



**SKRINING BAKTERI SELULOLITIK ASAL *VERMICOMPOSTING*  
TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT**

**SKRIPSI**

Oleh

**Siti Nur Azizah  
NIM 081810401022**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2013**



**SKRINING BAKTERI SELULOLITIK ASAL *VERMICOMPOSTING*  
TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Siti Nur Azizah**  
**NIM 081810401022**

**JURUSAN BIOLOGI**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2013**

## **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Siti Maisaroh dan Ayahanda Ahmad, yang telah berjuang, mendoakan dan mencurahkan kasih sayang selama ini;
2. adik-adik saya Muhammad Romli dan Muhammad Ihsan Maulana, yang selalu memberikan semangat dan doa;
3. guru-guru saya sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi yang telah memberi ilmu dengan penuh kesabaran dan keikhlasan;
4. Almamater FMIPA Universitas Jember.

## MOTO

Dan orang-orang yang bersungguh-sungguh, akan Kami tunjukkan kepada mereka jalan-jalan Kami. Dan sungguh, Allah beserta orang-orang yang berbuat baik (terjemahan Surat *Al-‘Ankabut* ayat 69) <sup>\*)</sup>

Dikatakan, bahwa manusia yang paling bahagia ialah yang punya hati dan pikiran bersih, jiwa yang sabar serta mempergunakan segala sesuatu dengan ridha. (gubahan Abi Sulaiman Ad Darany) <sup>\*\*)</sup>

---

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2008. *Al Quran dan Terjemahannya*. Depok: Penerbit Al-Qur'an Tajwid.

<sup>\*\*)</sup> Madjid, A.A. Tanpa Tahun. *Kata-kata Mutiara dari Mujahid Dakwah*. Terjemahan Syech Muhammad Nawawi. *Nashaijul Ibaad*. Surabaya: Penerbit Mutiara Ilmu Surabaya.

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Siti Nur Azizah

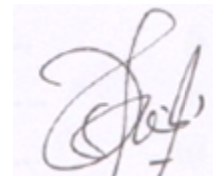
NIM : 081810401022

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Skrining Bakteri Selulolitik asal *Vermicomposting* Tandan Kosong Kelapa Sawit” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh Kahar Muzakhar, S.Si., Ph.D. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari ini tidak benar.

Jember, 6 Maret 2013

Yang menyatakan,



Siti Nur Azizah

NIM 081810401022

**SKRIPSI**

**SKRINING BAKTERI SELULOLITIK ASAL *VERMICOMPOSTING*  
TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT**

Oleh

Siti Nur Azizah  
NIM 081810401022

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Kahar Muzakhar, S.Si., Ph.D.

Dosen Pembimbing Anggota : Sattya Arimurti, S.P., M.Si

## PENGESAHAN

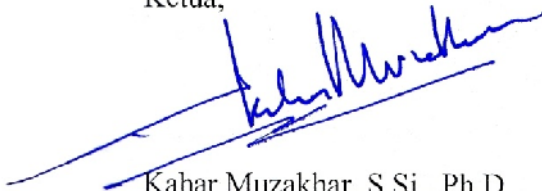
Skripsi berjudul “Skrining Bakteri Selulolitik asal *Vermicomposting* Tandan Kosong Kelapa Sawit” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : **SELASA 23 APR 2013**

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember.

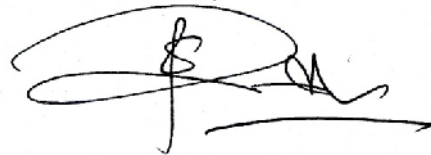
Tim Penguji:

Ketua,



Kahar Muzakhar, S.Si., Ph.D  
NIP 196805031994011001

Sekretaris,



Sattya Arimurti, S.P., M.Si  
NIP 197403311999032001

Anggota I,



Esti Utarti, S.P., M.Si  
NIP 197003031999032001

Anggota II,



Drs. Rudju Winarsa, M.Kes  
NIP 196008161989021001

Mengesahkan  
Dekan,



Prof. Drs. Kusno, DEA, Ph.D  
NIP 196101081986021001

## RINGKASAN

**Skrining Bakteri Selulolitik asal *Vermicomposting* Tandan Kosong Kelapa Sawit;** Siti Nur Azizah, 081810401022; 2013; 31 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

*Vermicomposting* adalah biokonversi materi organik dengan menggunakan cacing tanah sebagai *pioneer* dekomposisi untuk memfragmentasi limbah organik sampai menjadi humus. Pengolahan tandan kosong kelapa sawit (TKKS) melalui *vermicomposting* berlangsung dalam waktu 2-3 bulan. Bahan organik utama dalam TKKS adalah selulosa yang mencapai 45,95%, sehingga agen pendekomposisi selulosa dalam TKKS sangat dibutuhkan. Bakteri selulolitik berperan sebagai pendegradasi selulosa dan banyak ditemukan pada limbah organik yang mengandung selulosa. Penggunaan bioaktivator yang mengandung bakteri selulolitik banyak dimanfaatkan dalam pengolahan limbah selulosa menjadi kompos dan sebagai strategi mempersingkat proses dekomposisi. Oleh karena itu untuk mempercepat *vermicomposting* TKKS dilakukan skrining bakteri selulolitik *indigenous*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri selulolitik potensial dari *vermicomposting* TKKS.

Penelitian dilaksanakan dengan metode deskriptif dalam empat tahap analisis laboratorium secara berkesinambungan. Pada tahap pertama dilakukan isolasi dan pemurnian isolat bakteri dari *vermicomposting* TKKS. Tahap kedua adalah skrining bakteri selulolitik secara semikuantitatif pada media CMC *plate* dari isolat-isolat bakteri hasil isolasi dan dipilih empat isolat bakteri dengan indeks aktivitas selulolitik tertinggi. Tahap ketiga adalah skrining aktivitas selulolitik secara kuantitatif dari empat isolat bakteri terpilih yang diawali dengan pembuatan pola



pertumbuhan, produksi enzim ekstrak kasar, dan analisis aktivitas pembentukan gula reduksi menggunakan substrat yang berbeda yaitu CMC dan alkali ekstrak TKKS. Tahap keempat adalah karakterisasi morfologi pada empat isolat bakteri selulolitik terpilih.

Hasil penelitian diperoleh 51 isolat bakteri dari *vermicomposting* TKKS. Lima puluh satu isolat tersebut merupakan bakteri selulolitik namun ada 21 isolat yang nampak zona beningnya dengan indeks selulase lebih dari 1. Empat isolat yang menunjukkan indeks aktivitas selulase tertinggi adalah isolat 20 (11,90), 40a (10,97), 40b (11,29), dan 49 (11,24). Isolat 20, 40a dan 40b mencapai pertengahan fase logaritmik pada jam ke-18 dengan jumlah sel berturut-turut yaitu  $2,9 \times 10^5$  CFU/ml,  $9,5 \times 10^5$  CFU/mL, dan  $9,2 \times 10^5$  CFU/mL sedangkan isolat 49 pada jam ke-24 dengan jumlah sel  $1,4 \times 10^6$  CFU/mL. Isolat 20 menunjukkan kemampuan pembentukan gula reduksi tertinggi pada waktu inkubasi optimum jam ke-36 yaitu 12,27  $\mu\text{g/mL}$  di CMC dan 49,31  $\mu\text{g/mL}$  di TKKS. Isolat 40a pada jam ke-48 yaitu sebesar 3,48  $\mu\text{g/mL}$  di CMC dan 24,54  $\mu\text{g/mL}$  di TKKS. Isolat 40b sebesar 6,28  $\mu\text{g/mL}$  di CMC dan 11,21  $\mu\text{g/mL}$  di TKKS pada jam ke-24. Sedangkan isolat 49 memiliki kemampuan pembentukan gula reduksi rendah yaitu 3,10  $\mu\text{g/mL}$  di CMC dan 8,25  $\mu\text{g/mL}$  di TKKS pada jam ke-36. Karakterisasi keempat isolat bakteri selulolitik terpilih secara makroskopis memiliki warna koloni berwarna putih, sedangkan secara mikroskopis keempat isolat bakteri termasuk kelompok bakteri Gram negatif dengan bentuk sel batang.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Swt. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Skrining Bakteri Selulolitik asal *Vermicomposting* Tandan Kosong Kelapa Sawit”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kahar Muzakhar, S.Si, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama, dan Sattya Arimurti, S.P., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang senantiasa memberikan bimbingan, arahan dan nasehat terbaik dalam penulisan skripsi ini;
2. Esti Utarti, S.P., M.Si., selaku Dosen Penguji I, dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes., selaku Dosen Penguji II atas saran dan kritik yang sangat membangun demi kesempurnaan skripsi ini;
3. Sri Mumpuni, S.Pd., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Ir. Endang Soesetyaningsih, selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi, dan Purnama Okviandari, S.P., M.P., selaku teknisi Laboratorium Biologi Dasar, atas bantuan dan nasehat selama penulis menjalani penelitian.
5. Ibunda Siti Maisaroh dan Ayahanda Ahmad atas nasehat, dukungan moril dan materil serta doa yang tiada henti;
6. rekan kerjaku Widya, kawan-kawan di Mikrobiologi (Lutfiya, Dewi, Mada, dan Arif), kawan-kawan di *Sugar Group* (Hidayah, Edia, Rinda, Mas Anandang, Mas Aji, dan Frengki), kawan-kawan di TBV (Ika, Imam, dan Syubbanul), sahabat

suka duka (Luqfa, Wieniant, dan Heppi), serta kawan-kawan di biologi 2008 “*Omfalomesenterika*” terima kasih atas bantuan, kerjasama, persaudaraan, dan kebersamaan yang diberikan selama penulis menjalani penelitian dan masa studi;

7. Dr. Anik Ratna N., S.T., M.T dan keluarganya atas bantuan, dukungan, dan doa selama penulis menjadi mahasiswa, serta kawan-kawan di Karimata VII/ 8 (Mia, Yeni, Erwin, dan Rizka) atas bantuan dan kebersamaan selama penulis menjalani penelitian dan masa studi;
8. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Maret 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan</b> .....	2
<b>1.4 Manfaat</b> .....	2
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	3
<b>2.1 Vermicomposting</b> .....	3
<b>2.2 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)</b> .....	4
<b>2.3 Selulosa dan Selulase</b> .....	5
<b>2.4 Bakteri Selulolitik</b> .....	7
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	8
<b>3.1 Tempat dan Waktu</b> .....	8
<b>3.2 Rancangan Penelitian</b> .....	8
<b>3.3 Alat dan Bahan</b> .....	8

<b>3.4</b>	<b>Prosedur Penelitian .....</b>	9
3.4.1	Pengambilan Sampel .....	9
3.4.2	Pengukuran Suhu dan pH .....	9
3.4.3	Isolasi Bakteri .....	10
3.4.4	Skrining Bakteri Selulolitik secara Semikuantitatif .....	10
3.4.5	Pembuatan Substrat Alkali Ekstrak .....	11
3.4.6	Uji Pembentukan Gula Reduksi oleh 4 Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih .....	11
3.4.7	Efisiensi Hidrolisis Selulosa oleh Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih .....	13
3.4.8	Karakterisasi Isolat Bakteri Selulolitik Terbaik .....	14
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	15
<b>4.1</b>	<b>Isolasi dan Skrining Bakteri Selulolitik secara Semikuantitatif .....</b>	15
<b>4.2</b>	<b>Pola Pertumbuhan Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih .....</b>	18
<b>4.3</b>	<b>Uji Pembentukan Gula Reduksi oleh 4 Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih .....</b>	19
<b>4.4</b>	<b>Efisiensi Degradasi Selulosa oleh Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih .....</b>	21
<b>4.4</b>	<b>Karakterisasi Morfologi Bakteri Selulolitik Terpilih .....</b>	22
<b>BAB 5.</b>	<b>PENUTUP .....</b>	25
<b>5.1</b>	<b>Kesimpulan .....</b>	25
<b>5.2</b>	<b>Saran .....</b>	25
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	26
	<b>LAMPIRAN .....</b>	32

## DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi kimiawi tandan kosong kelapa sawit (%) .....	4
4.1 Indeks aktivitas enzim selulase dan pertumbuhan pada media substrat alkali ekstrak TKKS oleh isolat bakteri asal <i>vermicomposting</i> TKKS .....	17
4.2 Efisiensi hidrolisis selulosa oleh selulase dari isolat bakteri selulolitik terpilih .....	22
4.3 Karakterisasi morfologi isolat 20, 40a, 40b dan 49 secara makroskopis dan mikroskopis .....	23

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur selulosa (Lehninger, 1982) .....	5
2.2 Degradasi selulosa oleh selulase (Moat <i>et al.</i> , 2002) .....	6
4.1 Analisis semikuantitatif isolat bakteri pada media CMC 1% setelah inkubasi 48 jam .....	15
4.2 Kurva pertumbuhan isolat bakteri selulolitik terpilih pada media cair TKKS 1% .....	18
4.3 Pembentukan gula reduksi oleh isolat bakteri selulolitik terpilih di substrat CMC 0,5% dan substrat alkali ekstrak TKKS 0,5% : a) isolat 20; b) isolat 40a; c) isolat 40b; dan d) isolat 49 .....	20

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Media dan Reagen .....	32
A.1 Komposisi Media <i>Nutrien Agar</i> (NA) .....	32
A.2 Komposisi Media CMC 1% .....	32
A.3 Komposisi Media Substrat Alkali Ekstrak TKKS 0,5 % .....	32
A.4 Komposisi Buffer Phosfar pH-7 1M .....	32
A.5 Komposisi Reagen Somogyi-Nelson .....	32
B. Pembentukan Zona Bening Isolat Bakteri pada Media Alkali Ekstrak TKKS .....	33
C. Jumlah Sel Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih pada Media TKKS Cair .....	34
D. Hasil Kurva Standar Glukosa .....	34



## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

*Vermicomposting* adalah biokonversi bahan organik dengan menggunakan cacing tanah sampai menjadi humus yang dikenal sebagai vermikompos (Munroe, 2009). Cacing tanah pada *vermicomposting* berperan sebagai *pioneer* dekomposisi yaitu memfragmentasi limbah organik menjadi berukuran lebih kecil sehingga dapat meningkatkan luas permukaan bahan organik tersebut untuk didekomposisi lanjut oleh mikroba (Hanafiah *et al.*, 2005). Keunggulan *vermicomposting* yaitu waktu lebih cepat dibanding pengomposan secara spontan (Sabaruddin, 2011), dan vermikompos yang dihasilkan mengandung unsur hara makro dan mikro yang tersedia bagi tanaman lebih besar (Nagavallemma *et al.*, 2004). *Vermicomposting* telah berhasil digunakan dalam pengolahan berbagai limbah seperti limbah perkotaan, limbah kotoran ternak, limbah pertanian, limbah industri kertas, dan limbah industri pangan (Dominguez *et al.*, 2010a).

Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) adalah limbah utama dari industri minyak sawit di Indonesia dengan tingkat ketersediaan berlimpah setiap tahunnya yaitu sekitar 37 juta ton (Kementerian Pertanian, 2011). Menurut Sabaruddin (2011) *vermicomposting* TKKS berlangsung dalam waktu yaitu 2-3 bulan. Hal ini disebabkan TKKS mengandung lignoselulosa yang sukar terdegradasi (Hasibuan, 2005), salah satunya adalah selulosa sebesar 45,95 % (Afriani, 2011). Bahan organik yang mengandung selulosa merupakan substrat bagi pertumbuhan bakteri selulolitik (Saraswati *et al.*, 2010), sehingga diduga bakteri selulolitik juga terdapat pada *vermicomposting* TKKS yang mengandung selulosa tinggi.

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang mampu menghasilkan selulase yang menghidrolisis selulosa menjadi produk yang lebih sederhana yaitu glukosa

(Meriyandini *et al.*, 2009). Menurut Saraswati *et al* (2010) penggunaan bioaktivator yang mengandung bakteri selulolitik banyak dimanfaatkan dalam pengolahan limbah selulosa menjadi kompos dan sebagai strategi untuk mempersingkat proses dekomposisi. Oleh karena itu untuk memperoleh agen potensial pendegradasi selulosa dan mempercepat *vermicomposting* TKKS dilakukan skrining bakteri selulolitik *indigenous* TKKS. Octavia (2010) menyatakan bahwa bakteri *indigenous* memiliki sifat toleransi yang lebih tinggi terhadap kondisi lingkungan tempat bakteri berasal. Bakteri *indigenous* yang berhasil diisolasi dari berbagai limbah sebagian besar menunjukkan biodiversitas dan aktivitas potensial untuk dikembangkan dan ditingkatkan.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Apakah isolat bakteri selulolitik dapat diperoleh pada *vermicomposting* TKKS dan bagaimanakah aktivitas selulolitik oleh isolat tersebut?

## **1.3 Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri selulolitik potensial dari *vermicomposting* TKKS.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

Hasil skrining isolat bakteri selulolitik dari *vermicomposting* TKKS yang memiliki aktivitas tertinggi dapat dikembangkan potensinya sebagai agen dekomposer untuk membantu mempercepat *vermicomposting* TKKS.

## **BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Vermicomposting**

*Vermicomposting* adalah proses pembuatan kompos dengan menggunakan beberapa spesies cacing tanah untuk meningkatkan konversi limbah menjadi produk yang lebih baik (Nagavallemma *et al.*, 2004). *Vermicomposting* berlangsung dalam rentang suhu mesofilik karena cacing tanah dan mikroba aktif pada suhu 10 °C-32 °C. Cacing tanah terlibat langsung pada populasi mikroba selama *vermicomposting* yaitu bertindak sebagai fragmentator bahan organik sehingga menghasilkan luas permukaan bahan organik yang tersedia untuk kolonisasi mikroba dan dapat meningkatkan aktivitas mikroba (Dominguez *et al.*, 2010a; Dominguez, 2011b). Kotoran cacing (*cast*) yang dihasilkan cacing selama *vermicomposting* mengandung mikroba, mineral anorganik dan bahan organik (Warsana, 2009). *Cast* yang bercampur dengan sisa limbah (*midden*) memiliki nutrisi tersedia lebih tinggi sehingga kondisi ini menarik kehadiran mikroba untuk mempercepat dekomposisi (Melillo *et al.*, 1982 dalam Aira *et al.*, 2009). Selama *vermicomposting* mikroba yang berperan antara lain bakteri, jamur dan actinomisetes dengan jumlah yang berlimpah dan menghasilkan enzim selulase, amilase, lipase, protease, dan fosfatase yang berfungsi dalam perombakan bahan organik (Mansur, 2001).

Produk akhir dari *vermicomposting* adalah vermikompos. Vermikompos memiliki C/N rasio rendah, memiliki kapasitas menyerap dan menahan air, berwarna coklat gelap, tidak berbau, dan strukturnya remah (Sabaruddin, 2011). Selain itu mengandung banyak nutrisi khususnya amonium dan nitrat, fosfor, kalium, kalsium, magnesium untuk pertumbuhan tanaman serta mengandung hormon pertumbuhan tanaman (Dominguez, 2011b).

## 2.2 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

Tandan kelapa sawit (TKS) adalah bagian dari pohon kelapa sawit yang berfungsi sebagai tempat untuk buah kelapa sawit. Setiap TKS mengandung 62–70% buah dan sisanya adalah tandan kosong kelapa sawit (TKKS) (Naibaho, 1998). Pengolahan 1 ton TKS segar dalam produksi minyak sawit akan dihasilkan limbah TKKS sebesar 23% (Darnoko, 1992).

Pengolahan TKKS belum dimanfaatkan secara optimal oleh sebagian besar pabrik kelapa sawit di Indonesia karena sebagian besar pabrik masih membakar TKKS dalam *incinerator*. Alternatif pengolahan lainnya adalah dengan cara menimbun (*open dumping*), dijadikan mulsa, atau diolah menjadi kompos. Namun karena kendala seperti waktu pengomposan yang cukup lama sampai 6 – 12 bulan, maka cara tersebut kurang diminati oleh pabrik kelapa sawit. Sehingga limbah TKKS tersebut masih tetap dijumpai setiap hari berupa tumpukan dalam jumlah besar yang menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan (Isroi, 2009).

Tandan kosong kelapa sawit merupakan limbah utama berlignoselulosa. Tabel 2.1 menunjukkan TKKS mengandung selulosa sebesar 35-45%.

Tabel 2.1 Komposisi kimiawi tandan kosong kelapa sawit (%)

Komponen	A	B	C	D
Kadar abu	6,04	6,23	6,59	1,23
Selulosa	35,81	37,5	38,76	45,95
Lignin	15,70	20,62	22,23	16,49
Hemiselulosa	27,01	-	-	22,84
Holoseululosa	-	66,07	67,88	-

Sumber: A: Pratiwi *et al* (1998), B: Guritno *et al* (1998), C: Darnoko (2000) dalam Kahfi (2007); D: Afriani (2011).

### 2.3 Selulosa dan Selulase

Selulosa merupakan salah satu senyawa organik paling melimpah di alam tetapi proses dekomposisinya lama (Stryer, 2000). Selulosa adalah senyawa seperti serabut, tidak larut dalam air dan merupakan struktur dasar sel tumbuhan yang ditemukan di dalam dinding sel tumbuhan, terutama pada tangkai, batang dan semua bagian berkayu dari jaringan tumbuhan (Lehninger, 1982). Struktur selulosa berupa polisakarida linier dari unit monomer glukosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosida (Gambar 2.1) (Howard *et al.*, 2003). Sebagai senyawa organik paling banyak di alam, selulosa tersusun atas 8000-12000 unit D-glukosa (Stryer, 2000).



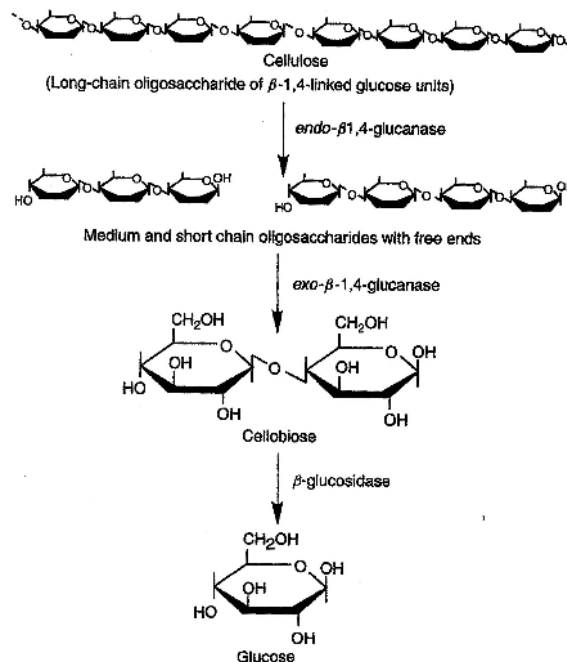
Gambar 2.1 Struktur selulosa (Lehninger, 1982)

Selulosa menempati 30-45 % dari limbah pertanian. Sebagian besar dari limbah pertanian yang berupa selulosa tersebut merupakan lignoselulosa. Lignoselulosa terdiri atas tiga polimer yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin. (Meriyandini *et al.*, 2009). Selulosa cenderung membentuk mikrofibril melalui ikatan inter dan intra molekuler. Mikrofibril selulosa terdiri dari 2 tipe, yaitu kristalin dan amorf (Anindyawati, 2010). Kristalin dan amorf membentuk suatu struktur dengan kekuatan tegangan tinggi. Selulosa dapat dihidrolisis dengan kelompok enzim selulase yang terdiri dari suatu kompleks campuran dari enzim dengan spesifisitas berbeda dalam menghidrolisis ikatan glikosidiknya (Howard *et al.*, 2003). Dengan bantuan selulase, selulosa dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon mikroba.

Selulase merupakan enzim induktif yang biosintesisnya dipengaruhi oleh induser dan represor. Selulosa dan selobiosa merupakan induser selulase, sedangkan glukosa dikenal sebagai represor yang efektif (Gong dan Tsao, 1979 dalam Safriani,

1995). Selulase dihasilkan oleh berbagai kelompok mikroba selulolitik dari kapang, bakteri dan aktinomisetes baik yang hidup di alam secara bebas maupun di dalam tubuh hewan (Silaban, 1999). Selulase sebagai enzim ekstraseluler pada mikroba umumnya berfungsi memproduksi nutrisi dari polimer-polimer yang terdapat di sekeliling sel (Frost dan Moss, 1987 dalam Safriani, 1995).

Suatu sistem selulase terdiri atas tiga tipe enzim utama yaitu endo- $\beta$ -1,4-glukanase, ekso- $\beta$ -1,4-glukanase dan  $\beta$ -glukosidase. Tiga kelompok enzim selulase tersebut bekerja secara sinergis dalam proses perombakan selulosa menjadi glukosa (Sukumaran *et al.*, 2005). Endo-1,4- $\beta$ -glukanase berperan memotong rantai selulosa secara random sehingga sisi yang terbuka dapat diserang oleh ekso- $\beta$ -1,4-glukanase menghasilkan selooligosakarida dengan ujung rantai bebas. Ekso-1,4- $\beta$ -glukanase berperan memecah ujung pereduksi dan non pereduksi pada rantai selooligosakarida untuk menghasilkan selobiosa. Selobiosa kemudian dihidrolisis menjadi glukosa oleh  $\beta$ -glukosidase (Gambar 2.2) (Moat *et al.*, 2002).



Gambar 2.2 Degradasi selulosa oleh selulase (Moat *et al.*, 2002)

## 2.4 Bakteri Selulolitik

Bakteri selulolitik adalah bakteri yang mampu mendegradasi dan memanfaatkan selulosa sebagai sumber karbon dan energinya (Baharuddin *et al.*, 2010). Energi yang dihasilkan, digunakan untuk sintesis makromolekul seperti asam nukleat, lipid dan polisakarida untuk pertumbuhan dan perkembangan sel (Djuarnani, 2004 dalam Fadillah, 2012). Bakteri selulolitik dipilih sebagai salah satu mikroba pendegradasi selulosa karena memiliki tingkat pertumbuhan yang lebih cepat dibanding kelompok mikroba lainnya sehingga waktu yang dibutuhkan untuk produksi enzim lebih cepat (Baharuddin *et al.*, 2010). Selain itu, tingkat variasi genetik kelompok bakteri sangat beragam yang memungkinkan dilakukan rekayasa genetika untuk optimasi produksi maupun aktivitas enzim selulasenya (Alam *et al.*, 2004). Bakteri selulolitik memiliki ketahanan yang tinggi terhadap kelembaban yang dibutuhkan untuk dekomposisi selulosa. Bakteri memiliki *water activity* lebih dari 0,9 sedangkan kapang kurang dari 0,7 dan actinomicetes 0,8 (Matthew *et al.*, 2003).

Bakteri selulolitik secara alami sangat umum dijumpai pada tanah pertanian, hutan, pada rabuk (pupuk) atau pada jaringan tanaman yang membusuk. Bakteri selulolitik diantaranya berasal dari genus *Achromobacter*, *Angiococcus*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Clostridium*, *Cellivibrio*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Poliangium*, *Sorangium*, *Sporocytophaga*, *Vibrio*, *Cellfalcicula* (Rao, 1994), *Citrobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, dan *Aeromonas* (Anand *et al.*, 2009). Domain bakteri yang diketahui memiliki aktivitas selulolitik secara aerob berasal dari filum Actinobacteria dan secara anaerob berasal dari filum Firmicutes. Bakteri selulolitik dikelompokkan berdasarkan perbedaan fisiologis menjadi tiga kelompok. Pertama, kelompok anaerob fermentatif, yang terdiri atas bakteri Gram positif (*Clostridium*, *Ruminococcus*, dan *Caldicellulosiruptor*) serta bakteri Gram negatif (*Butyrivibrio* dan *Acetivibrio*). Kedua, kelompok Gram positif aerobik seperti *Thermobifida*. Ketiga, kelompok bakteri aerob yang bersifat motil seperti *Cytophaga* dan *Sporocytophaga* (Niranjane, 2006 dalam Sari, 2010).

## **BAB 3. METODE PENELITIAN**

### **3.1 Tempat dan Waktu**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan Juni 2012 sampai Januari 2013.

### **3.2 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan dengan metode deskriptif. Rancangan penelitian meliputi empat tahap, tahap pertama adalah isolasi bakteri dari *vermicomposting* TKKS menggunakan media NA (*Natrium Agar*) *plate* dan dilanjutkan dengan pemurnian isolat-isolat bakteri. Tahap kedua adalah skrining bakteri selulolitik secara semikuantitatif pada media CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) Agar *plate* 1% dan dipilih empat isolat bakteri dengan indeks aktivitas selulolitik tertinggi. Tahap ketiga adalah skrining aktivitas selulolitik secara kuantitatif pada empat isolat bakteri terpilih yang diwaji dengan pembuatan pola pertumbuhan, produksi ekstrak kasar enzim, pembuatan standart glukosa, dan analisis aktivitas pembentukan gula reduksi menggunakan CMC 0,5% dan alkali ekstrak TKKS 0,5%. Tahap keempat adalah karakterisasi morfologi empat isolat bakteri terpilih.

### **3.3 Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri, tabung reaksi, labu *Erlenmeyer*, spatula, gelas ukur, *Beaker glass*, gelas pengaduk, pipet volume, jarum ose, mikropipet dan tip, *microtube*, pH meter, kertas saring, *hot plate stirrer*, neraca analitik, penggaris *Stainless Handened V-TEC* (30 cm), *shaker*, inkubator, *laminar air flow* (LAF), autoklaf, *colony counter*, mikroskop Olympus CX 21, vortek, *sentrifuge*, spektrofotometer dan kamera.



Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel vermikompos TKKS yang masih dalam proses, media *Nutrien Agar* (NA) (Lampiran A.1), media *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 1% (Lampiran A.2), substrat alkali ekstrak TKKS 0,5% (Lampiran A.3), cat Gram (*iodine*, kristal violet, safranin), alkohol, garam fisiologis (NaCl 0,85 %), NaOH, CH<sub>3</sub>COOH, etanol, buffer fosfat 1 M (Lampiran A.4), glukosa, dan reagen *Somogyi- Nelson* (Lampiran A.5).

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Pengambilan Sampel**

Sampel vermikompos TKKS diperoleh dari PT. Bengkelden Agrobisnis di Bandung. Pengambilan sampel diambil ketika proses *vermicomposting* TKKS berlangsung, yaitu pada bagian atas dan bagian tengah dari tumpukan *vermicomposting* TKKS. Sampel vermikompos yang diperoleh disimpan dalam kantong plastik.

#### **3.4.2 Pengukuran Suhu dan pH**

##### **a. Pengukuran suhu**

Pengukuran suhu vermikompos TKKS diukur dengan termometer. Termometer diletakkan pada vermikompos TKKS bagian tengah dan bagian atas lalu dibiarkan selama 5 menit sampai suhu yang terbaca pada skala termometer stabil. Kisaran suhu yang diperoleh adalah 29,7-30,2.

##### **b. Pengukuran pH**

Sampel vermikompos TKKS yang ditetapkan pHnya dibasahi hingga nisbah air : vermikompos TKKS mencapai 5 : 1. Sebanyak 10 gram sampel diencerkan dengan 50 ml akuades dalam erlenmeyer. Selanjutnya divortek dan dibiarkan selama 30 menit. Suspensi yang diperoleh diukur pHnya dengan pH meter (Black *et al.*, 1965). Kisaran pH yang didapat adalah 7-7,3.

### 3.4.3 Isolasi Bakteri

Sebanyak 25 gram sampel vermikompos TKKS dimasukkan kedalam erlenmeyer berisi 225 ml larutan garam fisiologis (0,85 % NaCl) lalu divortek sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-1}$ . Suspensi dari pengenceran  $10^{-1}$  diambil 1 ml lalu dimasukkan ke dalam 9 ml garam fisiologis sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$ . Selanjutnya dilakukan pengenceran berseri hingga didapatkan pengenceran  $10^{-8}$ . Media yang digunakan untuk isolasi bakteri yaitu media *Nutrien Agar* (NA). Dari pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-8}$  diambil 100  $\mu$ l dan diinokulasikan dengan metode sebaran (*spread plate*) pada media NA dalam cawan petri yang berbeda. Kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam.

Pemurnian bakteri dilakukan dengan mengambil koloni yang tumbuh terpisah dan menunjukkan karakter morfologi yang berbeda dengan cara menginokulasikan isolat pada media NA baru dengan metode *streak* secara kuadran dan diulang 2 kali sehingga diperoleh koloni tunggal. Kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Isolat murni yang sudah didapat ditumbuhkan pada media NA miring yang digunakan sebagai stok untuk uji lanjut.

### 3.4.4 Skrining Bakteri Selulolitik secara Semikuantitatif

Isolat bakteri yang diuji secara semikuantitatif didapat dari stok yang telah diremajakan dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam sebelum diuji aktivitasnya. Skrining bakteri selulolitik secara semi kuantitatif dilakukan menggunakan metode titik ke dalam media CMC *plate* dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam. Pengujian aktivitas selulolitik dilakukan dengan metode *Gram's Iodin* dan dilakukan secara duplo. Pertumbuhan koloni bakteri diamati dan diseleksi yang mampu menguraikan CMC. Koloni bakteri selulolitik diindikasikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni setelah diuji dengan *Gram's Iodin* dan dibiarkan selama 3-5 menit. Indeks aktivitas selulase dapat ditentukan dengan cara mengukur rasio diameter zona bening terhadap diameter koloni (Kasana *et al.*, 2008).

$$\text{Indeks Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Diameter zona bening (mm)}}{\text{Diameter koloni (mm)}}$$

#### 3.4.5 Pembuatan Substrat Alkali Ekstrak TKKS

Bubuk TKKS dibuat dari TKKS yang sudah dicacah, diblender, dan diayak dengan ukuran 250 mm. Selanjutnya 100 gram bubuk TKKS dihidrolisis secara kimiawi dengan 1 L NaOH 1 M selama 24 jam sambil di *shaker*. NaOH berfungsi sebagai delignifikasi dan memecah komponen lignoselulosa yang ada di TKKS menjadi polimer yang lebih sederhana sehingga kandungan holoselulosa lebih meningkat (Wirajmata *et al.*, 2011). Suspensi selanjutnya ditambah CH<sub>3</sub>COOH hingga pH 7 dan difiltrasi menggunakan kertas saring. Proses selanjutnya, filtrat diekstraksi menggunakan etanol dengan perbandingan etanol dan filtrat 6 : 4. Larutan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Kemudian endapan tersebut dikeringkan pada suhu 50 °C sehingga didapatkan polisakarida substrat alkali ekstrak TKKS (Muzakhar, 2012).

#### 3.4.6 Uji Pembentukan Gula Reduksi oleh Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih

##### a. Pembuatan Pola Pertumbuhan

Empat isolat awalnya diremajakan pada media NA *plate* hingga berumur 24 jam, selanjutnya diambil 1 ose dan diencerkan pada 1 ml akuades steril. Sebanyak 50 µl suspensi isolat diinokulasikan ke dalam 50 ml media TKKS cair 1% dan diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 150 rpm suhu 30 °C selama 48 jam. Pertumbuhan koloni bakteri pada media kultur diamati berdasarkan perhitungan jumlah sel bakteri menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*). Setiap interval 6 jam mulai jam ke nol selama 60 jam isolat diambil sebanyak 1 ml sebagai pengenceran 10<sup>-1</sup> yang dimasukkan ke dalam garam fisiologis steril 9 ml. Pengenceran selanjutnya dilakukan dengan mengambil 100 µl dari pengenceran 10<sup>-1</sup> dan dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi 900 µl garam fisiologis steril. Hal ini dilakukan sampai pengenceran 10<sup>-8</sup>. Kemudian sebanyak 5 µl ditumbuhkan

secara *drop plate* dalam media NA. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam dan dihitung jumlah koloninya dengan menggunakan *colony counter*. Jumlah sel bakteri yang tumbuh dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah sel (CFU/mL)} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{5 \mu\text{l}} \times \frac{1}{\text{pengenceran}}$$

#### b. Persiapan Inokulum

Inokulum yang digunakan untuk produksi enzim diambil sesuai pada fase logaritmik dari masing-masing isolat berdasarkan pola pertumbuhan yang didapat pada media 50 ml TKKS cair 1%. Inokulum sebelum diinokulasikan ke media produksi terlebih dahulu disetarakan jumlah selnya dari keempat isolat.

#### c. Produksi Ekstrak Kasar Enzim

Inokulum diinokulasikan sebanyak 2,5 ml ke dalam 47,5 ml media produksi TKKS cair 1% dan diinkubasi dalam *shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Setiap perlakuan dengan isolat yang berbeda tersebut dibuat 2 kali ulangan pada media produksi. Kemudian dilakukan ekstraksi enzim setiap selang waktu 12 jam selama 72 jam dengan metode sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak enzim kasar dan disimpan pada suhu -20 °C untuk dianalisis aktivitas pembentukan gula reduksinya.

#### d. Analisis Gula Reduksi

##### d.1 Penentuan Standart Glukosa

Penentuan standart glukosa diuji dengan menggunakan metode *Somogyi-Nelson*. Sebanyak 0,05 gr glukosa dilarutkan dalam 50 ml akuades sehingga didapatkan konsentrasi glukosa adalah 1.000 µg/ml (stok 1). Kemudian diambil 10 ml dari stok 1 dan dilarutkan dalam 90 ml akuades sehingga konsentrasinya menjadi 100 µg/ml (stok 2). Dari konsentrasi 100 µg/ml dilakukan pengenceran sehingga didapatkan konsentrasi sebanyak 10, 20, 30, 40, 50, 60 dan 70 µg/ml. Masing-masing konsentrasi dilakukan penghitungan kadar glukosanya menggunakan metode *Somogyi-Nelson*. Hasil kurva standar glukosa ditunjukkan pada Lampiran D.

## d.2 Analisis Gula Reduksi

Pengukuran aktivitas selulase menggunakan metode *Somogyi-Nelson* yang dilakukan pada substrat yang berbeda yaitu 0,5 % CMC dalam 0,5 ml buffer pH 7 50mM dan 0,5 % substrat alkali ekstrak TKKS dalam 0,5 ml buffer pH 7 50mM. Substrat alkali ekstrak TKKS berfungsi untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam mendekomposisi TKKS. Sedangkan Substrat CMC berfungsi sebagai pembanding positif. Selanjutnya dalam substrat tersebut masing-masing ditambahkan ekstrak kasar enzim sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada inkubator suhu 37 °C selama 2 jam. Setelah inkubasi lalu ditambahkan 0,5 ml reagen *Somogyi* yang berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatik dan digojok hingga homogen. Kemudian dididihkan pada suhu 100 °C selama 15 menit dan didinginkan. Selanjutnya ditambahkan 0,5 ml reagen *Nelson* yang berfungsi untuk mengikat gula reduksi hasil hidrolisis substrat dan diencerkan dengan 2,5 ml akuades. Pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Perlakuan kontrol sama dengan sampel hanya penambahan enzim kasar dilakukan setelah penambahan *Somogyi* (Somogyi, 1945; Nelson, 1944).

### 3.4.7 Efisiensi Hidrolisis Selulosa oleh Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih

Tingkat efisiensi degradasi selulosa oleh isolat bakteri selulolitik terpilih merupakan prosentase rasio antara konsentrasi gula reduksi dengan konsentrasi substrat yang digunakan saat analisis gula reduksi. Nilai efisiensi degradasi selulosa dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

- 1) Efisiensi hidrolisis selulosa di substrat CMC :

$$\frac{[ ] \text{ gula reduksi}}{[ ] \text{ substrat CMC}} \times 100\%$$

- 2) Efisiensi hidrolisis selulosa di substrat TKKS :

$$\frac{[ ] \text{ gula reduksi}}{[ ] \text{ substrat TKKS}} \times \frac{45,95}{100} \times 100\% = \dots \text{ (rumus 1)}$$

$$\text{Selanjutnya, (rumus 1)} \times \frac{100}{45,95} = \dots \text{ (rumus 2)}$$

Keterangan:

- [ ] gula reduksi : Kadar gula reduksi maksimal pada waktu inkubasi optimum oleh masing-masing isolat ( $\mu\text{g/mL}$ )  
 [ ] substrat : Konsentrasi substrat awal CMC dan TKKS = 0,5% (0,5 gr/100 mL) = 5 mg/ mL = 5000  $\mu\text{g/ mL}$   
 Asumsi selulosa di TKKS : 45,95% (Afriani, 2011)

#### 3.4.8 Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih

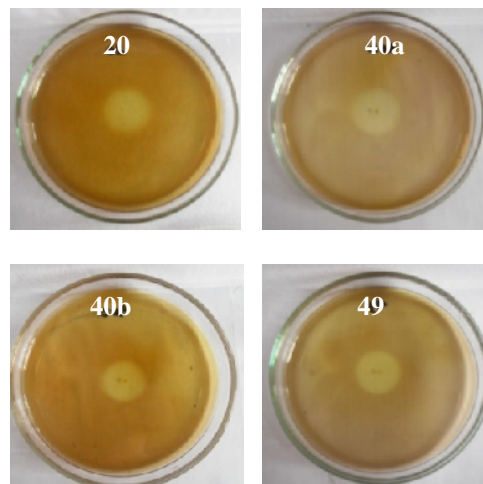
Tujuan karakterisasi adalah untuk mengetahui morfologi bakteri secara makroskopis berdasarkan koloni bakteri dan secara mikroskopis berdasarkan bentuk sel dan sifat gramnya terhadap empat isolat bakteri terpilih. Karakteristik makroskopis dilakukan dengan cara mengamati morfologi koloni bakteri (bentuk koloni, elevasi, tepi dan struktur dalam koloni) (Jutono *et al.*, 1980). Sedangkan karakterisasi secara mikroskopis dilakukan dengan cara pengecatan Gram.

Pengecatan Gram dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 ose isolat bakteri diencerkan dalam 3 ml akuades steril dan di ambil 10  $\mu\text{l}$  lalu diletakkan pada gelas obyek dan difiksasi. Selanjutnya ditambahkan sebanyak 1 tetes kristal violet (Gram A) selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan di keringanginkan. Setelah kering ditambahkan 1 tetes larutan iodine (Gram B). Setelah 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya isolat bakteri ditambah etil alkohol 95% (Gram C) selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian isolat bakteri ditambahkan safranin (Gram D) selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan, selanjutnya diamati dengan mikroskop. Bakteri Gram Positif berwarna ungu dan bakteri Gram negatif berwarna merah. Sebelum melakukan pengecatan Gram pada 4 isolat terpilih juga dilakukan pengecatan Gram pada *Bacillus* sp. (Gram positif) dan *E.coli* (Gram negatif) (Cappuccino dan Sherman, 1987).

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Isolasi dan Skrining Bakteri Selulolitik Secara Semikuantitatif

Sebanyak 51 isolat bakteri yang memiliki morfologi berbeda telah berhasil diisolasi dari *vermicomposting* Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). Lima puluh satu isolat tersebut merupakan bakteri selulolitik yang mampu tumbuh pada media CMC *plate*. Secara umum aktivitas selulolitik isolat bakteri ditunjukkan dengan kemampuan tumbuh pada media CMC *plate* yang mengandung selulosa sebagai satu-satunya sumber karbon untuk pertumbuhannya dan terbentuknya zona bening di sekitar koloni selama inkubasi 48 jam sehingga bersifat selulolitik (Gambar 4.1). Daerah bening menunjukkan adanya aktivitas hidrolitik oleh enzim ekstraseluler selulase yang diekspresikan oleh isolat-isolat bakteri. Produk hidrolisis tersebut berupa gula sederhana monosakarida dan tidak terjadi ikatan kompleks dengan iodine. Sedangkan warna kehitaman menunjukkan sisa selulosa yang tidak terhidrolisis sehingga terjadi pembentukan selulosa-iodine (Kasana *et al.*, 2008)



Gambar 4.1 Analisis semikuantitatif isolat bakteri pada media CMC 1% setelah inkubasi 48 jam

Berdasarkan indeks aktivitas enzim didapatkan bahwa sebanyak 30 isolat memiliki indeks aktivitas selulolitik 1 artinya besarnya zona bening yang terbentuk sama dengan koloni isolat tersebut dan 21 isolat bakteri lainnya memiliki indeks aktivitas selulolitik lebih dari 1 (Tabel 4.1). Isolat 20, 49b, 49 dan 40a memiliki nilai indeks selulolitik berturut-turut yaitu 11,90, 11,29, 11,24, dan 10,97 yang lebih tinggi dibandingkan 47 isolat selulolitik lainnya yang mempunyai indeks aktivitas selulolitik antara 1 sampai 10,75. Isolat bakteri selulolitik dari penelitian Gupta *et al* (2012) memiliki indeks selulolitik antara 4,3 sampai 9,8. Perbedaan indeks aktivitas selulolitik tersebut diduga karena selulase diekskresikan oleh masing-masing isolat bakteri yang berbeda potensinya untuk menguraikan substrat dalam media pertumbuhan (Sudiana *et al.*, 2001). Semakin besar indeks selulase pada isolat maka semakin besar aktivitas selulolitik yang dihasilkan (Apun *et al.*, 2000). Sehingga isolat 20, 40a, 40b dan 49 dipilih karena diduga merupakan isolat potensial yang memiliki indeks selulolitik tinggi dibanding isolat-isolat lainnya.

Tabel 4.1 dan Lampiran B, juga menyajikan uji semikuantitatif pada substrat alkali ekstrak TKKS 0,5% terhadap 21 isolat bakteri selulolitik. Tabel 4.1 menunjukkan bahwa 21 isolat tersebut mampu tumbuh pada media polisakarida substrat alkali ekstrak TKKS dengan kisaran indeks aktivitas enzim antara 1 sampai 11,63. Isolat-isolat tersebut diduga tidak hanya mampu memanfaatkan selulosa namun juga memanfaatkan sumber karbon lain yang ada di substrat TKKS untuk pertumbuhannya. Hal ini dikarenakan substrat TKKS ini mengandung sumber karbon yang bermacam-macam seperti selulosa, hemiselulosa dan lignin (Afriani, 2011), sehingga media tersebut tidak bersifat selektif untuk pertumbuhan bakteri selulolitik saja. Penelitian tentang bakteri selulolitik secara semikuantitatif oleh Purwadaria *et al* (2003), dari 8 isolat bakteri yang bersifat selulolitik di CMC *plate* juga bersifat hemiselulolitik pada media selektif xilan.



Tabel 4.1 Indeks aktivitas enzim selulase dan pertumbuhan pada media substrat alkali ekstrak TKKS oleh isolat bakteri asal *vermicomposting* TKKS

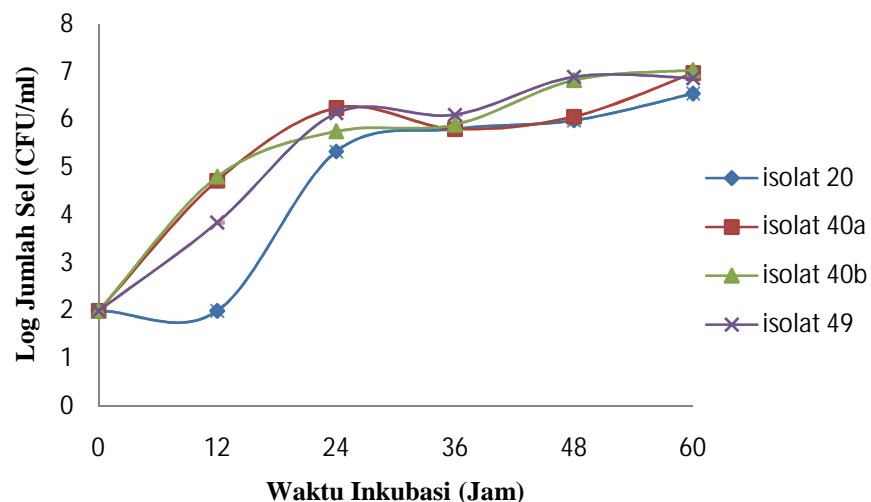
No.	Isolat Bakteri	Indeks Aktivitas Selulase pada Media CMC 1%	Pertumbuhan pada Media Substrat Alkali Ekstrat TKKS 0,5 %
1.	1	3,74	2,95
2.	2	10,55	7,87
3.	3	8,97	5,53
4.	4	10,75	7,18
5.	5	1,0	-
6.	6	1,0	-
7.	7	1,0	-
8.	8	1,0	-
9.	9	8,17	5,51
10.	10	1,0	-
11.	11	1,0	-
12.	12	1,0	-
13.	13a	1,0	-
14.	13b	1,0	-
15.	14	4,90	3,06
16.	15	10,34	7,94
17.	16	1,0	-
18.	17	1,0	-
19.	18a	1,0	-
20.	18b	1,0	-
21.	19	1,0	-
<b>22.</b>	<b>20</b>	<b>11,90</b>	<b>11,63</b>
23.	21	8,02	4,17
24.	22	1,0	-
25.	23	1,59	1,0
26.	24	8,17	4,47
27.	25	2,22	1,43
28.	26	8,27	4,54
29.	27	1,0	-
30.	28	1,0	-
31.	29	1,0	-
32.	30	1,0	-
33.	31	7,49	3,84
34.	32	1,0	-
35.	33	1,0	-
36.	34	1,0	-
37.	35	1,0	-
38.	36	1,0	-
39.	37	1,0	-
40.	38	1,0	-
41.	39a	8,72	6,80
42.	39b	10,19	7,86
<b>43.</b>	<b>40a</b>	<b>10,97</b>	<b>10,79</b>
<b>44.</b>	<b>40b</b>	<b>11,29</b>	<b>9,93</b>
45.	42	1,0	-
46.	43	1,12	1,0
47.	44	1,0	-
48.	45	1,0	-
49.	46	1,0	-
50.	47	7,59	4,19
<b>51.</b>	<b>49</b>	<b>11,24</b>	<b>10,65</b>

**Keterangan :** Angka dicetak tebal merupakan 4 isolat terpilih dengan IAE tertinggi; dan tanda (-) merupakan tidak dilakukan uji

## 4.2 Pola Pertumbuhan Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih

Sebelum dilakukan uji kuantitatif, keempat isolat bakteri selulolitik terpilih yaitu isolat 20, 40a, 40b dan 49 terlebih dahulu dilakukan pembuatan pola pertumbuhan. Pola pertumbuhan isolat bakteri di media TKKS 1% menunjukkan bahwa media tersebut mampu mensuplai nutrisi bagi pertumbuhan sel bakteri dengan baik. Pertumbuhan isolat bakteri terjadi antara jam ke-0 dan terus mengalami peningkatan jumlah sel hingga jam ke-60 (Gambar 4.2 dan Lampiran C).

Pada pertengahan fase logaritmik (*logarithmic growth*) merupakan fase yang tepat untuk inokulasi ke media produksi. Pada penelitian ini isolat 20, 40a, 40b menunjukkan fase pertengahan logaritmik dengan jumlah sel berturut-turut adalah  $2,9 \times 10^5$  CFU/mL,  $9,5 \times 10^5$  CFU/mL,  $9,2 \times 10^5$  CFU/mL pada jam ke-18, sedangkan isolat 49 sebesar  $1,4 \times 10^6$  CFU/mL pada jam ke-24. Pada fase logaritmik jumlah sel meningkat dengan cepat sampai pada batas tertentu hingga memasuki fase statis, metabolisme sel maksimal, dan sintesis bahan sel cepat dengan jumlah konstan sampai nutrisi habis (Purwoko, 2007). Pada jam ke-30 sampai jam ke-60, keempat isolat diduga berada pada akhir fase logaritmik karena jumlah sel masih meningkat namun sudah terjadi penurunan percepatan pertumbuhan yang disebut *decelerated phase* (Kayser *et al.*, 2005).

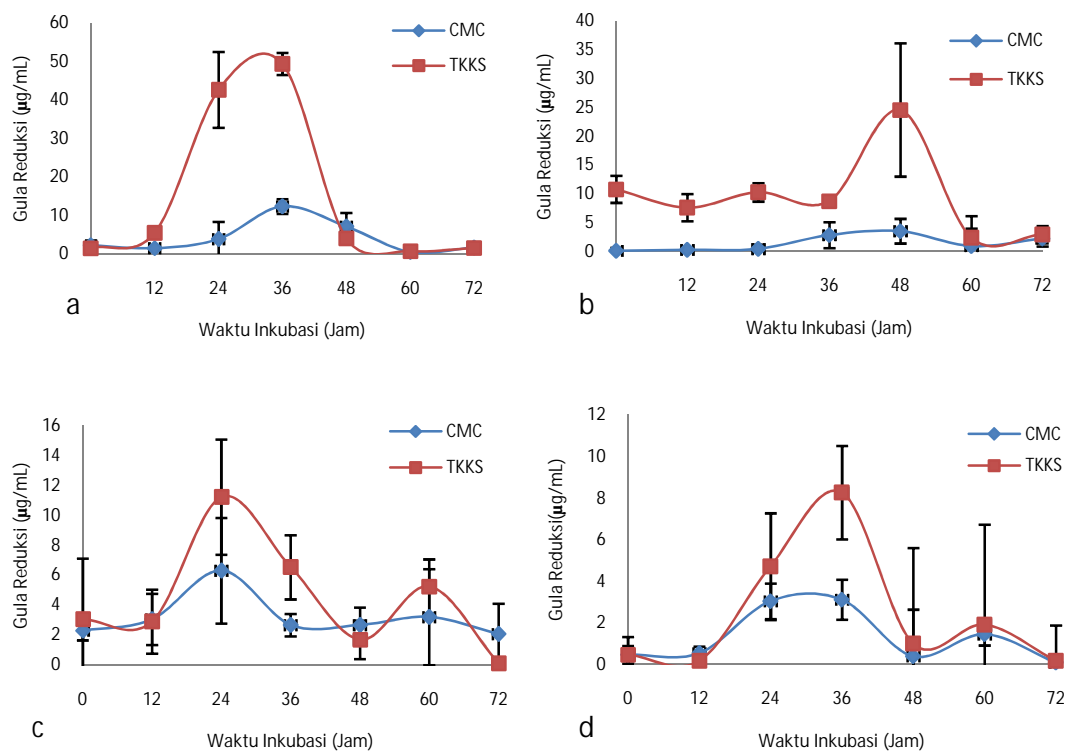


Gambar 4.2 Pola pertumbuhan isolat bakteri selulolitik terpilih pada media cair TKKS 1%

### 4.3 Uji Pembentukan Gula Reduksi oleh Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 4 isolat bakteri selulolitik terpilih memiliki kemampuan dalam mendegradasi substrat CMC 0,5% maupun substrat alkali ekstrak TKKS 0,5% yang ditunjukkan dengan pembentukan gula reduksi yang dihasilkan (Gambar 4.3). Pada Gambar 4.3 menunjukkan pembentukan gula reduksi oleh 4 isolat secara umum lebih tinggi pada substrat TKKS dibandingkan substrat CMC. Hal ini kemungkinan adanya enzim selain selulase, yaitu hemiselulase pada ekstrak kasar enzim yang juga diproduksi oleh 4 isolat bakteri terpilih saat ditumbuhkan pada substrat TKKS. Sehingga gula reduksi yang dihasilkan pada substrat alkali ekstrak TKKS diduga merupakan gula reduksi hasil hidrolisis selulosa dan hemiselulosa. Hal ini dikarenakan TKKS bukan merupakan selulosa murni karena juga mengandung hemiselulosa sebesar 22,84% (Afriani, 2011).

Gula reduksi adalah monosakarida sederhana yang dalam penelitian ini merupakan produk hasil hidrolisis substrat TKKS dan CMC. Gula reduksi seperti glukosa dan gula-gula lain dicirikan dengan adanya gugus aldehyd dan keton yang bersifat mampu mereduksi senyawa pengoksidasi (ion kupri  $\text{Cu}^{2+}$  pada reagen somogyi) (Lehninger, 1982). Hidrolisis selulosa menghasilkan gula reduksi berupa glukosa, sedangkan hidrolisis hemiselulosa selain menghasilkan glukosa, juga menghasilkan gula reduksi berupa mannososa, galaktosa, xilosa dan arabinosa (Suparjo, 2008). Umumnya bakteri selulolitik juga bersifat hemiselulolitik (Saraswati *et al.*, 2010), hal ini diduga karena ekspresi enzim selulase berhubungan dengan hemiselulase (Han *et al.*, 2003). Secara kuantitatif, isolat bakteri yang memiliki aktivitas selulase dan hemiselulase yaitu isolat bakteri dari *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus* dan *Rhodothermus* (Subramaniyan *et al.*, 2000).



Gambar 4.3 Pembentukan gula reduksi oleh isolat bakteri selulolitik terpilih di substrat CMC 0,5% dan substrat alkali ekstrak TKKS 0,5%: a) isolat 20; b) isolat 40a; c) isolat 40b; dan d) isolat 49

Keempat isolat bakteri selulolitik yang diuji memiliki kemampuan pembentukan gula reduksi maksimal dengan waktu inkubasi optimum yang berbeda-beda (Gambar 4.3). Isolat 20 menghasilkan gula reduksi tertinggi pada waktu inkubasi optimum jam ke-36, yaitu  $12,27 \mu\text{g/mL}$  untuk substrat CMC, dan  $49,31 \mu\text{g/mL}$  untuk substrat TKKS. Isolat 40a, terjadi pada jam ke-48 yaitu  $3,48 \mu\text{g/mL}$  untuk substrat CMC dan  $24,54 \mu\text{g/mL}$  untuk substrat TKKS. Isolat 40b pada jam ke-24 yaitu  $6,28 \mu\text{g/mL}$  untuk substrat CMC dan  $11,21 \mu\text{g/mL}$  untuk substrat TKKS.

Pembentukan gula reduksi maksimal oleh keempat isolat bakteri tersebut terjadi karena pada waktu inkubasi optimum antara jam ke-24 sampai jam ke-48 tersebut, keempat isolat masih berada pada fase logaritmik berdasarkan pola

pertumbuhan bakteri (Gambar 4.2). Menurut Jawetz (1978) dalam Pasaribu *et al* (2013) enzim termasuk metabolit primer yang diproduksi saat awal fase logaritmik dan terus meningkat seiring dengan pertumbuhan bakteri dan memiliki peran sangat esensial bagi pertumbuhan sel. Rahmi *et al* (2013) menambahkan bahwa produk gula reduksi seperti glukosa yang merupakan gula sederhana langsung digunakan oleh sel bakteri sebagai sumber karbon dan energi untuk memasuki jalur glikolisis dalam proses metabolismenya. Akibatnya pada fase logaritmik pembelahan sel sangat cepat dan jumlah sel tinggi sehingga konsentrasi enzim yang dihasilkan meningkat dan produk yang dihasilkan juga semakin besar

Penurunan pembentukan gula reduksi dari keempat isolat bakteri selulolitik terjadi setelah waktu inkubasi optimum. Isolat 20, 40b dan 49 mengalami penurunan pembentukan gula reduksi pada jam ke-48 sedangkan isolat 40a pada jam ke-60. Penurunan pembentukan gula reduksi kemungkinan disebabkan kehadiran glukosa sehingga bersifat represi terhadap sintesis selulase (Abalos *et al.*, 1997). Akibatnya sel bakteri akan menghentikan metabolisme dan mengurangi produksi enzim sehingga produk gula reduksi yang dihasilkan juga rendah (Katz dan Reese, 1968). Kemungkinan lain adalah pada waktu inkubasi tersebut sel mulai mengeluarkan enzim lain selain selulase, yaitu protease yang dapat menguraikan atau merusak enzim selulase (Martina *et al.*, 2002). Hal ini menyebabkan konsentrasi enzim untuk menghidrolisis substrat TKKS menurun dan produk yang dihasilkan juga rendah.

#### **4.4 Efisiensi Degradasi Selulosa oleh Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih**

Hasil Perhitungan tingkat efisiensi hidrolisis selulosa disajikan pada Tabel 4.2. Pada Tabel 4.2 ditunjukkan bahwa secara umum tingkat efisiensi selulase dari keempat isolat bakteri terpilih dalam menghidrolisis selulosa lebih tinggi pada TKKS. Isolat 20 lebih efisien dalam mendegradasi selulosa pada kedua substrat dibanding isolat 40a, 40b dan 49 yang ditunjukkan dengan prosentase efisiensi lebih tinggi. Hal ini berarti, selulase yang diekskresikan oleh isolat 20 memiliki potensi

yang lebih kuat dalam mendegradasi selulosa pada CMC yaitu sebesar 0,245% dengan kadar gula reduksi maksimal yang dihasilkan yaitu 12,27  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabel 4.2 Efisiensi hidrolisis selulosa oleh selulase dari isolat bakteri selulolitik terpilih

Isolat bakteri	Gula reduksi ( $\mu\text{g/mL}$ ) pada waktu optimum		Efisiensi selulosa terdegradasi (%)	
	CMC	TKKS	CMC	TKKS <sup>*)</sup>
20	12,27	49,31	0,245	4,670
40a	3,48	24,54	0,069	2,324
40b	6,28	11,21	0,125	1,061
49	3,10	8,25	0,062	0,781

<sup>\*)</sup> Asumsi kandungan selulosa TKKS adalah 45,95% (Afriani, 2011)





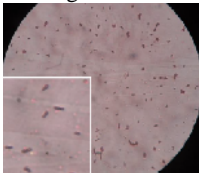
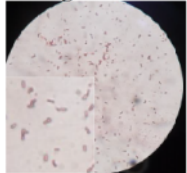
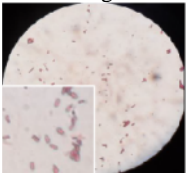
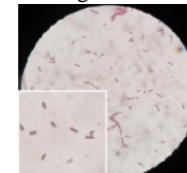
Berbeda dengan isolat 49, walaupun waktu optimum yang dibutuhkan sama dengan isolat 20 untuk menghasilkan produk gula reduksi maksimal, isolat 49 kurang efisien dalam mendegradasi selulosa. Hal ini ditunjukkan dengan nilai efisiensi isolat 49 lebih rendah dibanding isolat 20, 40a dan 40b. Perbedaan ini diduga karena setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda potensinya dalam mendegradasi substrat. Bakteri selulolitik dengan tingkat efisiensi yang tinggi akan memiliki satu atau lebih enzim dari tiga tipe selulase yang diperlukan untuk mendegradasi struktur selulosa menjadi glukosa (Yoo *et al.*, 2004). Hal ini tergantung dari gen yang dimiliki oleh isolat-isolat tersebut dan ketersediaan bahan selulosa yang digunakan (Meryandini *et al.*, 2009).

#### 4.5 Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih

Karakterisasi morfologi empat isolat bakteri terpilih secara makroskopis dan mikroskopis ditunjukkan pada Tabel 4.3. Hasil karakterisasi makroskopis berdasarkan Jutono *et al* (1980) diketahui bahwa keempat isolat bakteri selulolitik terpilih memiliki warna koloni sama yaitu berwarna putih namun memiliki bentuk, elevasi, tepi dan struktur dalam koloni yang bervariasi. Bentuk koloni isolat 20, 40a dan 40b adalah bulat (*circular*), sedangkan isolat 49 tidak beraturan (*irregular*).

Permukaan koloni isolat 20 mengalami pertumbuhan tebal dengan tonjolan tumpul (*umbonate*), isolat 40a sedikit cembung (*low convex*), isolat 40b pertumbuhannya tebal dan membentuk cekungan (*raised with concave belive edge*), sedangkan isolat 49 yaitu tipis biasanya merata (*effuse*). Tepi koloni isolat 20 dan 40b adalah rata (*entire*), isolat 40a seperti berfilamen (*lacerate*), sedangkan isolat 49 terdapat seperti telinga (*lobate*). Struktur dalam koloni isolat 20 dan 40b adalah halus dan licin (*smooth*), isolat 40a kasar bergranular (*coarsely granular*), sedangkan isolat 49 dapat meneruskan sinar meskipun benda dibawahnya tidak terlihat jelas (*translucent*). Sedangkan karakterisasi mikroskopis menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri termasuk bakteri Gram negatif yang memiliki bentuk sel batang (*bacillus*) dengan ujung sel membulat (*rounded end*) dan berupa sel tunggal (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Karakterisasi morfologi isolat 20, 40a, 40b dan 49 secara makroskopis dan mikroskopis

Karakterisasi morfologi	Isolat 20	Isolat 40a	Isolat 40b	Isolat 49
Warna koloni	Putih	Putih	Putih	Putih
Bentuk koloni	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Irregular</i>
Elevasi koloni	<i>Umbonate</i>	<i>Low convex</i>	<i>RWCBD</i>	<i>Effuse</i>
Tepi koloni	<i>Entire</i>	<i>Lacerate</i>	<i>Entire</i>	<i>Lobate</i>
Struktur dalam	<i>Smooth</i>	<i>Coarsely granular</i>	<i>Smooth</i>	<i>Translucent</i>
				
Pengecatan Gram	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Bentuk sel	batang	batang	batang	batang
				

Keterangan: \*) Koloni tunggal pada media NA plate setelah inkubasi 48 Jam

\*\*) Pembesaran 1000x menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX21 dengan pembesaran gambar 20x menggunakan kamera Casio EX-Z370

Menurut Pelezar dan Chan (2007), bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel dengan lapisan peptidoglikan yang tipis dan kadar lipid yang tinggi dibanding bakteri gram positif. Pada pewarnaan gram, kandungan lipid yang tinggi pada membran sel bakteri Gram negatif dapat larut dengan penambahan alkohol, sehingga menyebabkan permeabilitas membran sel menjadi lebih besar. Hal ini mengakibatkan pewarna utama yang membentuk kompleks kristal-iodin pada permukaan sel menjadi mudah terlepas dan membran sel bakteri Gram negatif menjadi bening. Sehingga saat diberi safranin sebagai warna penutup, dinding sel bakteri Gram negatif akan menyerap safranin dan menyebabkan sel bakteri gram negatif berwarna merah.



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Hasil isolasi bakteri dari *vermicomposting* TKKS diperoleh 51 isolat bakteri dari *vermicomposting* TKKS dan semua isolat tersebut memiliki aktivitas selulolitik. Empat isolat yang menunjukkan indeks aktivitas selulase tinggi adalah isolat 20 (11,90), 40a (10,97), 40b (11,29), dan 49 (11,24). Isolat 20 menunjukkan kemampuan pembentukan gula reduksi tertinggi yaitu sebesar 12,27  $\mu\text{g/mL}$  di CMC dan 49,31  $\mu\text{g/mL}$  di TKKS, isolat 40a sebesar 3,48  $\mu\text{g/mL}$  di CMC dan 24,54  $\mu\text{g/mL}$  di TKKS, isolat 40b sebesar 6,28  $\mu\text{g/mL}$  di CMC dan 11,21  $\mu\text{g/mL}$  di TKKS, sedangkan isolat 49 memiliki kemampuan pembentukan gula reduksi rendah yaitu 3,10  $\mu\text{g/mL}$  di CMC dan 8,25  $\mu\text{g/mL}$  di TKKS. Karakterisasi isolat menunjukkan empat isolat bakteri selulolitik terpilih termasuk kelompok bakteri Gram negatif dengan bentuk sel batang.

### 5.2 Saran

Isolat bakteri selulolitik terpilih yang diperoleh masih belum diketahui spesiesnya, sehingga perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut. Isolat bakteri selulolitik terpilih dapat ditambahkan sebagai agen hayati pada *vermicomposting* TKKS. Selain itu perlu dilakukan optimasi suhu dan pH untuk produksi enzim komersial yang bersubstat TKKS.

## DAFTAR PUSTAKA

### Buku

- Black, Evans, White, Ensminger, dan Clark. 1965. *Methods of soil analysis*. USA: Publisher madison.
- Cappuccino, J.G. dan Sherman, N. 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual*. California: Cummings Publishing Company, Inc.
- Dominguez, J., Aira, M., dan Brandon, M.G. 2010a. *Vermicomposting: Earthworm Enhance the Work of Mikrobies*. Diedit oleh Insam, H., Franke-Whittle, I., dan Goberna, M.. *Microbes at Work from Wastes to Resources*. New York: Spinger Heidelberg Dordrecht.
- Dominguez, J. 2011b. *The Microbiology of Vermicomposting*. London: Francis Group LLC.
- Hanafiah, Anas, Napoleon dan Ghoffar. 2005. *Biologi Tanah Ekologi & Mikrobiologi Tanah*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Jutono, Soedarsono, Hartadi, Suhadi, dan Soesanto. 1980. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*. Yogyakarta: Departemen mikrobiologi Fakultas pertanian UGM.
- Kayser, Bienz, Eckert dan Zinkernagel. 2005. *Medical Microbiology*. Germany: Georg Thieme Verlag Stuttgart Germany.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1*. Terjemahan oleh Thenewidjaj, M. *Principles of Biochemistry*. Jakarta: Erlangga.
- Mansur. 2001. *Vermikompos (Kompos Cacing Tanah) Pupuk Organik Berkualitas dan Ramah Lingkungan*. Mataram: IPPTP Mataram Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Moat, A.G., Foster, J.W., dan Spector, M.P. 2002. *Microbial Physiology Fourth edition*. New York: Wiley-liss, Inc.
- Munroe, G. 2009. *Manual of On-Farm Vermicomposting and Vermiculture*. Canada: Organic Agriculture Centre of Canada.

- Nagavallemma, Wani, Stephane, Padmaja, Vineela, Babu, dan Sahrawat, 2004. *Vermicomposting: Recycling Wastes Into Valuable Organic Fertilizer*. Andra Pradesh: Crops Research Institute for the Semi-Arid Tripics.
- Naibaho, P.M. 1998. *Teknologi Pengolahan Kelapa Sawit*. Medan: Pusat Penelitian Kelapa Sawit.
- Pelezar, M. J. dan Chan, E. C. S. 2007. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Terjemahan Hadioemoto, R.S., Imas, T., Jitromo, S.S., dan Angka, S.L. *Elements of Microbiology*. Jakarta: UI Press.
- Purwoko, T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Rao, S. N.S. 1994. *Mikroba Tanah dan Pertumbuhan Tanaman Edisi Kedua*. Jakarta: UI-PRESS.
- Stryer, L. 2000. *Biokimia Edisi 4 Volume 2*. Terjemahan Sidikin, M. *Biochemistry*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.

### **Tidak Diterbitkan**

- Afriani, M. 2011. Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Ragi Roti Terhadap Kadar Bioetanol dari Fermentasi Glukosa Hasil Hidrolisis Selulosa Tandan Kosong Kelapa Sawit. *Skripsi*. Medan: Departemen Kimia FMIPA Universitas Sumatera Utara.
- Fadillah, R.F. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik Pengurai Sampah Organik dari Berbagai Tempat. *Skripsi*. Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Hasibuan, H. 2005. Isolasi dan Uji Potensi Mikroba Selulolitik dalam Mendegradasi Limbah Tandan Kosong Sawit. *Tesis*. Medan: Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatra Utara.
- Isroi. 2009. Bioteknologi Mikroba untuk Pertanian Organik. *Artikel*. Lembaga Riset Perkebunan Indonesia.
- Kahfi, F. 2007. Sifat Fisis Mekanis Papan Gypsum dari Tandan Kosong Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* jacq.) dengan Perlakuan Perendaman dan Variasi Kadar Gypsum. *Skripsi*. Medan: Fakultas Pertanian Universitas SUMUT.

- Pasaribu, F. L., Yenie, L., dan Muria, S. R. 2013. Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Waktu Fermentasi pada Pemanfaatan Limbah Kulit Nanas (*Ananas Comosus*. L.Merr) untuk Produksi Enzim Selulase. *Artikel Ilmiah*. Riau: Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Riau.
- Rahmi, F. L., Dahliaty, A., dan Devi, S. 2013. Optimalisasi Komposisi Media dan Konsentrasi Sumber Karbon Produksi Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Strain Lokal S-16 dan S-22. *Artikel Ilmiah*. Pekanbaru: Program Studi S1 Kimia Bidang Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Binawidya Pekanbaru.
- Safriani. 1995. Kajian Kondisi Fermentasi pada Selulase dari Limbah Kelapa Sawit (Tandan Kosong dan Sabut) oleh *Neurospora sitophila*. *Skripsi*. Bogor. Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- Sari, R.F. 2010. Optimasi Aktivitas Selulase Ekstraseluler dari Isolat Bakteri Rf-10. *Skripsi*. Bogor: Departemen Biokimia Fmipa IPB.
- Silaban, R. 1999. Enzim Selulolitik Pada Bakteri *Pseudomonas alcaligenes* PaAf-18. *Tesis*. Bandung: Program Doktor ITB.
- Octavia, B. 2010. Kajian Kekayaan Bakteri *Indigenous* Indonesia untuk Bioremediasi Limbah. *Skripsi*. Yogyakarta: Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta.
- Warsana. 2009. *Kompos Cacing Tanah (Casting)*. Jawa Tengah: Tabloid Sinar Tani, 4 Februari 2009.

### **Terbitan Berkala**

- Abalos, Arribas, Garda, dan Santamaria. 1997. Effect of Carbon Source on the Expression of CelIAI, a Cellulase-encoding Gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *FEMS Microbial Letters*. Vol. 153: 97-103.
- Aira, M., Mcnamara, N.P dan Pearce, G.T. 2009. Microbial Communities of *Lumbricus terrestris* L. Middens: Structure, Activity, and Changes Through Time in Relation to Earthworm Presence. *Journal Soil Sediment*. Vol. 9: 54-61.
- Alam M. Z., Machhur, M. A., dan Anwar M. N. 2004. Isolation, Purification, Characterization of Cellulolytic Enzymes Produced by *Streptomyces amiaensis*. *Journal Biology Science*. Vol. 7(10): 1647-1653.

- Anand, Vennison, Sankar, Prabhu, Vasam, Raghuraman, Geoffrey, dan Vendan. 2009. Isolation and Characterization of Bacteria from the Gut Of *Bombyx Mori* that Degrade Cellulose, Xylan, Pectin and Starch and Their Impact on Digestion. *Journal of Insect Science*. Vol. 10(107): 1-20
- Anindyawati, T. 2010. Potensi Selulase dalam Mendegradasi Lignoselulosa Limbah Pertanian Untuk Pupuk Organik. *Berita Selulosa*. Vol. 45(2):70-77.
- 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 Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 46: 263 -267.
- Baharuddin, Razak, Hock, Ahmad, Aziz, Rahman, Shah, Hassan, Sakai dan Shirai. 2010. Isolasi and Characterization of Thermophilic Cellulase-Producing Bacteria from Empty Bunches-Palm Oil Mill Effluent Compost. *Journal of Applied Science*. Vol.7(1): 56-62.
- Darnoko, 1992. Potensi Pemanfaatan Limbah Lignoselulosa Kelapa Sawit Melalui Biokonversi. *Berita Penelitian Perkebunan*. Vol. 2(2): 85 – 87.
- Gupta, P., Samant, K dan Sahu, A. 2012. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. *International Journal of Microbiology*. Vol. 10: 1-5.
- Han, Yukawa, Inui, dan Doi. 2003. Regulation of Expression of Cellulosomal Cellulase and Hemicellulase Genes in *Clostridium cellulovorans*. *Journal of Bacteriol.* Vol. 185(20): 6067-6075.
- Howard, Abotsi, Rensburg, dan Howard. 2003. Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. *Review Journal of Biotechnology*. Vol. 2(12): 602-619.
- Kasana, Salwan, Dhar, Dutt dan Gulati. 2008. A Rapid dan Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol.* Vol. 57: 503–507.
- Katz, M dan Reese, E. T. 1968. Production Of Glucose By Enzymatic Hydrolysis Of Cellulose. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 16(2): 419-420.

- Martina, A., Yuli, N., dan Sutisna, M. 2002. Optimasi Beberapa Faktor Fisik Terhadap Laju Degradasi Selulosa Kayu Albasia (*Paraserianthes falcataria* (L.) Nielsen dan Karboksimetil selulosa (CMC) secara Enzimatis oleh Jamur. *Jurnal Natur Indonesia*. Vol. 4(2): 156-163.
- Meryandini, Wahyu, Besty, Titi, Nisa, dan Hasrul. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Jurnal Makara Sains*. Vol. 13(1): 33-38.
- Nelson, N. 1944. A Photometric Adaptation of The Somogyi Method for The Determination of Glucose. *Journal of Bioogyl Chem*. Vol. 153: 375-381.
- Purwadaria, Marbun, Sinurat dan Ketaren. 2003. Perbandingan Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri dan Kapang Hasil Isolasi dari Rayap. *JITV*. Vol. 8(4): 213-219.
- Somogyi, M. 1945. A New Reagent for The Determination of Sugars. *Journal of Biology Chem*. Vol. 160: 61-73.
- Sudiana, Rahayu, Imaduddin, dan Rahmansyah. 2001. Cellulolytic Bacteria of Soil of Gunung Halimun Nasional Park. *Berita Biologi*. Vol 5(6): 703-710.
- Subramaniyan, P.P. 2000. Cellulase-free Xylanases from Bacillus and Other Microorganisms. *FEMS Microbiology Letters Review*. Vol. 183: 1-7.
- Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R dan Pandey, A. 2005. Microbial Cellulases: Production, Applications and Challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*. Vol. 64: 832-844.
- Wiratmaja, G.I., Kusuma, I.G.B.W., dan Winaya, I.N.S. 2011. Pembuatan Etanol Generasi Kedua dengan Memanfaatkan Limbah Rumput Laut *Eucheuma cottoni* sebagai Bahan Baku. *Jurnal Teknik Mesin*. Vol. 5(1): 75-84.
- Yoo, Jung, Chung, Lee dan Choi. 2004. Molecular Cloning and Characterization of CMC Case Gene (celC) from *Salmonella typhimurium* UR. *Journal of Microbiol*. Vol. 42(3): 205-210.

#### **Media Elektronik (Internet)**

- Kementerian Pertanian. 2011. Tandan Sawit untuk Industri Otomotif. (on line) [http://pmlseaepaper.pressmart.com/mediaindonesia/PUBLICATIONS/MI/M I/2011/12/28/PagePrint/28\\_12\\_2011\\_024.pdf](http://pmlseaepaper.pressmart.com/mediaindonesia/PUBLICATIONS/MI/M I/2011/12/28/PagePrint/28_12_2011_024.pdf). [1 Maret 2012].

- Matthew, Sherry, Bryan, dan Jenkins. 2003. How Straw Decomposes: Implication for Straw Bale Construction. (on line) [http://www.osbbc.ca/Resources/Documents/Technical/how\\_straw\\_decomposes.pdf](http://www.osbbc.ca/Resources/Documents/Technical/how_straw_decomposes.pdf). [26 Februari 2013].
- Sabaruddin, D. 2011. Vermicomposting EFB / TKKS Di PIPOC 2011-KLCC Malaysia. (on line) [www. Bengkelden.com](http://www.Bengkelden.com). [1 Maret 2012].
- Saraswati, R., Santosa, E dan Yuniarti, E. 2010. Organisme Perombak Bahan Organik. (online) [http://balittanah.litbang.deptan.go.id /pupuk10. Pdf](http://balittanah.litbang.deptan.go.id/pupuk10.Pdf). [2 Maret 2012].
- Suparjo. 2008. Degradasi Komponen Lignoselulosa oleh Kapang Pelapuk Putih. (on line) [jajo66.files.wordpress.com/2008/10/degradasi-lignoselulosa.pdf](http://jajo66.files.wordpress.com/2008/10/degradasi-lignoselulosa.pdf). [1 April 2013].

### **Konsultasi Pribadi**

Muzakhar, K. “Substrat Alkali Ekstrak TKKS”. Universitas Jember. Jember, 2012.

## LAMPIRAN

### A. Komposisi Media dan Reagen

#### A.1 Komposisi Media *Nutrien Agar* (NA)

Bahan	Jumlah/liter
Pepton	5 gr
Meat ekstrak	3 gr
Agar	12 gr
Akuades	1000 ml

#### A.2 Komposisi Media CMC 1%

Bahan	Jumlah/liter
CMC	10 gr
Agar	15 gr
Akuades	1000 ml

#### A.3 Komposisi Media Substrat Alkali Ekstrak TKKS 0,5 %

Bahan	Jumlah/liter
Substrat Alkali Ekstrak TKKS	0,5 gr
Agar	1,5 gr
Akuades	100 ml

#### A.4 Komposisi Buffer Phosfat pH-7 1M

Bahan	Jumlah/liter
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	70,16 gr
$KH_2PO_4$	26,19 gr
akuades	1000 ml

#### A.5 Komposisi Reagen Somogyi-Nelson

##### 1. Komposisi Reagen Somogyi

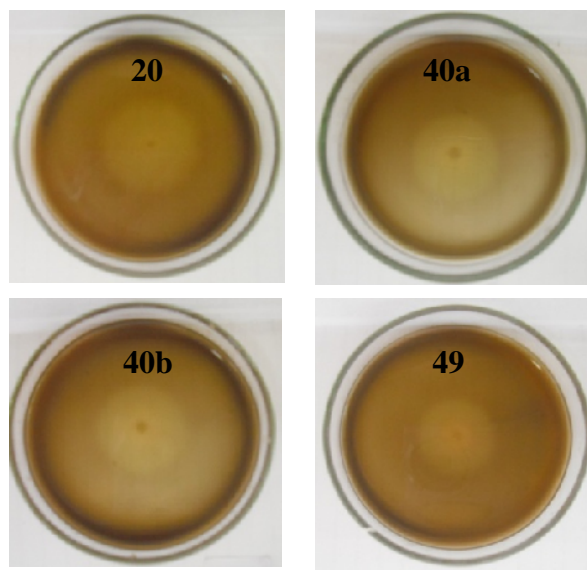
Bahan	Jumlah/liter
$Na_2CO_3$ anhidrous	24 gr
Potassium sodium tartrate tetrahydrat	12 gr
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1 gr
$NaHCO_3$	16 gr
$Na_2SO_4$ anhidrous	180 gr
akuades	1000 ml



## 2. Komposisi Reagen Nelson

Bahan	Jumlah/liter
$(\text{NH}_4)_2\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50 gr
Sulfanic acid	40 ml
$\text{NaHSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6 gr
akuades	1000 ml

### B. Pembentukan Zona Bening Isolat Bakteri Terpilih pada Media Alkali Ekstrak TKKS



Gambar 1 Analisis Semikuantitatif isolat-isolat Bakteri selulolitik pada Media alkali ekstrak TKKS 0,5% setelah inkubasi 48 jam.

### C. Jumlah Sel Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih pada Media TKKS Cair

Waktu inkubasi (jam)	Isolat Bakteri Selulolitik							
	Jumlah Sel (CFU/ml)				Jumlah Log Sel (CFU/ml)			
	20	40a	40b	49	20	40a	40b	49
0	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	2,00	2,00	2,00	2,00
6	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	2,00	2,00	2,00	2,00
12	$1 \times 10^1$	$5,4 \times 10^4$	$6,6 \times 10^4$	$1 \times 10^1$	2,00	4,73	4,81	2,00
18	$2,9 \times 10^5$	$9,5 \times 10^5$	$9,2 \times 10^5$	$7,2 \times 10^3$	5,46	5,70	5,96	3,85
24	$2,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$5,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	5,32	6,14	5,76	6,14
30	$6,1 \times 10^5$	$1,01 \times 10^6$	$1,12 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	5,78	6,00	6,08	6,63
36	$6,6 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$	$8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	5,81	5,81	5,90	6,11
42	$7 \times 10^5$	$9,25 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	5,84	5,96	5,78	6,23
48	$9,9 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$	$8 \times 10^6$	5,99	6,07	6,83	6,90
60	$3,6 \times 10^6$	$9,9 \times 10^6$	$1,12 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$	6,55	6,98	7,08	6,87

### D. Hasil Kurva Standart Glukosa

