\$% ") / 6/5
92+3*H"
748 , " 0&")" " , 9@#' %%% " # #
, ' \$ %\$ "IH*"14) G%%## %
, " " 0\$% ") / 6/592
,+3*H"
768 I"!."AD" ("@('0.## %.# "
+ *,*092+3*")
728 "" "" !"D' % P # '# % .##) %
0.# ** -1,10649:3+3*4"
7:8 "@ " ' ' , ' ' " ' " .## ' #' #
%\$, "I &" -6,60>*49>+3*4"

7H8 B" F" " ", B" , ' , "" "" ' H
+ ' "HH>"
73*8 F" F? "" "" ' %# ' # ' A %" '
% " - 19,10:H>9:H:+3*6"
738 G" , #& A" B" D #"\$&/>229>H+3**6"
7338 " . : , ' ' , ' " , ' " " ' ,
' # %) # , &
. # " * * + + , / 0 4 6 2 9 4 2 2 + 3 * 6 "
73/8 ? " @ " # " D " \$ ") # A (G % " "
7H*9H:+3*



Dokumen pendukung luaran Tambahan #1

Luaran dijanjikan: Artikel pada Conference/Seminar Internasional di Pengindeks Bereputasi

Target: Terbit dalam Prosiding

Dicapai: Published

Dokumen wajib diunggah:

1. Artikel yang terbit

Dokumen sudah diunggah:

1. Artikel yang terbit

Dokumen belum diunggah:

-

Peran penulis: corresponding author

Nama Konferensi/Seminar: The International Conference on Science and Applied Science (ICSAS) 2020

Lembaga penyelenggara: Universitas Sebelas Maret

Tempat penyelenggara: Universitas Sebelas Maret

Tgl penyelenggaraan mulai: 21 April 2020 | Tgl selesai: 21 April 2020

ISBN/ISSN: 978-0-7354-4030-2

Lembaga pengindeks: SCOPUS

URL website: <https://icsas.uns.ac.id/?schedConf=icsas2020>

Judul artikel: Efficiency of cellulase production using coffee pulp waste under solid state fermentation by *Aspergillus* sp. VT12

Efficiency of cellulase production using coffee pulp waste under solid state fermentation by *Aspergillus sp. VT12*

Cite as: AIP Conference Proceedings **2296**, 020020 (2020); <https://doi.org/10.1063/5.0030482>
Published Online: 16 November 2020

Farah Salma Elida, Azizah, Hidayat Teguh Wiyono, and Kahar Muzakhar



View Online



Export Citation

ARTICLES YOU MAY BE INTERESTED IN

Utilization of coffee pulp as a substrate for pectinase production by *Aspergillus sp. VTMS* through solid state fermentation

AIP Conference Proceedings **2296**, 020012 (2020); <https://doi.org/10.1063/5.0030474>

Morphological and biochemical characteristic of endosymbiont cellulolytic bacteria from gut of *Hypothenemus hampei* Ferr. and its enzyme activity

AIP Conference Proceedings **2296**, 020013 (2020); <https://doi.org/10.1063/5.0030576>

Effects of sub-cooler on cooling performance of air conditioning system with natural refrigerant R290

AIP Conference Proceedings **2296**, 020022 (2020); <https://doi.org/10.1063/5.0030376>



Your Qubits. Measured.

Meet the next generation of quantum analyzers

- Readout for up to 64 qubits
- Operation at up to 8.5 GHz, mixer-calibration-free
- Signal optimization with minimal latency

[Find out more](#)





!"#\$%\$
&'()" \$%

% * % &%&&%%&& + ,
+ %%%* \$,% %+%
% %& % %%% % -(\$&+% %
\$/'0 1& 2 %&& \$,*
+ % % +&'3%&& %+ '3
%(36&'03+\$% * %'475%
(86&9- 3).%:%2 %&&03)\$ %
\$\$ (14 8\$, & % &%&&
% 1+ %%%&& % %%+
% \$

45

!"#\$% !\$"

, ;% ++ % %%&&&< / \$\$
-'0\$333='>\$&& %% + &1
% + % \$& 1 % %+ % %&&
=0>\$&%&& +)3.&%&&+ %\$ %%%
%&& % %%% % % %
& %&& \$ %& %&& %&& &
* %%%%=(>\$&& % *1 &1
%%&& % %\$?&1
% % * & % *
=;>\$
&& % %%%& %%%
%&& %2-(=0>\$% & & %%% &
12'; 1@1A1%:12'; 1@1A1%@1% \$% :+ %
* %%%%& %%% %
+=)-8>\$ & &+ % &
% : % &% % &=49>\$
?& % + %+% %%%+ \$/'0\$
+ &* % %& &\$ \$/'0
% %%% * %:%2 & %
% % % *'3'4B5;;B5='3>\$& \$/'0
% %+ %&& + % %%%2-(. \$
1& % %&& % % %
=">\$

:%*+% % & &
%&& % % %&& % % * \$

& #! ' ""%&(\$%

!

\$/0+ 1%CA: +%(36&80
\$& +%9D%&& :% +%(36&31'-4
\$ & +% %*0;\$,+ +
& \$/0+ %%'3 4 5 %&& % % ='0>
& +% %*0;&31'-4\$

) *+

1& + & 0)3&+ %%'3&%&&
+ 03+%2!'0 \$&+ '0'6&0) %
\$,%2 \$/0+ %%'3 4 5 +'
%(36&31'-4='(>)\$

(, - .

%+**0;\$* %+ 03&
E% 33'.F '.F % 2'03 &'0\$%
+:%+ & % & 4333 &) \$ +
%&:%='(>+ ;6='->\$

, *)" +

% & % + 1F * & + 3).
%:%2 %&&03)+ % *
% \$)33B&+ %(86&03 +\$ +
)3B&% %(86&0\$ %)33B+
+ &') \$& +%33B&F0\$)&
\$%&+ % + +*)33\$
%*+%*%*%&+*%& +
%*% * &+% * &%'8>\$

o? +

\$. . (

% & % * (14='4>2 (1)&%
&&)\$)14& && %\$:&&&
+ %(86&;& & :
='>\$

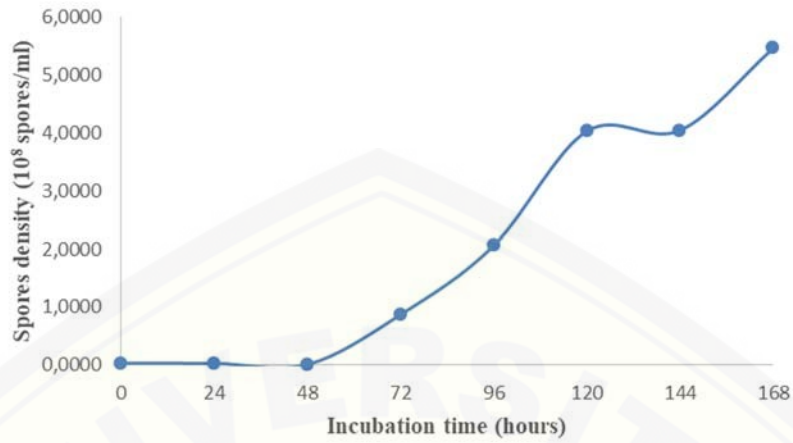
#' ""% % ! ! \$"

%

\$/0%%'3 4 5& &9- %
:%03-G'3 4 5\$ & \$/0 % & %& ;4'-4
\$ % % +9-% %'3
+ % % 1& ='0>\$ %++ * + %

4 5

*% =';> & \$/0 %&\$%
 + % & %%% + '\$

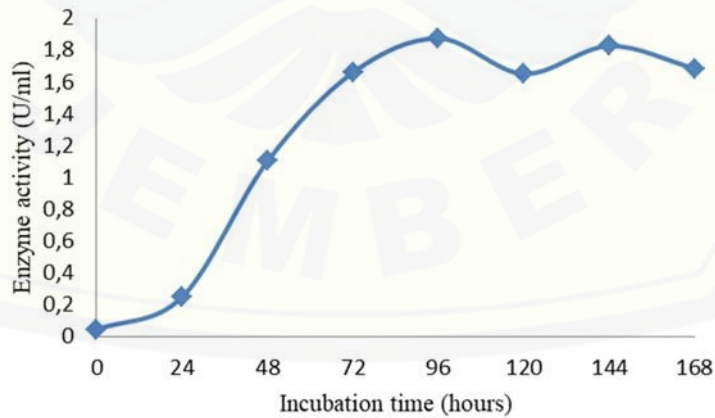


!/# & \$/0 %&;4'-4

\$.

? &%% % '3
 % % % 0('3)8B5+9-\$%
 % * & \$/0 % +475 + % *
 2 0 \$ \$/0%&%&& %%%+ &%
 % %\$ & & % % % %
 \$/0%++%&& %&& % &%&&
 %2-(. =0'9>\$% * '031'-4 % ++
 %%%& & & \$ %&+
 % & % * +% % %& % \$? &
 %%%&%& =03>\$% * +% '03'-4 %
 + %%% &%&& %%% & %
 % \$/0%=0'>\$

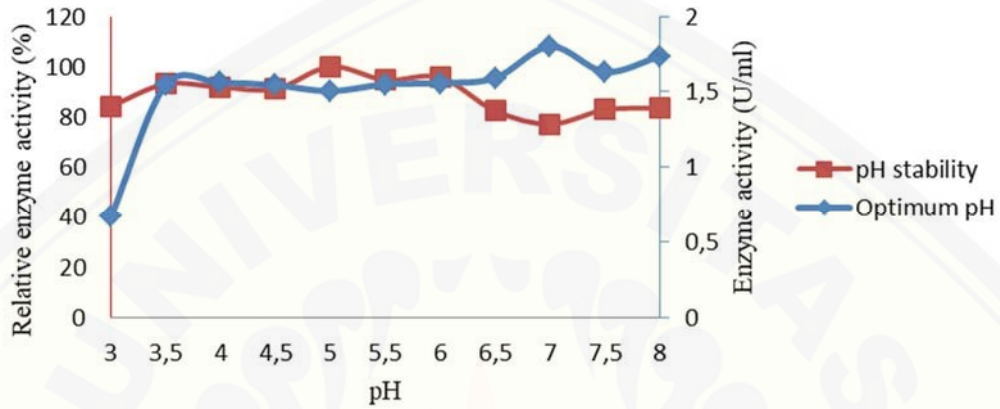
4 5& \$/09- % \$



!/#% * & \$/0

\$. . (

C% &% &%&%% \$ % %* **
 % %& % & %\$ (+
 % * + 8 + (42*8).& *% * \$
 &&%% * % * =03>\$%% * +
 % &&% 2(86 \$ %%%% %
 \$/0 & %&& + \$%%% *
 (9=00>\$



!/#0 &&%& % %

\$" !\$"

+ % &% % & \$/0
 & %&& +9-2'\$475 ++ (4+
 % * 8\$% % %&& % % +
 % % % * * &
 &%&& +\$

1"\$'%/&"

% +&A HCl C
 &I% % %&I %&, 0303\$

##"

=> ,? 2, && ? \$ C% : \$ +++\$ %\$\$ =08
 03'9>

=0> J\$K\$C 7\$C\$<\$I\$J &< &&&1C +1
 A1A !,& &C% \$ * 8;!
 ;8'1;4'203'(\$

=(> \$I\$E & \$I\$\$,\$J\$C \$*\$I \$I
 J\$/\$J\$< % %&&&C 1 % %
 % & && 1A F %& C && C \$
 % < %\$;0!8)-18-02'99) \$

=;> \$C\$S\$%\$C\$F A\$<I\$S\$< % %C &&&
 C &&&< % % \$ < % % H-!')(1'-020333 \$

```
=> C$<$%A$$%$$ $? &C%
7 +A$& %H&< %$8200 !;81;')020334 $
=> K$ I$$<$, $##$ I$ $ $L
F# $ L $ C
! $H$820 !89193203'8 $
=8> A$ K$ /$ $ J M $ F$ $ $ & H$ K$ $ $ I$
% & % :%& / C10, % <
%% & % $ < %< %'--!)4-1'-3(203'0 $
=4> K$ $ /$ < K$ $ $ $ + $ % & 1%
C%% %<% $7J;0$ % %I%$00(200) !(10'
203'9 $
=9> /$HH$$ $ % ! C% % I+
I* +$(('44103(203'; $$
='3> L $ , & C/
+ 2 $ $H! ,C7 * H203'( $
="> I$ I$ $ $ C $ I$ %% $ C$ I% *% $
< % % H;!(1'420339 $
='0> F$J $ $C A$ I$ I$ /H$K$ % $A$K$ % $ A$ ? * $
% I$K$ $ I$ H$K$F +$, % &K 1C% & +
% % * $ < % % $ ;!)841)4-203" $
=( > $ I$ $ C % &
7 $ < H & % ;0!""91"08203" $
=';> $ + I$ $ I I % & C ?
< % C % + , * $ * %
% % K $ 0(2 ( ! 0)((10)(203'8 $
='> $ $ $ % K E & & & C $ ! N & &
,?C & % ! % % &
);-!14203'9 $
='-> $$ < $ $ C < % * / $ H $ $ $
% $ ;820 !0'9100)203') $
='8> $7 $ $ I I % & & & C + % C %
! $ /9 $ /), & & % % &
C % % % % * $ ;?C & % ! % % ) ; - !
'14203'9 $
='4> $$ A * $$$ C % ? C C & % &
+ C + , $ H & %
< % I % $ 02' !'031'04203'0 $
='9> $ $ $ < $ 7 & / % & J + & $
% $ 942) !-841-4'2033- $
='03> I $ $ $ $ K $ $ I $ & A : % & "
F I I K < 18 ; 0 $ , H % $ ) ' 20 ! - ; 1 ' 83203 " $
='0> F $ $ F $ A $ + $ O $ * $ ? & C %
# J ( $ 0 & I & J * $ C % & ,
& % J % $ 42' !(991;3-203'8 $
='00> $ * $ < $ H $ C & % % & &
$ ! - - ! C & % % & % & + < $ H & %
< ! % $ 9 ( ! ' 10 ) 203 ' ( $
```