



**SKRINING DAN AKTIVITAS ENZIM BAKTERI
SELULOLITIK YANG BERASAL DARI MIDGUT LARVA
BLACK SOLDIER FLY (*Hermetia illucens* L.)
(Diptera :Stratiomyidae)**

SKRIPSI

Oleh

Khilia Nisa'

NIM 141810401009

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**SKRINING DAN AKTIVITAS ENZIM BAKTERI
SELULOLITIK YANG BERASAL DARI MIDGUT LARVA
BLACK SOLDIER FLY (*Hermetia illucens* L.)
(Diptera :Stratiomyidae)**

SKRIPSI

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

Oleh

Khilia Nisa'

NIM 141810401009

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan dengan penuh rasa syukur dan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan nikmat dan karunianya sehingga skripsi ini dapat berjalan dengan lancar;
2. Ayah Mohammad As'ad, Ibu Kholilah, adik saya Ana Faizah, Kakek saya Mohammad Thoha dan Achmad Baidowi, Nenek saya Maryam dan Almh. Muntama beserta seluruh keluarga besar atas do'a dan dukungannya untuk saya;
3. Guru-guru mulai dari TPQ, TK, SD, SMP, SMA hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmunya yang bermanfaat selama ini;
4. Almamater tercinta yaitu Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

Dan sesungguhnya telah Kami berikan hikmah kepada Lukman, yaitu: Bersyukurlah kepada Allah. Dan barang siapa yang bersyukur (kepada Allah), maka sesungguhnya ia bersyukur untuk dirinya sendiri; dan barang siapa yang tidak bersyukur, maka sesungguhnya Allah Maha Kaya lagi Maha Terpuji
(QS. Ibrahim : 7)

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan
(QS. Al-insyirah : 5)

^{*)} Departemen Urusan Agama Islam, Wakaf, Dakwah dan Irsyad Kerajaan Saudi Arabia.1995. Al-Qur'an dan terjemahannya dalam Bahasa Indonesia. Madinah Al Munawwarah: Komplek Percetakan Alquranul Karim Kepunyaan Raja Fahd.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Khilia Nisa'

NIM : 141810401009

menyatakan dengan sebenarnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Skrining dan Aktivitas Enzim Bakteri Selulolitik yang Berasal dari Midgut Larva Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) (Diptera : Stratiomyidae)” adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institut manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus saya junjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan kesadaran dan sebenarnya, tanpa adanya tekanan atau paksaan dari pihak manapun. Saya bersedia menerima sanksi akademik jika dikemudian hari pernyataan yang saya tulis ini terbukti tidak benar.

Jember, 23 Juli 2018

Yang menyatakan,

Khilia Nisa'

NIM 141810401009

SKRIPSI

**SKRINING DAN AKTIVITAS ENZIM BAKTERI SELULOLITIK YANG
BERASAL DARI MIDGUT LARVA BLACK SOLDIER FLY (*Hermetia
illucens*) (Diptera : Stratiomyidae)**

Oleh

Khilia Nisa'

NIM 141810401009

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Purwatiningsih, S.Si, M.Si, Ph.D.

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Skrining dan Aktivitas Enzim Bakteri Selulolitik yang Berasal dari *Midgut* Larva Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) (Diptera : Stratiomyidae)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji

Ketua,

Sekretaris,

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.
NIP. 196805031994011001

Purwatiningsih, S.Si, M.Si, Ph.D.
NIP. 197505052000032001

Anggota I,

Anggota II,

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes
NIP. 196008161989021001

Drs. Siswanto, M.Si
NIP. 196012161993021001

Mengesahkan

Dekan,

Drs. Sujito Ph.D.

NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Skrining dan Aktivitas Enzim Bakteri Selulolitik yang Berasal dari Midgut Larva Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) (Diptera: Stratiomyidae) ; Khilia Nisa', 14181040100; 2018: 51 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Hermetia illucens, lebih dikenal dengan warna hitam lalat tantara. Lalat ini awalnya hanya tersebar di daerah Neotrika dan sekarang sudah ditemukan di setiap wilayah zoogeografis setelah puluhan tahun menyebar ke seluruh bagian dunia terutama pada daerah yang beriklim tropis. Aktivitas makan dari *H. illucens* hanya terjadi di tahap larva. Selama fase larva, lalat ini merupakan serangga yang memiliki aktivitas makan yang sangat tinggi dalam memakan bahan organik seperti limbah dari tumbuhan (buah-buahan dan sayuran busuk), bangkai hewan dan pupuk kandang yang sekaligus dijadikan sebagai habitat dari larva tersebut. Larva *H. illucens* mampu mengkonsumsi makanan sebanyak 25-500 mg materi segar per larva setiap harinya. Kemampuan ini didukung oleh bentuk mulut larva *H. illucens* yang sangat kuat dan memiliki bentuk seperti pengait (*hook*). Larva *H. illucens* mencerna makanannya dibantu oleh beberapa enzim dalam sistem pencernaannya seperti enzim selulase. Enzim selulase diperoleh dari bakteri selulolitik yang bersimbiosis dalam usus (*gut*) *H. illucens*. Pemanfaatan bakteri selulolitik sebagai penghasil enzim selulase sangat penting dalam proses konversi. Bakteri tersebut mampu menguraikan selulosa menjadi glukosa sebagai sumber karbon dan sumber energi.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : (i) isolasi bakteri, (ii) pemurnian bakteri, (iii) pembuatan reagen *Somogyi-Nelson*. Dilanjutkan dengan identifikasi dan fisiologi mikrob antara lain : (i) Pengamatan makroskopis meliputi morfologi dan indeks aktivitas enzim, (ii) Pengamatan mikroskopis meliputi pewarnaan gram, pewarnaan endospora, dan uji katalase, (iii) Uji biokimia meliputi uji karbohidrat, uji motilitas, dan uji simon sitrat. Tahap terakhir adalah produksi

enzim antara lain : (i) penentuan kurva standart glukosa, (ii) produksi ekstrak enzim kasar, (iii) penentuan kurva aktivitas enzim selulase.

Hasil isolasi bakteri pada *midgut H. illucens* ditemukan 2 spesies bakteri yaitu *Proteus* sp. dan *Klebsiella* sp.. Kedua spesies bakteri ini memiliki aktivitas enzim selulase masing-masing. *Proteus* sp. mampu menghasilkan gula reduksi dengan aktivitas enzim selulase maksimum pada hari ke-3 sebanyak 23,615 $\mu\text{g/ml}$ pada substrat CMC. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Osho *et al.*, (2017) *Proteus* sp. dapat menghasilkan enzim β -D-glucosidase dengan waktu inkubasi maksimum pada hari-3 atau pada jam ke- 72 dengan substrat CMC. Enzim β -D-glucosidase merupakan salah satu jenis enzim selulase. Bakteri *Klebsiella* sp. memiliki aktivitas enzim selulase maksimum pada hari ke-3 dengan jumlah gula reduksi sebanyak 37,462 $\mu\text{g/ml}$ pada media CMC. *Klebsiella* sp. dapat menghasilkan enzim selulase yang mampu mendegradasi selulosa menjadi glukosa (Yu *et al.*, 1985). Aktivitas enzim selulase yang ditandai dengan jumlah gula reduksi pada *Klebsiella* sp. lebih tinggi dari pada *Proteus* sp. disebabkan karena jumlah sel pada *Klebsiella* sp. lebih banyak dibandingkan pada *Proteus* sp. (Lampiran E.). Uraian hasil tersebut disimpulkan bahwa bakteri *Proteus* sp. dan *Klebsiella* sp. adalah bakteri selulolitik yang ditandai adanya aktivitas enzim selulase.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT. Atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Skrining dan Aktivitas Enzim Bakteri Selulolitik yang Berasal dari Midgut Larva Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*)”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program strata satu (S1) pada jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, sehingga penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama, dan Purwatingsih, S.Si, M.S.i, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam penulisan skripsi ini;
2. Drs. Rudju Winarsa, M.Kes., selaku Dosen Penguji I dan Drs. Siswanto M.Si., selaku Dosen Penguji II yang banyak memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi;
3. Fuad Bahrul Ulum, S.Si, M.Sc., dan Dr. Retno Wimbaningrum, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam peningkatan prestasi akademik penulis;
4. Ir. Endang Soesetyaningsih, selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi yang banyak membantu penulis selama penelitian;
5. Ayah, ibu, adik, kakek, nenek dan seluruh keluarga yang telah memberikan banyak do'a, motivasi, materi, dan dukungan yang tiada henti;
6. Rekan Kerja “Enzyme Squad” Syafiq U., Putri N.R, Azizah, Zunairoh N.K, Fianda D., Erlinkha dan Dwi N.H dan rekan kerja di Laboratorium Mikrobiologi Nurhalimah, Eka Y. dan Dela D.A serta teman-teman angkatan 2014 “Mak-mak Bivalvia” yang telah memberi tawa dan canda selama masa perkuliahan;

7. Teman-teman tersayang Masrurotul H., Azizah, Fisel K., Femin D., dan Anisatul M. sebagai tempat berbagi luka dan suka disaat momen lucu, senang, maupun sedih;
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis memohon maaf apabila terdapat kesalahan penulisan. Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Jember, 23 Juli 2018

Penulis

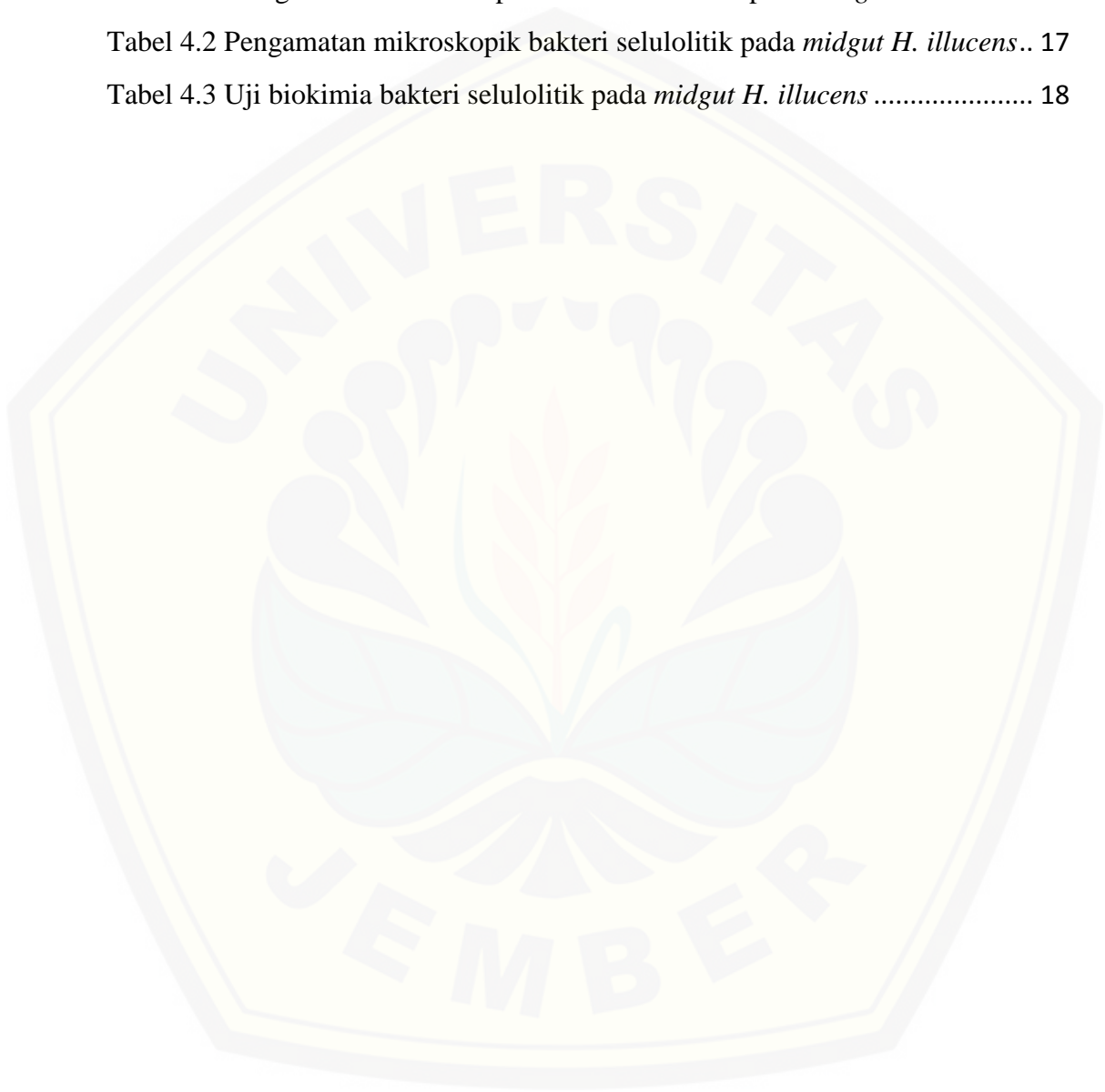
DAFTAR ISI

	Halaman
PERSEMBAHAN	ii
MOTO	iii
PERNYATAAN	iv
PERSEMBAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Selulosa dan Selulase	4
2.2 Black Soldier Fly (<i>Hermetia illucens</i> L.)	5
2.3 Bakteri selulolitik pada usus larva <i>H. illucens</i>	8
BAB 3. METODE PENELITIAN	10
3.1 Tempat dan Waktu	10
3.2 Alat dan bahan.....	10

3.3 Prosedur Penelitian.....	10
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	15
4.2 Pengamatan secara makroskopik.....	15
4.2 Pengamatan secara mikroskopik	17
4.3 Uji Biokimia	18
4.3 Aktivitas Enzim Bakteri Selulolitik	20
BAB 5. PENUTUP.....	24
5.1 Kesimpulan.....	24
5.2 Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN.....	31

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Pengamatan makroskopis bakteri selulolitik pada <i>midgut H. illucens</i> .	15
Tabel 4.2 Pengamatan mikroskopik bakteri selulolitik pada <i>midgut H. illucens</i> ..	17
Tabel 4.3 Uji biokimia bakteri selulolitik pada <i>midgut H. illucens</i>	18

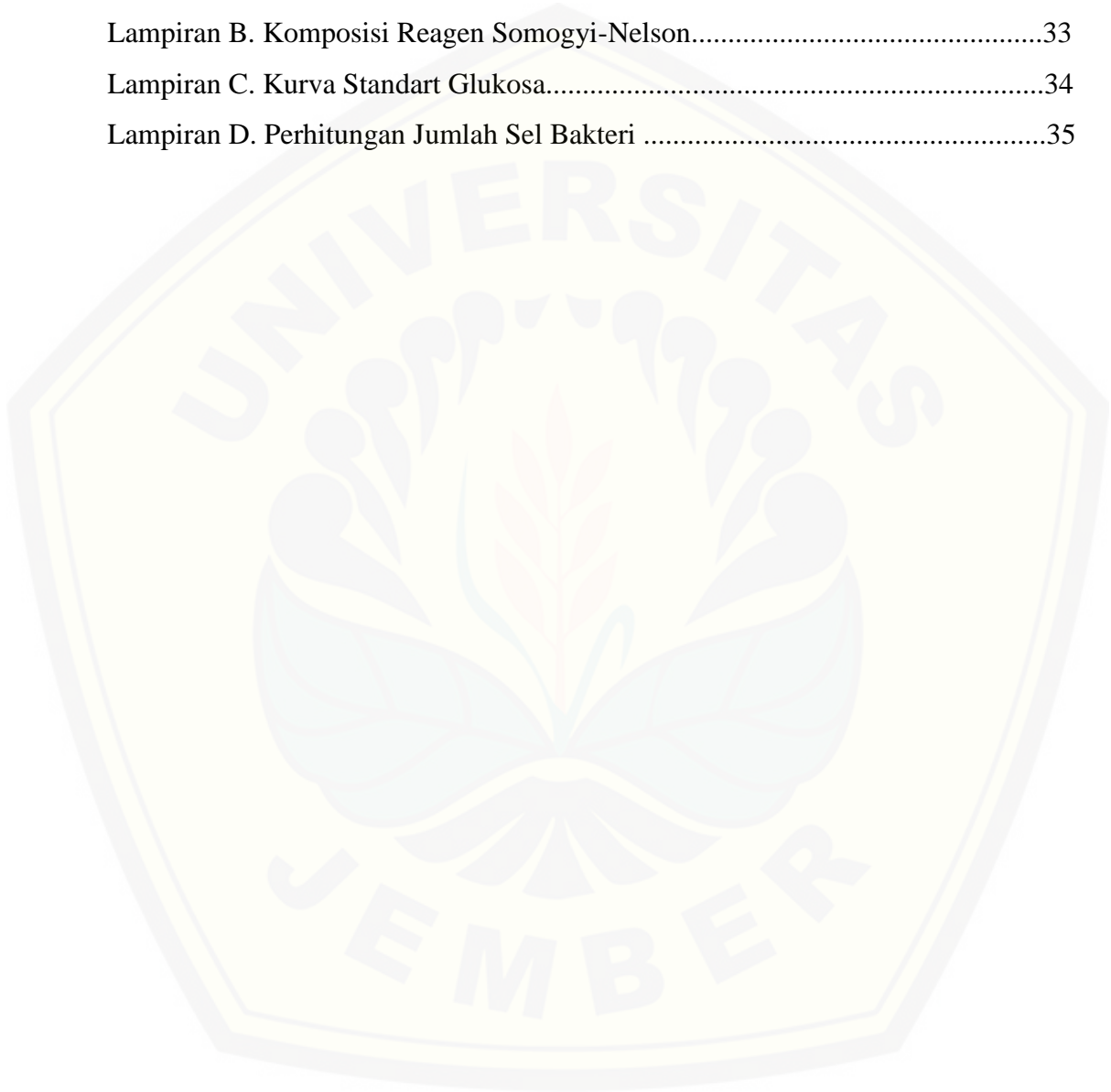


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Representasi Molekul Selulase.....	4
Gambar 2.2 Degradasi selulosa enzim selulase	5
Gambar 2.3 Siklus hidup <i>H. illucens</i>	6
Gambar 2.4 Morfologi Larva <i>H. illucens</i>	8
Gambar 2.5 Sistem pencernaan serangga.....	9
Gambar 4.1 Larva <i>H.illucens</i> umur 30 hari.....	15
Gambar 4.2 Uji aktivitas selulolitik isolat 1A (<i>Klebsiella</i> sp.) dan isolat 1B (<i>Proteus</i> sp.).....	16
Gambar 4.3 Aktivitas enzim selulase <i>Proteus</i> sp. berdasarkan waktu inkubasi....	21
Gambar 4.4 Aktivitas enzim selulase <i>Klebsiella</i> sp. berdasarkan waktu inkubasi	22

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Komposisi Media.....	31
Lampiran B. Komposisi Reagen Somogyi-Nelson.....	33
Lampiran C. Kurva Standart Glukosa.....	34
Lampiran D. Perhitungan Jumlah Sel Bakteri	35



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Industrialisasi dan urbanisasi merubah demografi dan perilaku konsumtif masyarakat di perkotaan (Bello *et al.*, 2016). Peningkatan jumlah penduduk mengakibatkan bertambahnya jenis dan volume limbah seperti di ibukota Indonesia Jakarta. Hal ini membuat pemerintah dihadapkan dengan tantangan baru dalam pengelolaan limbah secara efektif baik organik maupun anorganik. Penanganan limbah anorganik, Indonesia bekerja sama dengan bangsa lain. Antara tahun 1994 dan 1998, South-East Asia Local Solid Waste Improvement Project (SEALSWIP) dari program bantuan Canadian International Development Agency (CIDA), berhasil membantu masyarakat di Filipina, Thailand dan Indonesia dalam berbagai aspek pengelolaan limbah padat termasuk mengorganisir pemulung dan toko barang bekas, mendirikan 'bank limbah' untuk didaur ulang, tempat pembuangan sampah, dan memberikan pelatihan pengelolaan limbah berbahaya (UN-HABITAT, 2010). Terdapat pula teknologi yang telah dikembangkan untuk pengelolaan limbah, diantara yang paling banyak diterapkan adalah teknologi pengkomposan untuk penanganan limbah organik.

Pengkomposan merupakan suatu teknik pengolahan limbah yang mengandung bahan organik yang bersifat *biodegradable* (dapat diuraikan mikroorganisme). Kompos merupakan produk dari pengkomposan yang berguna sebagai pupuk organik, dapat memperbaiki struktur tanah, dan memperbesar kemampuan tanah dalam menyerap air serta zat hara (Subandriyo *et al.*, 2012). Proses ini melibatkan penggabungan berbagai parameter fisik, kimia dan biologi. Parameter biologis melibatkan mikroorganisme dan makroorganisme yang memainkan peran penting dalam degradasi limbah. Penelitian penguraian limbah telah banyak dilakukan dengan menggunakan mikroorganisme langsung dan sangat jarang menggunakan makroorganisme (Sagade dan Pejaver, 2009). Salah satu jenis makroorganisme yang dapat dimanfaatkan dalam proses pengkomposan adalah Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*).

Hermetia illucens, lebih dikenal dengan warna hitam lalat tantara. Lalat ini awalnya hanya tersebar di daerah Neotrika dan sekarang sudah ditemukan di setiap wilayah zoogeografis setelah puluhan tahun menyebar ke seluruh bagian dunia terutama pada daerah yang beriklim tropis (Marshall *et al.*, 2015). Aktivitas makan dari *H. illucens* hanya terjadi di tahap larva. Selama fase larva, lalat ini merupakan serangga yang memiliki aktivitas makan yang sangat tinggi dalam memakan bahan organik seperti limbah dari tumbuhan (buah-buahan dan sayuran busuk), bangkai hewan dan pupuk kandang yang sekaligus dijadikan sebagai habitat dari larva tersebut (Newton *et al.*, 2005). Larva *H. illucens* mampu mengkonsumsi makanan sebanyak 25-500 mg materi segar per larva setiap harinya (Hardouin and Mahoux, 2003). Kemampuan ini didukung oleh bentuk mulut larva *H. illucens* yang sangat kuat dan memiliki bentuk seperti pengait (*hook*). Larva *H. illucens* mencerna makanannya dibantu oleh beberapa enzim dalam sistem pencernaannya seperti enzim selulase. Enzim selulase diperoleh dari bakteri selulolitik yang bersimbiosis dalam usus (*gut*) *H. illucens* (Yu *et al.*, 2011).

Pemanfaatan bakteri selulolitik sebagai penghasil enzim selulase sangat penting dalam proses konversi. Bakteri tersebut mampu menguraikan selulosa menjadi glukosa sebagai sumber karbon dan sumber energi. Larva *H. illucens* juga bukan merupakan hama karena keberadaannya tidak mengganggu manusia seperti tidak tertarik dengan tempat tinggal maupun makanan manusia (Furman *et al.*, 1959) dan bukan sebagai vektor penyakit serta dapat memperbaiki sanitasi di negara berkembang (Banks *et al.*, 2014). Berdasarkan uraian tersebut, perlu adanya identifikasi bakteri selulolitik pada lalat *H. illucens* yang berperan dalam proses konversi limbah organik (biokonversi).

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

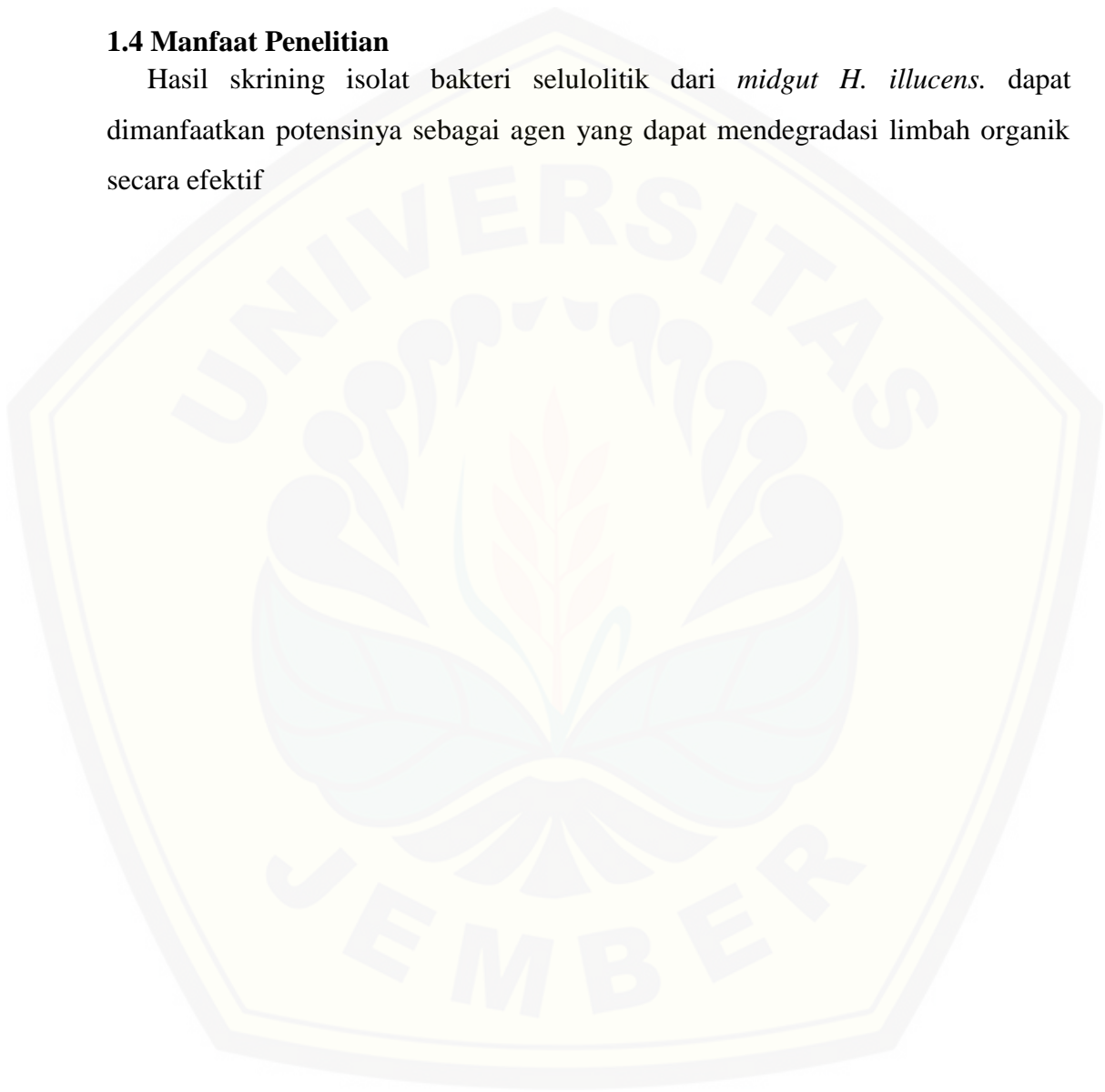
Adakah bakteri selulolitik yang bersimbiosis di dalam *midgut* Black Soldier Fly (*H. illucens*) dan bagaimana aktivitas enzim selulasenya ?

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri selulolitik pada *midgut* *H. illucens* serta mengetahui aktivitas enzim selulasenya

1.4 Manfaat Penelitian

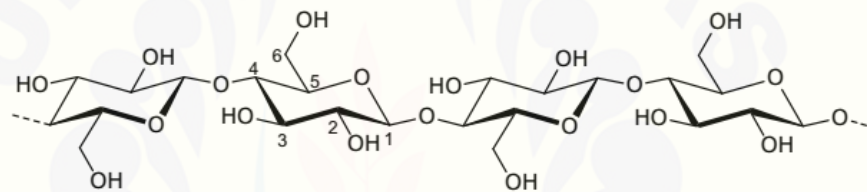
Hasil skrining isolat bakteri selulolitik dari *midgut* *H. illucens*. dapat dimanfaatkan potensinya sebagai agen yang dapat mendegradasi limbah organik secara efektif



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

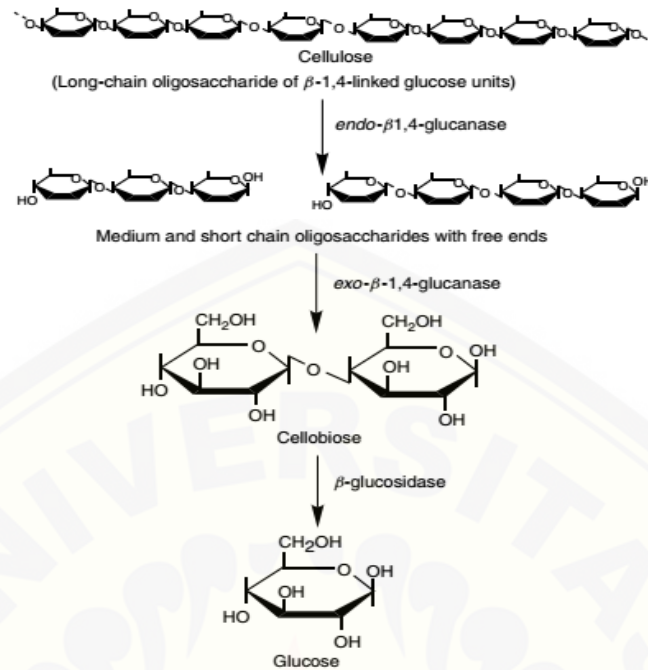
2.1 Selulosa dan Selulase

Selulosa merupakan komponen struktural penyusun sel tumbuhan yang jumlahnya melimpah di alam. Selulosa juga merupakan produk utama fotosintesis dan dapat dijadikan sebagai energi terbarukan. Struktur kimia selulosa yaitu polimer glukosa yang berikatan dengan ikatan β -1,4-glikosida berbentuk linear (Bairagi, 2016). Selobiosa adalah dua unit glukosa yang berulang dan memiliki panjang rantai 13 nm (Heinze, 2015). Adapun struktur selulosa adalah sebagai berikut :



Gambar 2.1 Representasi Molekul Selulase (Heinze, 2015)

Selulase adalah enzim yang dapat menghidrolisis ikatan β -1,4 dalam rantai selulosa. Enzim selulase dapat diproduksi oleh makhluk hidup seperti jamur, bakteri, tumbuhan dan hewan (Yang *et al.*, 2013). Bakteri yang memproduksi selulase disebut bakteri selulolitik. Terdapat tiga jenis enzim selulase yang bekerja secara sinergis dalam proses hidrolisis selulosa. Ketiga enzim tersebut adalah endo β -1,4-glukanase, selobiohidrolase/Eksoglukanase, dan β -D-glucosidase yang memiliki fungsi yang berbeda. Proses hidrolisis tersebut disebut dengan sistem selulolitik. Urutan hidrolisis selulosa diawali dengan selulosa dipotong menjadi oligosakarida yang lebih kecil dengan ujung rantai bebas dengan bantuan endo β -1,4-glukanase, selanjutnya ekso- β -1,4-glukanase membantu membebaskan selobiosa dari rantai selulosa dari ujung rantai selulase non-pereduksi atau rantai oligosakarida dan tahap akhir selobiosa dihidrolisis menjadi glukosa oleh β -glucosidase (Moat *et al.*, 2002).



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

2.2 Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* L.)

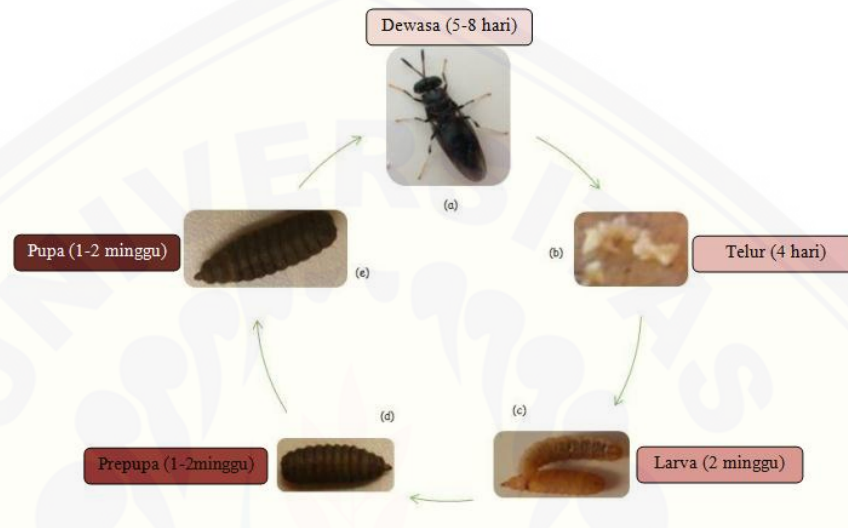
2.2.1 Sistematika *H.illucens*

H. illucens merupakan jenis serangga yang termasuk kedalam Familia Stratiomyidae. *H. illucens* tersebar di seluruh penjuru dunia, terutama didaerah beriklim sedang ataupun tropis (Tomberlin *et al.*, 2009). Lalat ini bukan merupakan hama. Hal ini dikarenakan serangga ini tidak tertarik hidup di tempat tinggal manusia maupun pada makanan (Ritika *et al.*, 2015). Sistematika *H. illucens* yaitu:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Arthropoda
Class	: Insecta
Order	: Diptera
Family	: Stratiomyidae
Subfamily	: Hermetiinae
Genus	: <i>Hermetia</i>
Species	: <i>Hermetia illucens</i> (Linnaeus, 1758)

2.2.2 Siklus Hidup *H. illucens*

H. illucens memiliki 5 tahap dalam siklus hidupnya antara lain telur, larva, prepupa, pupa dan fase dewasa (Gambar 2.3) (Banks, 2014). Masing-masing fase tersebut berbeda satu sama lain sehingga tergolong ke dalam serangga yang bermetamorfosis sempurna (holometabola) (Mutafela, 2015).



Gambar 2.3 Siklus hidup *Black Soldier Fly* (*H. illucens*) (Mutafela, 2015)

H. illucens jantan dan betina akan kawin selama terbang. *H. illucens* (betina) satu kali kawin bisa menghasilkan rata-rata 600-900 telur yang diletakkan di dekat sumber makanan. Telur-telur tersebut akan menetas setelah sekitar 102-105 jam (Booth dan Sheppard, 1984). Tahap selanjutnya setelah telur menetas yaitu larva. Larva *H. illucens* menjadi sangat unik karena kandungan mikrobiom unik di usus yang memungkinkan mencerna berbagai macam substrat seperti sampah organik, tinja dan sampah rumah tangga (Banks, 2014). Selama fase larva, lalat *H. illucens* adalah serangga yang memiliki aktivitas makan yang tinggi dalam memakan bahan organik seperti limbah dapur, sisa makanan (berasal dari hewan dan tumbuhan) dan pupuk kandang yang sekaligus dijadikan sebagai habitat dari larva tersebut. Larva *H. illucens* mampu mengonsumsi makanan sebanyak 25-500 mg materi segar per larva setiap harinya (Hardouin dan Mahoux, 2003). Kemampuan ini didukung oleh bentuk mulut larva *H. illucens* yang sangat kuat dan memiliki bentuk seperti pengait (*hook*). Fase dewasa *H. illucens* tidak memerlukan makanan dan dapat

mengandalkan lemak yang tersimpan dari tahap larva. (Newton *et al.*, 2005). Fase larva ini berlangsung sekitar 2 minggu sebelum masuk ke dalam fase prepupa yang tergantung pada kondisi lingkungannya. Ketika sumber makanan yang tersedia sangat sedikit, maka fase larva ini akan diperpanjang bahkan sampai mencapai 4 bulan (Furman *et al.*, 1959).

Pada kondisi lingkungan yang mendukung, setelah fase larva sekitar 2 minggu maka akan masuk ke dalam fase selanjutnya yaitu fase prepupa. Fase prepupa merupakan fase yang penting khususnya pada proses biokonversi sampah, karena pada fase ini larva *H. illucens* masih mampu untuk mencerna sampah-sampah yang menjadi sumber makanannya (Diener *et al.*, 2011). Tahap prepupa ditunjukkan oleh perubahan warna dan perilaku. Larva berubah dari putih menjadi warna coklat gelap dan adanya kecenderungan perilaku untuk bermigrasi dari tempat sumber makanan (habitat awal) menuju ke tempat yang lebih kering dan gelap untuk membentuk pupa (Banks, 2014; Tomberlin *et al.*, 2002). Tahap pupasi, yang merupakan tahap terakhir sebelum kemunculan *H. illucens* dewasa, biasanya memakan waktu sekitar dua minggu bersamaan dengan tahap prepupa. Setelah fase prepupa dan telah mendapatkan tempat yang sesuai, maka akan masuk ke dalam fase pupa. Fase ini berlangsung sekitar 1-2 minggu sebelum akhirnya menjadi *H. illucens* dewasa yang siap untuk berkembang biak (Mutafela, 2015).

2.2.3 Morfologi Larva *H. illucens*

Larva *H. illucens* memiliki ciri-ciri tubuh berbentuk oval, pipih, panjangnya $\pm 1,8$ mm (larva kecil) dan mencapai 6 cm (larva besar), terdapat sebelas segmen tubuh dengan sejumlah rambut pendek yang tersusun melintang, memiliki sepasang spirakel di bagian anterior, sementara spirakel posterior tersembunyi, mata jelas terlihat, kepala dapat bergerak, bagian mulut sederhana, maksila berkembang sempurna (Leclercq, 1997). Larva berwarna putih dan berangsur-angsur berubah menjadi warna coklat pada tahap prepupa dan warna hitam pada pupa. Tahap prepupa lalat *H. illucens* berada pada ukuran maksimum, menunjukkan kandungan protein sebesar (36-48%) dan lemak (31-33%) untuk melalui tahap metamorfosis selanjutnya. Instar terakhir ini menunjukkan sedikit perubahan morfologis

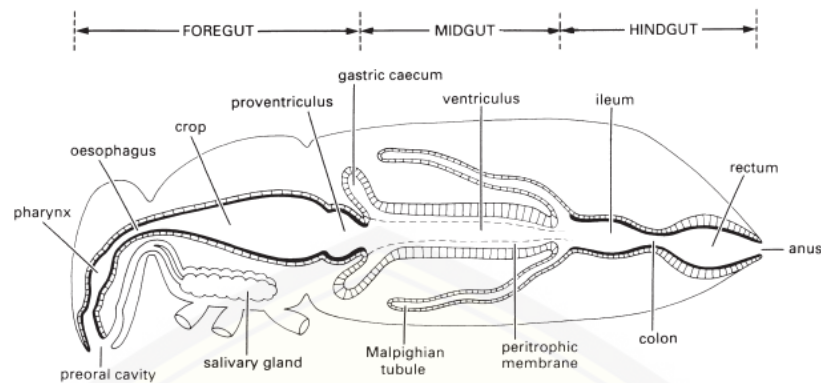
dibandingkan dengan instar sebelumnya. Labrum *Hermetia illucens* akan membengkok seperti paruh elang pada fase ini (Diener *et al.*, 2011).



Gambar 2.4 Morfologi Larva *H. illucens* (Sumber : <http://google.com>)

2.3 Bakteri selulolitik pada usus larva *H. illucens*

Sistem pencernaan *H. illucens* sama dengan serangga pada umumnya. Sistem pencernaan serangga terdiri dari *foregut*, *midgut*, dan *hindgut* (Gambar 2.4). *Foregut* yang terdiri atas cavitas preoral (mulut), faring, esophagus, crop, dan proventrikulus, bagian *midgut* meliputi gastrik ceca, ventrikulus dan tubulus malpighi sedangkan pada *hindgut* yaitu ileum, colon, rectum dan anus. *Foregut* berkaitan dengan proses pencernaan, penyimpanan, penghancuran, dan pengangkutan makanan ke bagian *midgut*. *Midgut* sebagai tempat pencernaan enzim pencernaan diproduksi dan disekresikan dan proses penyerapan nutrisi makanan terjadi di bagian ini. Bahan yang tersisa di lumen usus bersama urin dari tubulus malpighian kemudian masuk ke *hindgut*, dimana penyerapan air, garam, dan lainnya. Molekul yang masih berguna dalam tubuh diserap kembali menjadi fese yang dibuang melalui anus (Gullan dan Cranston, 2005).



Gambar 2.5 Sistem pencernaan serangga (Gullan dan Cranston, 2005)

Sistem pencernaan *H. illucens* bersimbiosis dengan berbagai macam mikroorganisme (Moran, 2006). Mikroorganisme yang hidup pada sistem pencernaan *H. illucens* yaitu protozoa dan bakteri simbiotik (Al-arif *et al.*, 2012). Mikroorganisme tersebut dapat menghasilkan enzim-enzim untuk mempermudah degradasi bahan organik. Kim *et al.*, (2011) melaporkan *H. illucens* memiliki banyak enzim yaitu Alakaline phosphatase, Esterase (C4), Esterase lipase, Lipase, Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, Trypsin, α -Chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -Galactosidase, β -Galactosidase, β -Glucuronidase, α -Glucosidase, β -Glucosidase, N-Acetyl- β -glucoaminidase, α - Mannosidase, dan α -Fucosidase. Beberapa jenis bakteri simbiotik mampu mendegradasi selulosa menjadi gula sederhana di midgut serangga *H. illucens* yang disebut dengan bakteri selulolitik (Douglas, 2009). Pemanfaatan bakteri selulolitik sebagai penghasil enzim selulase seperti β -glucosidase yang penting dalam proses konversi. Bakteri tersebut mampu menguraikan selulosa menjadi glukosa sebagai sumber karbon dan sumber energi. Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase berbeda, tergantung gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan (Vilanova *et al.*, 2012).

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 Februari 2018 sampai Juni 2018.

3.2 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 stirer*, neraca analitik, penggaris *Stainless Handened V-TEC* (30 cm), *shaker*, inkubator, *laminar air flow* (LAF), autoklaf, *colony counter*, mikroskop Olympus CX 21, mikroskop stereo, vortex, *sentrifuge*, spektrofotometer, tabung durham dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi midgut larva Black Soldier Fly (*H. Illucens*), media *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 1%, cat Gram (*iodine*, kristal violet, safranin), alkohol, aquades, NaOH, CH₃COOH, etanol, buffer fosfat 1 M, glukosa, dan reagen *Somogyi-Nelson*, larutan 3% H₂O₂, malachite hijau, akuades, larutan glukosa, larutan sukrosa, larutan laktosa, larutan arabinose, larutan maltose, dan larutan manitol, BTB (brom Timol Blue), pepton, 1% gula simon sitrat, dan *iodine* 0,03%.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Isolasi bakteri

Larva yang berusia 30 hari direndam kedalam alkohol 70% selama 5 menit. Larva ditiriskan dan diletakkan papan lilin paraffin lalu dilakukan proses pembedahan. Dibedah pada bagian abdomen dan diambil midgut sebanyak 5 ekor

larva. Dimasukkan kedalam 10 ml aquades (pengenceran 10^{-1}) dan divortex kemudian di spread plate menggunakan kaca bengkok pada media NA. Kultur diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C .

Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dimurnikan dengan menanam kembali beberapa kali pada media Nutrien Agar dalam cawan Petri dengan cara streak dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C sampai didapatkan seluruh biakan tersebut benar-benar murni. Biakan murni kemudian ditumbuhkan pada media selektif CMC (*Carboxy Methylene Cellulose*). Selanjutnya dilakukan pengamatan makroskopik dan mikroskopik, uji biokimia, serta uji aktivitas spesifik enzim selulase (Suprayitna, 2016).

3.3.2 Identifikasi dan Fisiologi bakteri

a. Pengamatan secara makroskopik

1) Pengujian Zona Bening

Pengujian zona bening dilakukan dengan menggunakan larutan I_2KI 0,03% (Lugol's Iodine) dan didiamkan selama 3-5 menit. Dibuang larutan Logul's iodine. Diamati dan diukur zona bening yang terbentuk. Indeks aktivitas selulolitik dapat diukur dengan menggunakan persamaan sebagai berikut (Kasana *et al.*, 2008)

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

2) Morfologi

Pengamatan morfologi bakteri didasarkan pada buku panduan Pedoman Praktikum Mikrobiologi umum (Jutono, *et al.*, 1980) meliputi bentuk koloni, permukaan elevasi, tepi koloni serta warna koloni.

b. Pengamatan secara mikroskopik

Pengamatan bakteri secara mikroskopik meliputi bentuk sel, pewarnaan Gram, uji katalase, dan uji endospora.

1) Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bakteri dilakukan dengan cara: kaca preparat dibersihkan dengan alkohol 70%. Preparat difiksasi di atas api bunsen sampai kering, kemudian ditetesi zat pewarna I (kristal violet), ditunggu selama 60 detik. Lalu dibilas dengan air bersih, dibiarkan mengering sebentar. Setelah kering kemudian preparat ditetesi Iodin selama 60 detik, dibilas dengan air. Kemudian dipudarkan dengan alkohol selama 2-3 detik sampai warna ungu hilang. Preparat ditetesi zat warna II (Safranin) dan dibilas dengan air bersih dan taruh kaca objek, dengan posisi tegak, di dalam rak kaca objek dan biarkan mengering. Kemudian diamati di bawah mikroskop dengan persebaran 1000x objek. Uji gram positif jika bakteri berwarna ungu, dan negative jika berwarna merah (Who, 2011)

2) Uji katalase

Uji katalase dilakukan dengan menambahkan larutan 3% H₂O₂ pada suspensi bakteri, selanjutnya diamati pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni. Terbentuknya gelembung menandai bahwa tersebut bersifat aerobik (menghilangkan gas).

3) Uji endospora

Biakan murni isolat bakteri dibuat menjadi suspensi bakteri dengan akuades steril, kemudian dipanaskan pada suhu 80 °C selama 10 menit, lalu ditetesi *malachite green*. Preparat ditetesi dengan menggunakan safranin, selanjutnya preparat dicuci dengan air mengalir kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Uji endospora adalah positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau (Who, 2011).

c. Uji biokimia

1) Uji karbohidrat

Inokulasi bakteri kedalam larutan yang masing-masing berisi glukosa, sukrosa, laktosa, arabinose, maltose, dan manitol. Tiap-tiap larutan mengandung Pr (*Phenol red*) sebagai indikator pH dan ditambahkan pepton sebagai sumber nitrogen, vitamin, dan mineral. Selanjutnya masing-masing campuran diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Uji karbohidrat adalah positif jika dalam tabung

durham terjadi pembentukan asam (perubahan warna dari merah menjadi kuning) dan pembentuk gas (Suprayitna, 2016).

2) Uji motilitas

Tujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk bergerak. Uji ini menggunakan teknik hanging drop yang diamati pada mikroskop. Hasil uji adalah positif jika terdapat pergerakan bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki alat gerak, misalnya flagel (Lay, 1994)

3) Uji sitrat

Dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi sitrat. Koloni bakteri diinokulasikan pada media “agar” yang mengandung 1,25 gram pepton water ditambahi 1% gula simon sitrat, kemudian dilarutkan dalam 50 mL aquades dalam tabung reaksi. Media campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37C selama 18-24 jam. Koloni yang berwarna biru menunjukkan hasil positif sedangkan yang berwarna hijau negatif (Lay, 1994).

Hasil dari identifikasi dan fisiologi mikrob yang telah dilakukan akan dibandingkan dengan buku *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology* (1994) untuk mengetahui spesies bakteri yang telah ditemukan.

3.3.3 Produksi enzim dan Uji Aktivitas enzim selulase dari bakteri selulolitik

a. Produksi enzim

Ekstrak enzim selulase diperoleh dengan melakukan sentrifugasi kultur bakteri pada kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. supernatan yang diperoleh kemudian digunakan untuk pengujian aktivitas spesifik enzim selulase.

b. Uji aktivitas spesifik enzim selulase dari bakteri selulolitik

1) Penentuan Kurva Standar Glukosa

Penentuan standar glukosa diuji menggunakan metode yang sama dengan metode analisa gula reduksi yaitu metode *Somogyi-Nelson*. Masing-masing glukosa 0,1 gr glukosa dilarutkan dalam buffer phospat pH 7 sebanyak 100 ml,

sehingga konsentrasinya menjadi 1000 µg/ml (stok) kemudian diambil 10 ml dari stok dan ditambahkan 90 ml akuades sehingga didapatkan konsentrasi menjadi 100 µg/ml. Pengenceran dilakukan dari konsentrasi 100 µg/ml sehingga didapatkan konsentrasi glukosa sebanyak 0 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, dan 100 µg/ml. Pada masing-masing konsentrasi glukosa ditambahkan reagen *Somogyi* sebanyak 0,5 ml dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Setelah dingin, ditambahkan reagen *Nelson* sebanyak 0,5 ml lalu ditambahkan akuades sebanyak 2,5 ml. Kadar gula reduksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dibuat kurva regresi linear yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi larutan sampel.

2) Uji aktivitas spesifik enzim selulase dari bakteri selulolitik

Enzim ekstrak kasar yang dihasilkan selanjutnya diuji aktivitas selulase dengan substrat CMC 1% dalam buffer asetat pH 5. Uji aktivitas selulase dilakukan dengan mengukur gula reduksi yang terbentuk menggunakan *Somogyi-Nelson*. 500 µl CMC 1% dalam buffer asetat 20 mM dengan pH dimasukkan dalam inkubator 37°C selama 20 menit. Kemudian ditambahkan ekstrak enzim kasar sebanyak 100 µl dan diinkubasi dalam inkubator selama 4 jam. Pada perlakuan kontrol penambahan enzim dilakukan setelah penambahan reagen *Somogyi*. Setelah inkubasi 4 jam dikeluarkan dari inkubator, ditambahkan reagen 0,5 ml *Somogyi*, kemudian dididihkan dalam penangas air selama 15 menit. Reagen *Somogyi* berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatik (*Somogyi*, 1952). Kemudian ditambahkan reagen 0,5 ml *Nelson* dengan 2,5 ml akuades. Kadar gula reduksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Reagen *Nelson* berfungsi mengikat gula reduksi hasil hidrolisis substrat sehingga dapat terwarnai dan terbaca nilai absorbansinya (*Nelson*, 1944).

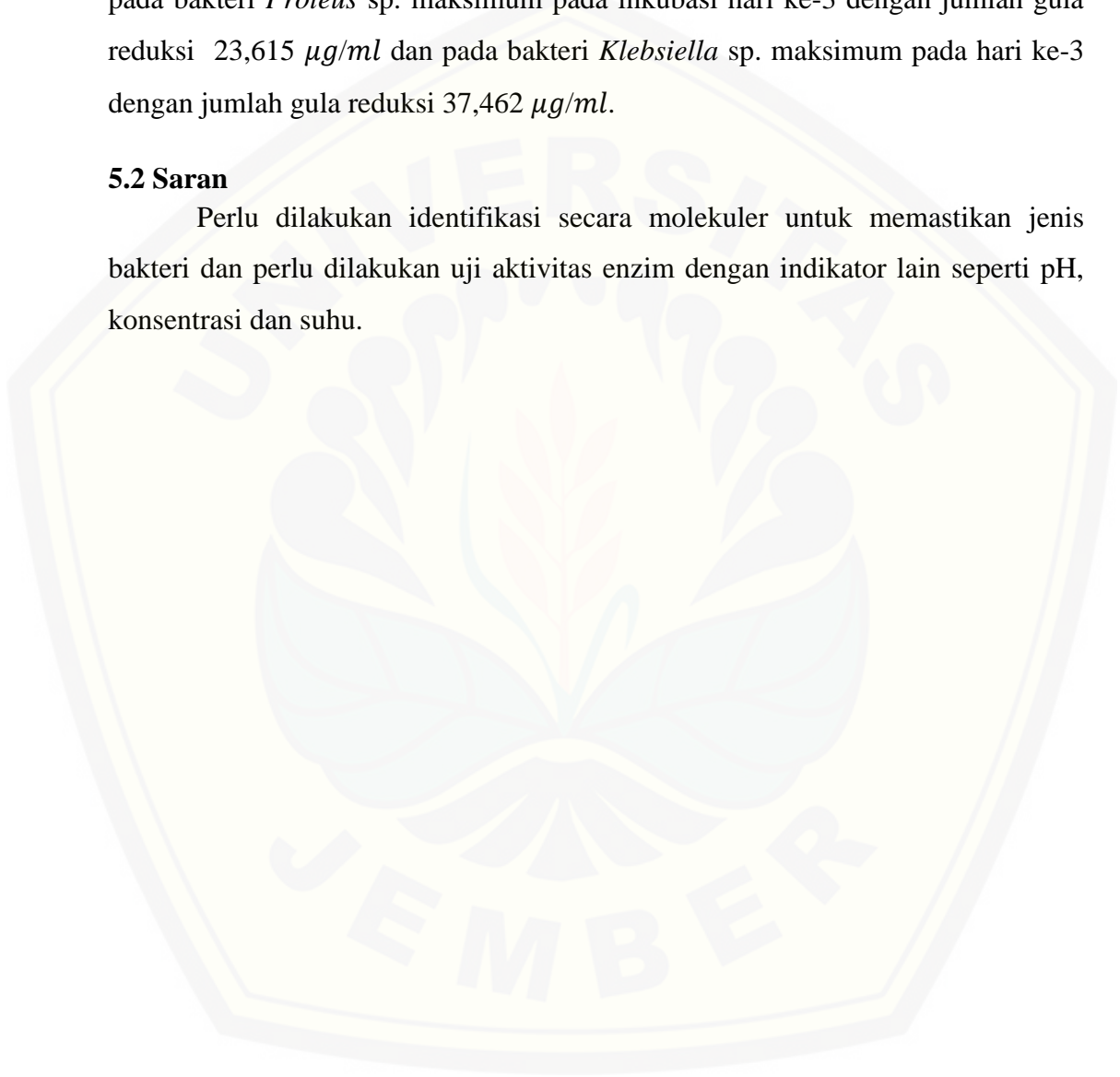
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Ada. Isolasi bakteri *Midgut H. illucens* ditemukan dua spesies bakteri selulolitik yaitu *Proteus* sp. dan *Klebsiella* sp.. Hasil uji aktivitas enzim selulase pada bakteri *Proteus* sp. maksimum pada inkubasi hari ke-3 dengan jumlah gula reduksi 23,615 $\mu\text{g/ml}$ dan pada bakteri *Klebsiella* sp. maksimum pada hari ke-3 dengan jumlah gula reduksi 37,462 $\mu\text{g/ml}$.

5.2 Saran

Perlu dilakukan identifikasi secara molekuler untuk memastikan jenis bakteri dan perlu dilakukan uji aktivitas enzim dengan indikator lain seperti pH, konsentrasi dan suhu.



DAFTAR PUSTAKA

- Al-arif, M. A., Darmanto, W., Nyoman, N., dan Puspaningsih, T. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik dengan Aktivitas Tinggi dalam Saluran Pencernaan Keong Emas (*Pomacea canaliculata*). *Biosains*, 14(2), 86–92.
- Alatawi, A., Susilowati, A., dan Hailu, H. 2015. Biochemical and Molecular Characterization of Food Contaminating Bacteria Isolates from Food Stall Vegetables. *British Microbiology Research Journal*, 5(5), 405–411. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/13792>
- Apun, K., Jong, B. C., dan Salleh, M. A. 2000. Screening and isolation of a cellulolytic and amylolytic *Bacillus* from sago pith waste. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 46, 263–267. <https://doi.org/10.2323/jgam.46.263>
- Bairagi, S. 2016. Optimization of Cellulase Enzyme from Vegetable Waste by Using *Trichoderma atroviride* in Solid State Fermentation. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 10(5), 68–73. <https://doi.org/10.9790/2402-1005026873>
- Banks, I. . J., Gibson, W. T., dan Cameron, M. M. 2014. Growth Rates of Black Soldier Fly Larvae Fed on Fresh Human Faeces and their Implication for Improving Sanitation. *Tropical Medicine and International Health*, 19(1), 14–22. <https://doi.org/10.1111/tmi.12228>
- Banks, I. J. 2014. To Assess The Impact of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae on faecal reduction in pit latrines. <https://doi.org/10.17037/PUBS.01917781>
- Barr, B., Hsieh, Y. L., dan Ganem, B. W. 1996. Identification of two functionally different classes of exocellulases. *Biochemistry*, 35, 586–592.
- Bello, A. I., bin Ismail, M. N., dan Kabbashi, N. A. 2016. Solid Waste Management in Africa: A Review. *International Journal of Waste Resources*, 6(2), 4–7. <https://doi.org/10.4172/2252-5211.1000216>.

- Booth, D. C., dan Sheppard, C. 1984. Oviposition of the Black Soldier Fly , *Hermetia illucens* (Diptera : Stratiomyidae): Eggs , Masses , Timing , and Site Characteristics. *ENVIRONMENTAL ENTOMOLOGY*, 13(2), 421–423.
- Brisse, S., Grimont, F., dan Grimont, P. A. 2006. *The genus Klebsiella*. New York: Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_8
- Cheng, V. C. C., Yam, W. C., Tsang, L. L., Yau, M. C. Y., Siu, G. K. H., Wong, S. C. Y., dan Yuen, K. Y. 2012. Epidemiology of Klebsiella Oxytoca-associated Diarrhea Detected by Simmons Citrate Agar Supplemented with Inositol, Tryptophan, and Bile Salts. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(5), 1571–1579. <https://doi.org/10.1128/JCM.00163-12>
- Diener, S., Zurbrügg, C., Gutiérrez, F. R., Nguyen, D. H., Morel, A., Koottatep, T., dan Tockner, K. 2011. Black Soldier Fly Larvae For Organic Waste Treatment –Prospects And Constraints, 52(February), 978–984.
- Douglas, A. E. 2009. The Microbial Dimension in Insect Nutritional Ecology. *Functional Ecology*, 23(1), 38–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x>
- Fennington, G., Neubauer, D., dan Stutzenberger, F. 1984. Cellulase Biosynthesis in a Catabolite Repression-Resistant Mutant of *Thermomonospora curvata*, 47(1), 201–204.
- Furman, D. P., Young, R. D., dan Catts, E. P. 1959. *Hermetia illucens* (Linnaeus) as a Factor in the Natural Control of *Musca domestica* Linnaeus I. *Journal of Economic Entomology*, 52(5), 917–921.
- Guentzel, M. N. 1996. Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus. *Medical Microbiology*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413290>
- Gullan, P. ., dan Cranston, P. . 2005. *The Insects : An Outline of Entomology Third Edition*. Science (New York, N.Y.) (Vol. 144). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2028.2001.0270e.x>

- Hardouin, J., dan Mahoux, G. 2003. *Insect Animal Husbandry - Breeding and Utilization for the Benefit of Humans and Other Animals*. Bureau for exchange and distribution of information of the mini-livestock (BEDIM).
- Heinze, T. 2015. *Cellulose: Structure and Properties*. Switzerland: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/12>
- Holt, J. ., Krieg, N. ., Sneath, P. H. ., Staley, J. ., dan Williams, S. . 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.). Philadelphia: A Wolters Kluwer Company.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
- Kim, W., Bae, S., Park, K., Lee, S., Choi, Y., Han, S., dan Koh, Y. 2011. Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14(1), 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.11.003>
- Mandels, M; Andreotti, R; Roche, C. M. 1976. Measurement of Saccharifying Cellulase. *Biotechnology and Bio- Engineering, Symposium No. 6*, 21–33.
- Marshall, S. A., Woodley, N. E., dan Hauser, M. 2015. The Historical Spread of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera, Stratiomyidae, Hermetiinae), and Its Establishment in Canada. *Journal of the Entomological Society of Ontario*, 146, 51–54.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T. C., Rachmania, N., dan Satria, H. 2009. Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara Sains*, 13(1), 33–38. <https://doi.org/10.7454/mss.v13i1.369>
- Moat, A. G., Foster, J. W., dan Spector, M. P. 2002. *Microbial Physiology* (4th ed.). New York: Wiley-Liss Inc.

- Moran, N. A. 2006. Symbiosis. *Current Biology*, 16(20), 866–871.
- Mordi, R. M., dan Momoh, M. I. 2009. Incidence of *Proteus* species in wound infections and their sensitivity pattern in the University of Benin Teaching Hospital. *African Journal of Biotechnology*, 8(5), 725–730. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000264910500004
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., dan Pfaller, M. a. 2016) *Medical microbiology 8th Edition*. Philadelphia: Elsevier Mosby.
- Mutafela, R. N. 2015. High Value Organic Waste Treatment via Black Soldier Fly Bioconversion (Onsite Pilot Study).
- Newton, L., Sheppard, C., Watson, D. ., Burtle, G., dan Dove, R. 2005. *USING THE BLACK SOLDIER FLY, Hermetia illucens, AS A VALUE-ADDED TOOL FOR THE MANAGEMENT OF SWINE MANURE*. *Waste Management Programs*. North Carolina State University.
- Osho, M. B., Aruoture, A. O., dan Abatan, T. A. 2017. Cellulase production by *Proteus* spp . JC402 from plantain fruits stalk biomass using submerged fermentation, 34, 65–70.
- Pelczar, M., dan Chan, E. C.1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Ritika, P., Satyawati, S., dan Rajendra, P. 2015. Study on Occurrence of Black Soldier Fly Larvae in Composting of Kitchen Waste. *International Journal of Researches in Biosciences*, 4(4), 38–45.
- Sagade, G. A., dan Pejaver, M. K. 2009. Study of Diversity of Insect Fauna From The Household Biocompost. *Bionano Frontier*, 3(1), 67–70.
- Serra, B., Zhang, J., Morales, M. D., de Prada, a. G. V., Reviejo, a. J., dan Pingarrón, J. M. 2008. A Rapid Method for Detection of Catalase-Positive and Catalase-Negative Bacteria based on Monitoring of Hydrogen Peroxide Evolution at a

Composite Peroxidase Biosensor. *Talanta*, 75(4), 1134–1139.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.009>

Subandriyo, S., Anggoro, D., dan Hadiyanto, H. 2012. Optimasi Pengomposan Sampah Organik Rumah Tangga Menggunakan Kombinasi Aktivator Em4 Dan Mol. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 10(2), 70–75.

Sulistiyarsi, A., dan Ardhi, M. W. 2016. Pengaruh Konsentrasi dan Lama Inkubasi terhadap Kadar Protein Crude Enzim Selulase dari Kapang *Aspergillus niger*. *Proceeding Biology Education Conference*, 13(1), 781–786.

Swift, F. R. 1963. A Hanging-Drop Technique Use for General, 136, 120–136.

Tomberlin, J. K., Adler, P. H., dan Myers, H. M. 2009. Development of the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) in Relation to Temperature. *Environmental Entomology*, 38(3), 930–934.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1603/022.038.0347>

Tomberlin, J. K., Sheppard, D. C., dan Joyce, J. A. 2002. Selected life-history traits of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) reared on three artificial diets. *Annals of the Entomological Society of America*, 95(3), 379–386.
[https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2002\)095\[0379:slhtob\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2002)095[0379:slhtob]2.0.co;2)

UN-HABITAT. 2010. *Solid Waste Management in the World's Cities*. Earthscan, London and Washington,DC. <https://doi.org/10.1002/9780470999677>

Vilanova, C., Marco, G., Domínguez-Escribà, L., Genovés, S., Sentandreu, V., Bataller, E., dan Porcar, M. 2012. Bacteria from acidic to strongly alkaline insect midguts: Potential sources of extreme cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*, 45, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.017>

Volk, W. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Erlangga.

Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press.

- Who. 2011. *Pedoman Teknik Dasar untuk Laboratorium Kesehatan* (2nd ed.). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42295/4/9241545305_ind.pdf
- Williams, A. G. 1983. Staining reactions for the detection of hemicellulose-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 20(2), 253–258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00127.x>
- Yang, S. T., Enshasy, H. El, dan Thongchul, N. 2013. *Bioprocessing technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemical, and Polymers* . Hoboken, New Jersey: John Wiley dan Sons, Inc.
- Yu, E. K. C., Deschatelets, L., Louis-Seize, G., dan Saddler, J. N. 1985. Butanediol production from cellulose and hemicellulose by *Klebsiella pneumoniae* grown in sequential coculture with *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 924–929.
- Yu, G., Cheng, P., Chen, Y., Li, Y., Yang, Z., Chen, Y., dan Tomberlin, J. K. 2011. Inoculating Poultry Manure With Companion Bacteria Influences Growth and Development of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae. *Environmental Entomology*, 40(1), 30–35. <https://doi.org/10.1603/EN10126>

LAMPIRAN

Lampiran A. Komposisi Media

A.1 Komposisi media NA

No.	Bahan	Jumlah/liter
1	Nutrien Agar	21 gram

Cara pembuatan : dimasukkan serbuk Nutrien Agar kedalam 1 L aquades, dipanaskan hingga mendidih, dituang kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml, ditutup menggunakan kapas dan dibungkus kertas *doorslag*. Selanjutnya di sterilisasi menggunakan autoklaf. Setelah 25 menit media di keluarkan dari autoklaf dan dituang ke cawan petri steril, ditunggu memadat.

A.2 Komposisi media CMC agar 0,5%

No.	Bahan	Jumlah/liter
1	CMC 0,5%	3,85 gram
2	Na ₂ HPO ₄	4,62 gram
3	KH ₂ PO ₄	2,31 gram
4	NaCl	0,385 gram
5	MgSO ₄	0,193 gram
6	NH ₄ Cl	0,77 gram
7	Agar	13,09 gram

Cara pembuatan : dibuat larutan PM dengan mencampurkan Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, MgSO₄.7H₂O, dan NH₄Cl kedalam 1 L aquades. Dimasukkan CMC 0,5% kedalam beaker , dituangi dengan larutan PM sedikit demi sedikit lalu diaduk hingga larut, selanjutnya ditambahkan agar dan dipanaskan hingga mendidih diatas *hot plate*. Lalu dituang kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml, ditutup menggunakan kapas dan dibungkus kertas *doorslag*. Selanjutnya di sterilisasi menggunakan autoklaf. Setelah 25 menit media di keluarkan dari autoklaf dan dituang ke cawan petri steril di dalam ruang LAF (*Laminar Air Flow*) , ditunggu memadat.

A.3 Komposisi media CMC broth 1%

No.	Bahan	Jumlah/liter
1	CMC 1%	5 gram
2	Na ₂ HPO ₄	3 gram
3	KH ₂ PO ₄	1,5 gram
4	NaCl	0,25 gram
5	MgSO ₄	0,125 gram
6	NH ₄ Cl	0,5 gram

Cara pembuatan : dibuat larutan PM dengan mencampurkan Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, MgSO₄.7H₂O, dan NH₄Cl kedalam 1 L aquades. Dimasukkan CMC 0,5% kedalam *beaker glass* , dituangi dengan larutan PM sedikit demi sedikit lalu diaduk hingga larut, selanjutnya ditambahkan agar dan dipanaskan hingga mendidih diatas *hot plate*. Lalu dituang kedalam labu erlenmeyer 50 ml masing-masing sebanyak 20 ml, ditutup menggunakan kapas dan dibungkus kertas *doorslag*. Selanjutnya di sterilisasi menggunakan autoklaf.

Lampiran B. Komposisi Reagen Somogyi-Nelson

B.1 Komposisi Reagen Somogyi

No	Bahan	Jumlah/Liter
1	Na_2CO_3	24 gram
2	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6\text{H}_2\text{O}$	12 gram
3	NaHCO_3	16 gram
4	$\text{CUSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 %	40 ml
5	Na_2SO_4	180 gram
6	Akuades	1000 ml

Cara pembuatan : dibuat larutan 1 dengan cara dilarutkan Na_2CO_3 kedalam aquades ditambahkan dengan $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6\text{H}_2\text{O}$. Larutan 2 dibuat dengan melarutkan $\text{CUSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 % dengan 40 ml aquades selanjutnya ditambahkan NaHCO_3 . Larutan 3 dibuat dengan mencampurkan larutan 1 dan larutan 2. Larutan 4 dibuat dengan melarutkan Na_2SO_4 kedalam 300ml aquades, dipanaskan diatas hot plate hingga mendidih, selanjutnya didinginkan. Lalu larutan 3 dan 4 dicampur dan *fill up* dengan aquades hingga volume mencapai 1000 ml. Dimasukkan kedalam botol gelap dan diinkubasi 37°C selama 1 minggu dan disimpan pada suhu $20^\circ\text{C} - 40^\circ\text{C}$.

B.2 Komposisi Reagen Nelson

No	Bahan	Jumlah/Liter
1	$(\text{NH}_4)_2\text{MO}_7\text{O}_{24}$	50 gram
2	H_2SO_4	46 gram
3	$\text{NaHSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6 gram
4	Akuades	1000 ml

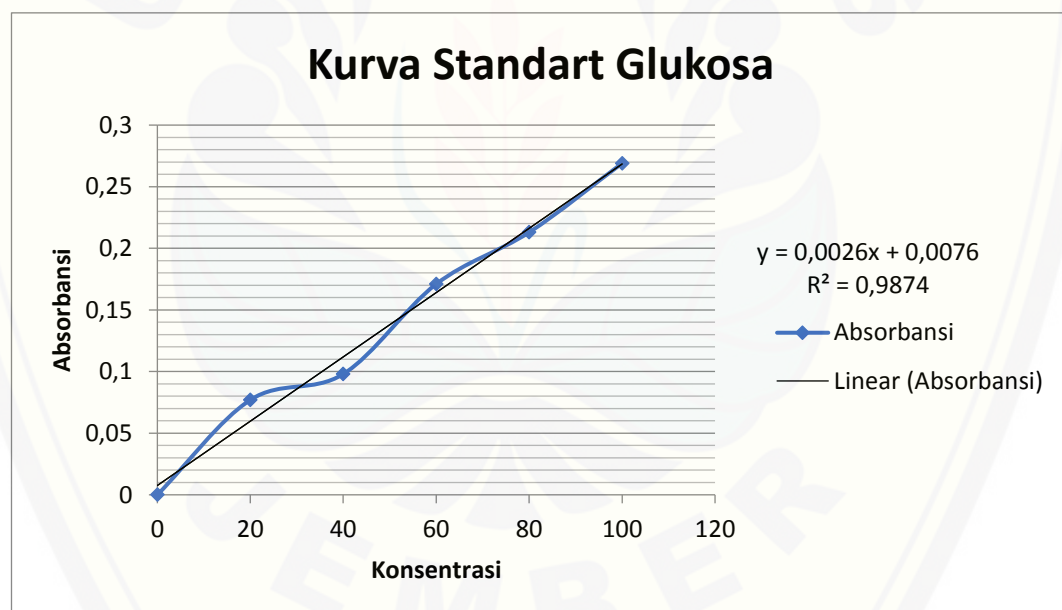
Cara pembuatan :dibuat larutan 1 dengan cara dilarutkan $(\text{NH}_4)_2\text{MO}_7\text{O}_{24}$ dan H_2SO_4 kedalam 500 ml aquades. Larutan 2 dibuat dengan melarutkan $\text{NaHSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kedalam 25ml aquades. Larutan 1 dan larutan 2 dicampurkan, di *fill up* hingga volume mencapai 1000 ml dan di masukkan kedalam botol gelap. Diinkubasi 37°C selama 24 jam .

Lampiran C. Kurva Standart Glukosa

C.1 Tabel Standart Glukosa

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	ABS (500 nm)
0	0
20	0,077
40	0,098
60	0,171
80	0,213
100	0,269

C.2 Kurva Standart Glukosa



Lampiran D. Perhitungan Jumlah Sel Bakteri

L kotak $L_3 = 1/400 \text{ mm}^2$

Kedalaman = 0,1 mm

$$V_3 = \frac{1}{400} \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 2,5 \times 10^{-7} \text{ cm}^3$$

Lampiran D1. Perhitungan jumlah sel *Klebsiella* sp. pada hari ke-3

Diketahui : Jumlah bakteri rata-rata dalam 5 kotak = 419
5 kotak $L_2 = 5 \times 16 = 80$ kotak
Faktor pengenceran = 10^{-2}

$$\sum \text{bakteri total} = \frac{419/80}{2,5 \times 10^{-7}} \times \frac{1}{10^{-2}} = 2,095 \times 10^8 \text{ Sel/ml}$$

Lampiran D2. Perhitungan jumlah sel *Proteus* sp. pada hari ke-3

Diketahui : Jumlah bakteri rata-rata dalam 5 kotak = 152
5 kotak $L_2 = 5 \times 16 = 80$ kotak
Faktor pengenceran = 10^{-2}

$$\sum \text{bakteri total} = \frac{152/80}{2,5 \times 10^{-7}} \times \frac{1}{10^{-2}} = 7,6 \times 10^7 \text{ Sel/ml}$$