

Potensi Bakteri Endofit Limbah Daun Kayu Putih (*Melaleuca cajuputi* Powell) terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Ukit^{1*}, Ana Widiana², Ghinaa Islaamiyah², Dina Lugina N.S²

¹Pendidikan Biologi, Fakultas Tarbiyah dan Keguruan, UIN Sunan Gunung Djati

²Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Gunung Djati

^{1*}ukit.uinsgdbdg@gmail.com

Article Info

Article History

Received : 1 November 2022

Revised : 4 November 2022

Published : 23 November 2022

*Correspondence email:

ukit.uinsgdbdg@gmail.com

ABSTRACT

*This reseach aims to determine cellulolytic isolates found in waste of eucalyptus leaves (*Melaleuca cajuputi*), as well as knowing the activity of cellulase enzymes produced by bacterial isolates. Screening of isolates was carried out to determine isolates that formed clear zones, which were then tested for cellulase enzyme activity. The results showed that *Bacillus subtilis* 4K3 and *Bacillus subtilis* 4K1 bacteria which were 4.19 mm and 3.13 mm. *Bacillus subtilis* 4K3 bacteria with enzyme activity values were 9.39 U / ml and 15.82 U / ml.*

Keyword: *Bacteria, Enzym Cellulose, Melaleuca cajuputi*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri selulolitik yang terdapat pada limbah daun kayu putih (*Melaleuca cajuputi*), serta mengetahui aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh isolat bakteri. Skrining isolat dilakukan untuk mengetahui isolat yang membentuk zona bening, yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim selulase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus subtilis* 4K3 dan *Bacillus subtilis* 4K1 yaitu 4,19 mm dan 3,13 mm. Bakteri yang menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu bakteri *Bacillus subtilis* 4K3 dengan nilai aktivitas enzim yaitu 9,39 U/ml dan 15,82 U/ml.

Kata Kunci: *Bakteri, Enzim Selulase, Kapang, Melaleuca cajuputi*

PENDAHULUAN

Kayu putih termasuk jenis tumbuhan yang berpotensi dalam upaya rehabilitasi lahan ditinjau baik dari segi ekologis maupun segi ekonomisnya (Menteri Kehutanan, 2014). Tumbuhan kayu putih menghasilkan minyak atsiri yang berasal dari daunnya. Minyak atsiri yang dihasilkan dapat diolah melalui proses penyulingan menjadi produk farmasi karena kandungan sineolnya yang tinggi (Widiana *et al.* 2014). Proses penyulingan daun kayu putih selain menghasilkan minyak kayu putih, juga menghasilkan limbah penyulingan daun kayu putih (LPDKP).

Limbah kayu putih yang melimpah di sekitar pabrik salah satunya di lokasi KPH Perhutani Indramayu sebenarnya sudah dijadikan sebagai briket dan kompos sejak lama, akan tetapi pengomposan limbah tersebut tidak efektif karena kandungan zat-zat di dalamnya sulit untuk didekomposisi (Murbandono, 1999). Menurut Widiana dkk. (2014) menyatakan penggunaan limbah daun kayu yang dicampurkan dengan rumput lapang memiliki potensi yang cukup baik bila digunakan sebagai pakan ternak. Namun dalam penelitian lanjutannya mendapati bahwa kandungan lignoselulosa yang tinggi menyebabkan limbah sukar untuk didekomposisi.

Selulosa adalah salah satu polimer yang minim dimanfaatkan, sedangkan jumlahnya banyak ditemukan di alam dalam bentuk dinding sel dan serat tumbuhan. Komponen selulosa tersebut tidak mudah untuk didegradasi secara kimia maupun mekanis, akan tetapi dapat didegradasi dengan bantuan aktivitas mikroorganisme (Perez dkk., 2002). Adapun beberapa kelompok genus dari kapang yang berpotensi menurut Arnata (2009) pada genus bakteri

yaitu, *Pseudomonas*, *Celullomonas* dan *Bacillus*. Mikroorganisme tersebut merupakan mikroorganisme yang memiliki aktivitas enzim selulase, sehingga dapat memberikan penanggulangan untuk mengurangi masalah limbah organik berselulosa. Semakin besar nilai aktivitas enzim yang dikeluarkan oleh bakteri, maka semakin besar pula potensi yang diberikan dalam mendekomposisi limbah organik berselulosa. Sehingga limbah tersebut dapat dimanfaatkan dan memiliki nilai jual dalam bidang pertanian dan perternakan, seperti pupuk organik cair (POC), *local microorganism* (MOL) dan pakan ternak (Murtiyaningsih dan Hazmi, 2017).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri selulolitik yang terdapat pada limbah daun kayu putih (*Melaleuca cajuputi*), serta mengetahui aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh isolat bakteri.

METODE

Sampel limbah daun kayu putih diambil dari KPH Perhutani Indramayu dengan umur limbah tiga kelompok yang berbeda, yaitu 0, 2 dan 4 bulan. Limbah daun kayu putih dimasukkan ke dalam *ziplock* dan disimpan pada *freezer*.

1. Pengambilan Sampel

Sampel limbah daun kayu putih diambil dari BKPH Perum Perhutani pabrik minyak kayu putih Jatimunggul Indramayu yang berada di jalan Telagasari, Jatimungul, Kabupaten Indramayu, Jawa Barat. Limbah diambil dengan umur 0 bulan, 2 bulan dan 4 bulan.

2. Pembuatan Media

14 gram NA dilarutkan dalam 500 ml aquades menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah media terlarut, sebanyak 150 ml dituang ke dalam

tabung reaksi dan disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah steril didinginkan dalam suhu ruang sampai agar memadat (Capuccino dan Sherman, 2005).

Isolasi Bakteri Endofit

Sampel daun kayu putih dibersihkan menggunakan air mengalir, lalu dipotong sepanjang 1-3 cm. Potongan sampel direndam dengan etanol 70% selama 1 menit, lalu direndam menggunakan larutan natrium hipoklorit 5.25% selama 5 menit. Potongan sampel dicuci kembali dengan etanol 70% sebanyak 3 kali. Potongan sampel diiris secara steril lalu ditanam pada media Agar (NA). Setelah itu sampel yang sudah ditanam diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 27°C (Desriani *et al.* 2013).

Pemurnian Isolat Bakteri Endofit

Koloni yang tumbuh pada permukaan dan tepi daun kemudian diambil menggunakan jarum ose dan dimurnikan pada media *nutrient agar* (NA) dengan menggunakan metode kuadran (Capuccino dan Sherman, 2005).

3. Uji Makroskopis

Uji makroskopis yang dilakukan meliputi pengamatan secara morfologi koloni seperti ukuran, bentuk, tepi, elevasi, dan warna koloni (Capuccino dan Sherman, 2005).

4. Uji Pewarnaan Gram

Gelas objek diberi NaCl fisiologis 1 tetes kemudian sampel disimpan di atas gelas objek dan di fiksasi di atas Bunsen. Larutan kristal violet ditambahkan 1 tetes dan didiamkan selama 1 menit lalu dicuci dengan air. Setelah itu, diberi larutan lugol 1 tetes dan didiamkan selama 1 menit dan di cuci dengan alkohol 96%.

Selanjutnya ditetesi larutan safranin selama 30 detik dan dicuci dengan air lalu dikeringkan. Setelah kering gelas objek diamati dengan mikroskop menggunakan perbesaran 10 x 100. Hasil uji menunjukkan Gram-positif jika bakteri yang diuji menunjukkan warna ungu dan bersifat Gram-negatif bila menunjukkan warna merah saat diamati (Lay, 1994).

5. Uji Mikroskopis

Uji mikroskopis dilakukan dengan mengamati morfologi sel bakteri, seperti ukuran, bentuk, susunan sel bakteri yang telah diisolasi menggunakan bantuan mikroskop (Hogg, 2005).

6. Uji Motilitas

0,5 gram NA dilarutkan dengan 50 ml aquades, lalu dituang ke dalam tabung reaksi dan di sterilisasi. Setelah media steril lalu didinginkan dengan cara berdiri. Selanjutnya inokulan diinokulasi ke dalam media semi solid NA dengan cara stab. Setelah itu, diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil positif yang didapatkan ditandai dengan pertumbuhan koloni yang menyebar dan terbentuknya butiran-butiran putih seperti awan pada permukaan media uji (Dundu, 2000).

7. Uji Biokimia

Uji Katalase: 1 tetes larutan H₂O₂ 3% diteteskan pada gelas objek. Isolat dioleskan pada kaca objek dan dicampurkan perlahan menggunakan jarum ose. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara. Katalase positif ditandai oleh pembentukan gelembung udara pada koloni dan sekitarnya (Lay, 1994).

Uji Hidrolisis Gelatin: Isolat bakteri diinokulasi ke dalam medium nutrisi gelatin pada tabung reaksi secara aseptik diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Kemudian kultur diletakkan pada pendingin dengan suhu 4°C selama 30 menit. Indikator pengamatan reaksi positif jika medium tetap menjadi cair, dan negatif apabila medium berubah menjadi padat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri mampu menghidrolisis gelatin sehingga medium tetap cair saat didiamkan pada suhu 4°C selama 30 menit (Capuccino dan Sherman, 2005).

Uji Reduksi Nitrat: Pepton water 100 ml ditambahkan dengan 1g nitrat lalu dipanaskan sambil diaduk sampai mendidih, setelah itu dituang ke dalam tabung reaksi 3-5 ml dan disterilisasi menggunakan autoklaf. Media yang sudah steril di dinginkan dengan posisi miring. Hasil positif ditunjukkan dengan berubahnya warna medium setelah ditambahkan reagen asam sulfanilat (Capuccino dan Sherman, 2005).

Uji Hidrolisis Sitrat: 1.15 g *Simmons Citrat* dilarutkan dengan aquades sampai mencapai volume 50 ml. Media dipanaskan dan dituang ke dalam tabung reaksi lalu disterilisasi. Media didinginkan dengan cara dimiringkan. Bakteri pada media NA miring diinokulasi ke dalam *Simmons Citrat*, lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil positif ditandai dengan berubahnya warna media dari hijau menjadi biru (Capuccino dan Sherman, 2005).

Uji Urease: 1.26 g *Urea Agar Base* ditambahkan aquades hingga

mencapai volume 50 ml. Media dipanaskan dan dituang pada tabung reaksi dan disterilisasi. Selanjutnya media didinginkan dengan cara dimiringkan. Inokulan bakteri diinokulasikan pada medium *Urea Agar Base*, lalu diinkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif ditandai apabila terjadi perubahan warna medium dari kuning menjadi pink pekat (Capuccino dan Sherman, 2005).

Uji Fermentasi Karbohidrat: Glukosa, laktosa, maltosa dan sakarosa masing-masing ditimbang 0,5 gr lalu dimasukkan ke dalam gelas 50 mL *pepton water*. Dipanaskan dengan hotplate pada suhu 150°C selama 10 menit. Selagi dipanaskan, beri 3 tetes brom kresol purpur sampai warna larutan berubah menjadi ungu. Setelah itu tuang sebanyak 5mL pada tabung reaksi dan masukkan tabung durham dan beri label masing-masing tabung reaksi. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C. Bakteri pada media miring diinokulasikan pada media gula (glukosa, laktosa, maltosa dan sakarosa) dengan cara ose yang berisi inokulan dicelupkan dan diaduk dengan memutar dan dinaik turunkan hingga koloni tercampur dengan larutan. Letakkan media pada inkubator selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi kuning dan positif membentuk gas apabila terdapat gelembung udara pada tabung durham (Lay, 1994)

8. Identifikasi; Bakteri yang telah melalui isolasi, uji makroskopis, mikroskopis serta uji biokimia selanjutnya diidentifikasi

menggunakan buku *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*

9. Skrining Bakteri Penghasil Enzim Selulase

Isolat bakteri pada media NA diambil dengan menggunakan jarum ose, tempelkan pada media CMC dan diinkubasi 48 jam pada suhu 37°C. Teteskan larutan *congo red* pada media dan biarkan 15 menit. Larutan dibuang dan bilas dengan NaCl 0,2 M sebanyak 3 kali pengulangan. Diameter zona bening dan koloni diukur, lalu dihitung dengan indeks aktivitas enzim (Murtiyaningsih dan Hazmi, 2017).

a. Produksi Enzim Selulase

Ekstrak Kasar: Sebanyak 1 ose isolat bakteri yang membentuk zona bening diambil, diinokulasikan pada media CMC cair 25 ml selama 24 jam. Ambil 10 ml dan diinkulasikan pada media CMC cair 100 ml, inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan ambil 5 ml untuk disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pengambilan sampel dilakukan dari H₀-H₇ (Murtiyaningsih dan Hazmi, 2017).

b. Uji Aktivitas Enzim Selulase:

Tabung reaksi 3 buah diberi nama tabung 1 sampel, tabung 2 kontrol dan tabung 3 blanko. Pada tabung 1, ekstrak enzim kasar 1 ml tambahkan larutan CMC 1% 1 ml divortex hingga homogen dan diinkubasi 1 jam pada suhu ruang. Tambahkan 2 ml larutan DNS dan diinkubasi 10 menit pada suhu 100°C dan dinginkan. Tabung 2 berisi 1 ml larutan CMC 1%, larutan DNS 2 ml dan enzim ekstrak kasar 1 ml divortex

hingga homogen dan diinkubasi 10 menit pada suhu 100°C. Pada tabung 3 larutan CMC 1% sebanyak 1 ml, larutan DNS 2 ml dan akuades 1 ml divortex hingga homogen dan diinkubasi 10 menit pada suhu 100°C. Setelah dingin, lakukan pengukuran absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm dan hitung aktivitas enzimnya (Murtiyaningsih dan Hazmi, 2017).

10. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa dengan membuat larutan stok. 1 gram (1000 mg) glukosa dilarutkan dalam 100 ml akuades steril, yang berarti 1 ml stok larutan mengandung 10 mg glukosa. 1 ml stok larutan diencerkan dalam 9 ml akuades steril dan kemudian dilakukan seri pengenceran dengan konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250 dan 300 ppm. Sebanyak 0,1 ml larutan glukosa dengan konsentrasi mg/ml ditambahkan dengan akuades sebanyak 1,9 ml dan seterusnya, tambahkan reagen DNS 2 ml. Tabung reaksi dipanaskan selama 5 menit pada suhu 100°C, dinginkan dan homogenkan. Absorbansi tiap konsentrasi dihitung dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm (Murtiyaningsih dan Hazmi, 2017)

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi Bakteri Endofit

Isolasi bakteri endofit pada limbah penyulingan daun kayu putih dilakukan dengan menanam limbah pada media NA (*Nutrient Agar*) secara langsung. Isolasi bakteri endofit pada limbah penyulingan daun kayu putih

dilakukan dengan menanam limbah pada media NA (*Nutrient Agar*) secara langsung. Metode *direct plating* diawali dengan melakukan sterilisasi permukaan pada limbah daun kayu putih. Sterilisasi permukaan bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme epifit yang berada di permukaan daun. Hal ini sesuai dengan penyataan (Hallmann, 2001) yang menyatakan bahwa proses sterilisasi permukaan digunakan untuk menghilangkan mikroorganisme epifit atau yang menempel dipermukaan daun,

sehingga koloni yang diperoleh merupakan koloni bakteri endofit yang berasal dari dalam jaringan daun. Larutan yang digunakan pada proses sterilisasi permukaan melibatkan larutan alkohol 70% dan larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 5,25%. Proses isolasi bakteri endofit pada limbah penyulingan daun kayu putih umur 0, 2 dan 4 bulan menghasilkan 10 isolat bakteri endofit. Hasil isolasi bakteri endofit pada limbah penyulingan daun kayu putih dapat dilihat pada Gambar 1 hasil isolasi



Gambar 1 Hasil isolasi bakteri endofit. A= limbah umur 0 bulan, B= limbah umur 2 bulan dan C= limbah umur 4 bulan (Dokumentasi Pribadi)

Bakteri endofit yang dapat diisolasi pada umur limbah 0 bulan sebanyak 2 koloni. Koloni yang didapat diberi kode IS-0K1 dan IS-0K2. Jumlah bakteri endofit yang berhasil diisolasi pada umur limbah 2 bulan sebanyak 3 koloni bakteri yang diberi kode IS-2K1, IS-2K2 dan IS-2K3. Limbah selanjutnya ialah limbah dengan umur 4 bulan, bakteri endofit yang dapat diisolasi yaitu sebanyak 5 koloni. 5 koloni bakteri tersebut diberi kode IS-4K1, IS-4K2, IS-4K3, IS-4K4 dan IS-

4K5. Jumlah bakteri endofit yang berhasil diisolasi pada limbah penyulingan daun kayu putih dapat berjumlah sepuluh koloni.

B. Uji Makroskopis

Uji makroskopis dilakukan meliputi dengan mengamati bentuk, warna, tepi, elevasi, permukaan dan struktur dalam koloni isolat bakteri. Hasil uji makroskopis dapat dilihat pada Tabel 1 uji makroskopis

Tabel 1. Uji Makroskopis

Isolat	Bentuk koloni	Warna Koloni	Karakter Morfologi Koloni			
			Tepi Koloni	Elevasi	Permukaan	Struktur dalam
IS-0K1	Bundar	Putih susu	Licin	Datar	Licin	Opaque
IS-0K2	Bundar	Putih susu	Licin	Datar	Licin	Opaque
IS-2K1	Tidak beraturan	Putih kekuningan	Berombak	Cembung	Lengket	Transparan
IS-2K2	Bundar	Putih susu	Licin	Datar	Licin	Opaque

IS-2K3	Bundar dengan tepi timbul	Putih susu	Licin	Datar	Licin	Opaque
IS-4K1	Bundar dengan tepi timbul	Putih susu	Berombak	Datar	Kering bubuk	Opaque
IS-4K2	Bundar dengan tepi timbul	Putih susu	Berombak	Datar	Kering bubuk	Opaque
IS-4K3	Bundar dengan tepi timbul	Putih susu	Berombak	Datar	Kering bubuk	Opaque
IS-4K4	Bundar dengan tepi timbul	Putih susu	Berombak	Datar	Kering bubuk	Opaque
IS-4K5	Bundar dengan tepi timbul	Putih susu	Berombak	Datar	Kering bubuk	Opaque

Keterangan: Opaque= permukaan koloni tidak tembus cahaya; Transparan = permukaan koloni tembus cahaya

Tabel 1 menunjukkan bahwa dari 10 isolat yang diuji, memiliki 3 bentuk koloni yaitu bundar, bundar dengan tepi timbul dan tidak beraturan. Isolat IS-0K1, IS-0K2, dan IS-2K3 memiliki morfologi koloni yang sama yaitu memiliki bentuk bundar, berwarna putih susu dengan tepi licin dan elevasi datar serta memiliki permukaan yang licin dan tidak tembus cahaya (*opaque*). Isolat IS-2K2, IS-4K1, IS-4K2, IS-4K3, IS-4K4 dan IS-4K5 memiliki ciri yang sama yaitu koloni berbentuk bundar dengan tepi timbul, berwarna putih susu dengan tepi berombak dan elevasi datar serta memiliki permukaan kering bubuk serta tidak tembus cahaya (*opaque*). Isolat IS-2K1 memiliki ciri berbeda dibandingkan dengan isolat lainnya yaitu memiliki bentuk tidak beraturan, berwarna putih kekuningan, dengan tepi berombak dan elevasi cembung serta memiliki permukaan lengket dan tembus cahaya (*transparan*). Hasil uji makroskopis menunjukkan bahwa 10 isolat bakteri yang diperoleh dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok berdasarkan karakter morfologi

koloninya. Morfologi koloni yang berbeda mengindikasikan jenis bakteri yang berbeda. Hal ini sesuai dengan pernyataan Eka (2005) yang menyatakan bahwa koloni bakteri endofit yang menunjukkan kenampakan yang berbeda dengan koloni lainnya, maka dianggap sebagai isolat yang berbeda, sebaliknya apabila memiliki kenampakan morfologi koloni yang serupa maka dianggap sebagai isolat yang sama. Namun bila kenampakan makroskopis sama tetapi terdapat perbedaan dalam laju pertumbuhannya, maka dianggap sebagai isolat yang berbeda

C. Uji Biokimia

Uji biokimia dilakukan untuk mengetahui sifat fisiologis bakteri endofit yang di uji. Uji biokimia faktor penting dalam proses identifikasi spesies bakteri tertentu. Uji biokimia yang dilakukan meliputi uji katalase, uji hidrolisis gelatin, uji reduksi nitrat, uji hidrolisis sitrat, uji urease dan uji fermentasi karbohidrat. Hasil uji biokimia terhadap 10 isolat bakteri endofit dapat dilihat pada Tabel 2 uji biokimia

Tabel 2. Uji Biokimia

Isolat	Uji Biokimia									
	Katalase	Gelatin	Nitrat	Sitrat	Urease	Fermentasi Karbohidrat				
						Glukosa	Laktosa	Maltosa	Manitol	Sukrosa
IS-0K1	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IS-0K2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IS-2K1	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
IS-2K2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IS-2K3	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
IS-4K1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
IS-4K2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
IS-4K3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
IS-4K4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
IS-4K5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-

Hasil uji biokimia menunjukkan bahwa setelah diuji, sepuluh isolat menunjukkan reaksi katalase positif. Hal ini menandakan bahwa seluruh bakteri endofit yang berhasil diisolasi mampu menghasilkan enzim katalase. Enzim katalase terbentuk apabila sel bakteri terdapat pada lingkungan yang tidak menguntungkan. Hal tersebut dapat dilihat dengan menggunakan larutan hidrogen peroksida yang dikenal sebagai larutan desinfektan. Larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) bersifat racun karena dapat merusak DNA sel bakteri.

Bakteri endofit mampu melindungi diri dengan cara memecah larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen menggunakan enzim katalase. Selain dapat menghasilkan enzim katalase, sepuluh bakteri endofit yang berhasil diisolasi juga menunjukkan beragam reaksi uji biokimia lain. Pada uji hidrolisis gelatin terdapat tiga isolat yang tidak mampu menghidrolisis gelatin serta pada uji reduksi nitrat dan uji sitrat, terdapat lima isolat yang tidak dapat melakukan kedua uji tersebut. Hal ini juga terjadi pada uji urease, hanya tiga isolat yang

tidak bisa menggunakan urea secara cepat. Uji fermentasi karbohidrat yang dilakukan menunjukkan bahwa sepuluh isolat bakteri memiliki reaksi yang beragam pada tiap gula yang diberikan. Berdasarkan kemampuan fermentasinya, dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok yaitu kelompok pertama yang hanya mampu memfermentasi satu jenis gula saja dan kelompok kedua yang mampu memfermentasi tiga jenis gula sekaligus. Perbedaan reaksi yang ditunjukkan dikarenakan perbedaan sifat fisiologis yang dimiliki oleh bakteri

D. Identifikasi Bakteri Endofit

Proses identifikasi bakteri endofit yang dilakukan ialah mencocokkan kriteria bakteri endofit yang didapatkan dari hasil uji makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia dengan kriteria pada buku *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Pencocokkan kriteria bakteri endofit dapat dilihat pada Tabel 3 Identifikasi bakteri endofit

Tabel 3. Pencocokan Kriteria Bakteri Endofit

Isolat	Batang	Endospora	Motilitas	Gram positif	Katalase	Asam dari glukosa	Marga
IS-0K1	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus lentus</i>
IS-0K2	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus lentus</i>
IS-2K1	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus lentus</i>
IS-2K2	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus lentus</i>
IS-2K3	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus lentus</i>
IS-4K1	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus subtilis</i>
IS-4K2	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus subtilis</i>
IS-4K3	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus subtilis</i>
IS-4K4	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus subtilis</i>
IS-4K5	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus subtilis</i>

Hasil pencocokan kriteria bakteri endofit menunjukkan bahwa meskipun *screening morphology* menunjukkan terdapat perbedaan, namun sepuluh isolat bakteri endofit yang diuji termasuk ke dalam satu marga yaitu marga *Bacillus* sp.

Bakteri pada marga *Bacillus* memiliki karakteristik mikroskopis berbentuk batang, tergolong bakteri Gram-positif, motil, menghasilkan spora yang biasanya resisten pada panas dan karakteristik fisiologis berupa termasuk bakteri aerob (beberapa spesies bersifat anaerob fakultatif), katalase positif, dan oksidasi bervariasi. Tiap spesies berbeda dalam penggunaan gula, sebagian melakukan fermentasi dan sebagian tidak (Barrow, 1993). Sifat khas yang dimiliki oleh marga *Bacillus* ialah mampu memproduksi endospora dan memiliki enzim katalase. Claus dan Barkeley (1986) menyatakan bahwa marga *Bacillus* mempunyai sifat fisiologis yang menarik karena tiap-tiap jenis mempunyai kemampuan yang berbeda-beda, diantaranya mampu

mengdegradasi senyawa organik seperti protein, pati, selulosa, hidrokarbon dan agar, mampu menghasilkan antibiotic, berperan dalam nitrifikasi dan denitrifikasi, pengikat nitrogen, bersifat khemolitotrof, aerob atau fakultatif anaerob, asidofilik, psikopofilik, atau termofilik. Rahayu (1990) juga menyatakan bahwa bakteri pada marga *Bacillus* sp. mampu menghasilkan enzim ekstraseluler yaitu enzim selulase dan enzim protease

E. Skrining Bakteri Penghasil Enzim Selulase

Skrining bakteri penghasil enzim selulase dilakukan untuk mengetahui isolate bakteri yang menghasilkan enzim selulase dengan menggunakan media selektif CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) yang berfungsi sebagai sumber karbon bagi bakteri untuk mencukupi kebutuhan energi sel dan produksi enzim (Ray, 2007). Untuk mengetahui terbentuknya zona bening maka dilakukan pewarnaan dengan

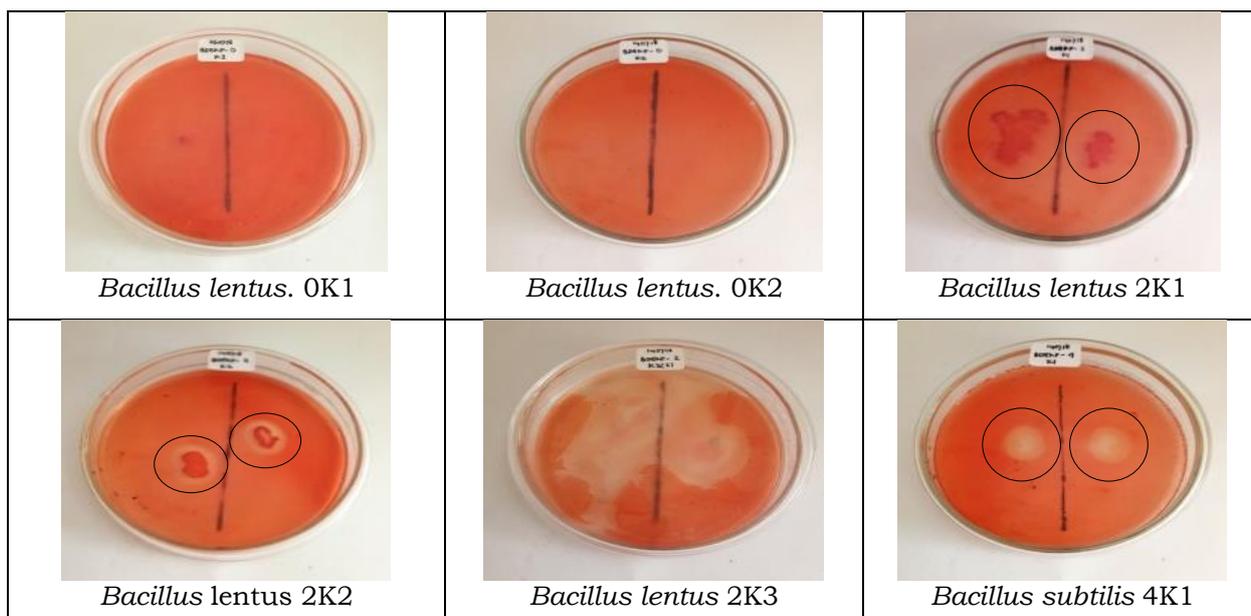
menggunakan *congo red*. *Congo red* akan berdifusi ke dalam media agar serta hanya akan diabsorpsi oleh rantai panjang polisakarida yang memiliki ikatan β-D-glukan (Zhang dkk, 2006). Setelah dilakukan pemberian *congo red* maka dilakukan pembilasan dengan menggunakan NaCl, pembilasan ini dilakukan untuk menghilangkan warna *congo red* yang tidak berikatan dengan polisakarida. Pembilasan menggunakan NaCl berfungsi untuk menghilangkan warna *congo red* yang tidak terpakai serta

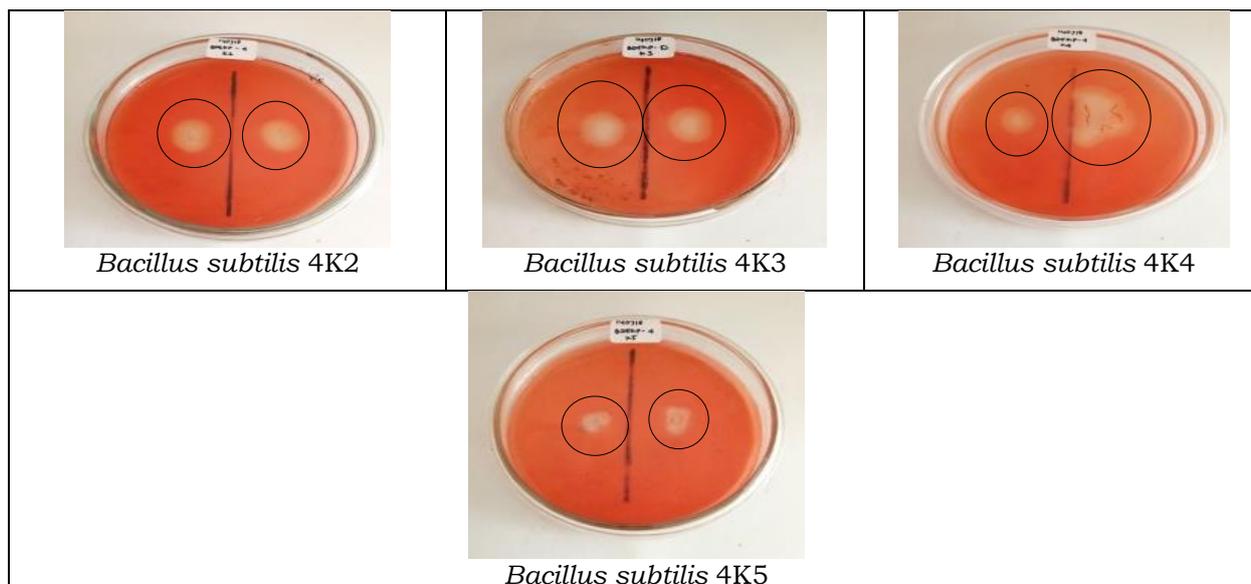
untuk memperjelas zona bening yang terbentuk, karena *congo red* adalah garam natrium dari benzidinediazo-bis-1 naphthylamine-4-asam sulfonat (C₃₂H₂₂N₆Na₂O₆S₂) sehingga dapat larut dan terbilas oleh garam natrium lainnya (Nurjannai dkk., 2017).

Skrining bakteri dilakukan pada 10 isolat yang telah diisolasi dan diidentifikasi dari limbah daun kayu putih oleh Lugina (2018). Adapun hasil skrining bakteri penghasil enzim selulase dapat dilihat pada Tabel 4

Tabel 4. Hasil Skrining Bakteri Penghasil Enzim Selulase

Isolat	Rata-rata zona bening	Rata-rata zona koloni	Nilai indeks aktivitas
<i>Bacillus lentus</i> 0K1	-	-	-
<i>Bacillus lentus</i> 0K2	-	-	-
<i>Bacillus lentus</i> 2K1	21,8 mm	18,0 mm	0,21 mm
<i>Bacillus lentus</i> 2K2	20,0 mm	11,5 mm	0,73 mm
<i>Bacillus lentus</i> 2K3	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 4K1	16,5 mm	4,0 mm	3,12 mm
<i>Bacillus subtilis</i> 4K2	15,8 mm	4,5 mm	2,48 mm
<i>Bacillus subtilis</i> 4K3	20,3 mm	3,9 mm	4,31 mm
<i>Bacillus subtilis</i> 4K4	22,1 mm	11,1 mm	0,99 mm
<i>Bacillus subtilis</i> 4K5	10,3 mm	5,5 mm	0,85 mm





Gambar 2. Hasil Skrining Bakteri Penghasil Enzim Selulase (Dokumentasi Pribadi)

Berdasarkan Tabel 2. dari 10 bakteri tujuh diantaranya menghasilkan nilai indeks aktivitas, yaitu pada bakteri *Bacillus lentus* 2K1, *Bacillus lentus* 2K2, *Bacillus subtilis* 2K3, *Bacillus subtilis* 4K1, *Bacillus subtilis* 4K2, *Bacillus subtilis* 4K3, *Bacillus subtilis* 4K4 dan *Bacillus subtilis* 4K5. Bakteri yang menghasilkan nilai indeks aktivitas mengindikasikan bahkan bakteri tersebut menghasilkan enzim selulase. Hal tersebut sesuai dengan yang dinyatakan oleh Mulyasari dkk. (2015) bahwa nilai indeks aktivitas terbesar menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu mendegradasi selulosa secara baik.

Berdasarkan Tabel 2. bakteri yang tidak memiliki nilai indeks aktivitas yaitu pada bakteri *Bacillus* sp. 0K1, *Bacillus* sp. 0K2 dan *Bacillus subtilis* 2K3. Hal tersebut karena ketiga bakteri tersebut tidak menghasilkan enzim selulase yang memiliki tiga komponen kompleks yang bekerja secara sinergi dalam proses perombakan selulosa (Frost dan Moss, 1987 dalam Azizah, 2013). Menurut Belitz dkk. (2008) menyatakan bahwa hal tersebut karena dipengaruhi oleh kemampuan

setiap bakteri dalam mendegradasi selulosa khususnya mikrofibril penyusun serat selulosa.

F. Uji Aktivitas Enzim Selulase Kapang dan Bakteri

Uji aktivitas enzim ini dilakukan dengan menggunakan metode DNS. Metode DNS adalah metode yang sering digunakan untuk mengukur kadar gula pereduksi. Metode ini sering dipakai dalam penelitian karena tingkat ketelitian yang tinggi dibandingkan dengan metode lain, sehingga dapat digunakan pada gula pereduksi dengan kadar yang kecil (Putri, 2016). Menurut Murtiyaningsih dan Hazmi (2017) aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/ml, bahwa satu unit aktivitas enzim menghasilkan 1 μ mol glukosa per menit selama masa pengujian.

Bakteri

Uji aktivitas enzim bakteri dilakukan pada bakteri yang memiliki nilai indeks aktivitas terbesar, yaitu bakteri *Bacillus subtilis* 4K3 dan *Bacillus subtilis* 4K1. Adapun hasil perhitungan aktivitas enzim selulase dapat dilihat pada Tabel 5

Tabel 5. Nilai Aktivitas Enzim Selulase Bakteri

Hari ke	Nilai aktivitas enzim selulase	
	<i>Bacillus subtilis</i> 4K3	<i>Bacillus subtilis</i> 4K1
H0	8,94 U/ml	3,33 U/ml
H1	9,55 U/ml	9,55 U/ml
H2	14,90 U/ml	12,66 U/ml
H3	14,90 U/ml	12,41 U/ml
H4	15,51 U/ml	12,25 U/ml
H5	15,82 U/ml	14,71 U/ml
H6	7,47 U/ml	10,66 U/ml
H7	11,39 U/ml	8,14 U/ml

Berdasarkan Tabel 5. nilai aktivitas tertinggi yaitu pada bakteri *Bacillus subtilis* 4K3 dengan nilai aktivitas enzim sebesar 15,82 U/ml pada hari ke lima, hasil tersebut menunjukkan bahwa pada hari ke lima *Bacillus subtilis* 4K3 berada pada puncak fase log. Bakteri *Bacillus subtilis* 4K3 memiliki kemampuan yang cukup besar dalam mendegradasi selulosa dan menghasilkan enzim selulase yang kompleks berupa endo- β -1,4-glukanase, ekso- β -1,4-glukanase dan β -glukosidase, hal tersebut terbukti dari data pada Tabel 5 menunjukkan bahwa sejak hari pertama bakteri tersebut telah menghasilkan aktivitas yang cukup besar dan setiap harinya mengalami peningkatan (Mulyasari dkk., 2015)

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian tersesebut dapat disimpulkan bahwa bakteri *Bacillus subtilis* 4K3 dan *Bacillus subtilis* 4K1 yaitu 4,19 mm dan 3,13 mm. Bakteri yang menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu bakteri *Bacillus subtilis* 4K3 dengan nilai aktivitas enzim yaitu 9,39 U/ml dan 15,82 U/ml

REFERENSI

Arnata, I. W. 2009. Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol dari Ubi

Kayu Menggunakan *Tricoderma viride*, *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisie*. Thesis Master. Bogor: Institut Pertanian Bogor (IPB).

Azizah, Siti Nur. 2013. Skrining Bakteri Selulolitik Asal Vermicomposting. Skripsi. Universitas Jember. Jember.

Belitz, H. D., Groth, W., dan Schiberle, P. 2008. *Food chemistry*. 4th ed. Springer Verlag. Berlin.

Bergey, D.H., & Boone, D.R., 2009, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.3, Ed.2, 655, Springer Science-Business Media, New York

Cappuccino, J. G. dan Sherman, N. 2005. *Microbiology: A Laboratory Manual*, New York: The Benjamin Cummings Publishing Company. Inc.

Dundu, Bertus. 2000. Penuntun Praktikum Mikrobiologi. Jurusan Hama dan Penyakit. Fakultas Pertanian. Universitas Sam Ratulangi Manado

Fikrinda. 2001. Identifikasi Ekstermozim Selulase Isolat Bakteri dari Ekosistem Air Hitam. *Jurnal Hayati*. 8(1).

Fikrinda., Anas, I., Purwadaria, T., dan Santosa, D. A. 2001. Identifikasi Ekstremozim Selulase Isolat

- Bakteri dari Ekosistem Air Hitam. *Hayati*. 8:5-10.
- Firliani, Widia., Agustien, A., dan Astuti, Febria F. 2015. Karakteristik Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Protease Netral. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*.4(1): 9-14.
- Hartati. 2010. Isolasi dan Seleksi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Kawah Air Panas Gunung Pancar, Bogor. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.
- Hallmann, J. 2001. Plant interactions with endophytic bacteria. *Biotic interactions in plant-pathogen associations*. CAB International. pp 87-119.
- Hungate, R. E. 1969. A Roll Tube for Cultivation of Strict Anaerobes. In *Methods in Microbiology*. Vol. 3B. Norris, J. R. dan Ribbon D. W. (eds). Academic Press. London.
- Hogg, Stuart. 2005. *Essential microbiology*. England: John Wiley & Sons Ltd.
- Menteri Kehutanan. 2014. *Budidaya dan Prospek Pengembangan Kayu Putih (Melaleuca cajuputi)*. Jakarta: IPB Press.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikrobiologi di Laboratorium*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Lugina, N. S. Dina. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit pada Limbah Daun Kayu Putih (*Melaleuca cajuputi* Powell). *Skripsi*. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Sunan Gunung Djati. Bandung.
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal, Chem*. 31:426-428.
- Mulyasari, I., Melati., dan T. D. Sunarno. 2015. Isolasi, Seleksi, dan Identifikasi Bakteri Selulolitik dari Rumput Laut *Turbinaria* sp. dan *Sargassum* sp. sebagai Kandidat Pendegradasi Serat Kasar Pakan Ikan. *Balai Penelitian dan Pengembangan Ikan Tawar*. 10(1) : 51-60.
- Murbando, L. H. S. 1999. *Membuat Kompos*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Murtianingsih, Hidayah dan Hazmi, Muhammad. 2017. Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase pada Bakteri Selulolitik Asal Tanah Sampah. *Agritop*. 15(2).
- Nurjannaini., Safika dan Jalaluddin, M. 2017. Jumlah Koloni Bakteri Selulolitik pada Ilium Ayam Kampung (*Gallus domesticus*). *JIMVET*. 1(3): 566-473.
- Panjaitan, Hisar., Batubara, Ridwanti., dan Yunasfi. 2013. Identifikasi Fungi yang Berkembang pada Batang Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Pasca Penebangan. *Peronema Forestry Journal*. 2(1).
- Perez, J., Dorado, J. M., T. Rubia., dan J. Martinez. 2002. Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin. *J. Int. Microbiol*. 5 : 53-63.
- Perum Perhutani. 2013. Penataan Bisnis dan Proses Inti (*Business and Core Process Structuring*). *Laporan Tahunan*. Hal. 99-100.
- Putri, Syarafina. 2016. Karakterisasi Enzim Selulase yang Dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Ray, Arun K., Bairagi, Abhinanda., Sarkar, G. K., dan Sen, Sukanta K. 2007. Optimization Of Fermentation Conditions For Cellulose Production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 Isolated from Fish Gut. *Acta ichthyologica et piscatorial*. 37(1): 47-53.

- Suryani, Yani., Andayaningsih, Poniah., dan Hernaman, iman. 2012. Isolasi dan Identifikasi Jamur Selulolitik pada Limbah Produksi Bioethanol dari Singkong yang Berpotensi dalam Pengolahan Limbah menjadi Pakan Domba. 6(1-2).
- Susanti, R., dan Fibriana, Firida. 2017. *Teknologi Enzim*. CV Andi. Yogyakarta.
- Thahirah, Afifah. 2018. Isolasi dan Identifikasi Kapang Endofit pada Limbah Daun Kayu Putih (*Melaleuca cajuputi* Powell). *Skripsi*. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Sunan Gunung Djati. Bandung.
- Wahyuningtyas, P., Argo, B. D., Nugroho, W. A. 2013. Studi Pembuatan Enzim Selulase dari Mikrofungi *Tricoderma reesei* dengan Substrat Jerami Padi sebagai Katalis Hidrolitis Enzimatis pada Produksi Bioetanol. *Laporan*. Institut Teknologi Bandung.
- Widiana, Ana., Tufikurahman, H. Limin, S., Hernaman, I., dan Manurung, R. 2014. The Potential of Gelam Leaves (*Melaleuca cajuputi* Powell) as Cattle Feed. *Pakistan Journal of Nutrition*. 13(6).
- Widiana, Ana., Tufikurahman, H. Limin, S., Hernaman, I., dan Manurung, R. 2014. Utilization of Solid Residu *Melaleuca cajuputi* Powell Leaves as Cattle Feed. *Pakistan Journal of Nutrition*. 13(10).
- Zhang, Y.H.P., Himmel, M. E., dan Mielenz, J.R. 2006. Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Selection Strategies. *Biothechnol. Adv* 24: 452-454.