



PENAPISAN DAN KARAKTERISASI BAKTERI SELULOLITIK TERMOFILIK

Lilik Septiana^{1}, Emma Susanti², Yuli Haryani³, Zulmai Rani⁴, Robiatun Rambe⁵*

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Kesehatan, Institut Kesehatan Helvetia, Medan, Indonesia

²Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru, Indonesia

³Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Indonesia

⁴Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah, Medan, Indonesia

⁵Program Studi Farmasi, Universitas Haji Sumatera Utara, Medan, Indonesia

Email: lilikseptiana16@gmail.com

*corresponding author

ABSTRAK

Bakteri selulolitik adalah bakteri yang mampu menghidrolisis kompleks selulosa menjadi oligosakarida yang lebih kecil dan akhirnya menjadi glukosa. Penelitian penapisan dan karakterisasi bakteri selulolitik termofilik dari sumber air panas ini dilakukan untuk mendapatkan bakteri termofilik yang berpotensi sebagai penghasil selulase termostabil dan karakteristik bakteri tersebut. Penelitian ini menggunakan sampel dari sumber air panas Desa Sungai Pinang, Kabupaten Kuantan Singingi, dengan 4 titik pengambilan yang berbeda. Sebanyak 24 bakteri selulolitik diisolasi menggunakan medium spesifik yang mengandung *carboxy methyl cellulose* (CMC). Aktivitas selulolitik dari isolat yang diperoleh kemudian ditentukan berdasarkan kemampuan bakteri dalam menghidrolisis substrat CMC dengan mengukur zona bening yang terbentuk di sekitar koloni pada medium CMC-congo red. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 15 dari 24 isolat (62,5%) mampu mendegradasi selulosa dengan indeks selulolitik (IS) yang beragam. Isolat SPT (III)7 memiliki aktivitas selulolitik tertinggi dengan nilai indeks selulolitik sebesar 4,80. Hasil karakterisasi morfologi dan fisiologi dari semua isolat yang diidentifikasi memperlihatkan bahwa isolat tersebut berupa bakteri *Bacillus* sp₁ dan *Bacillus* sp₂.

Kata kunci: Bakteri Selulolitik; CMC; Termofilik

ABSTRACT

Cellulolytic bacteria are bacteria that are able to hydrolyze cellulose complexes into smaller oligosaccharides and ultimately glucose. Research on the screening and characterization of thermophilic cellulolytic bacteria from hot springs was carried out to obtain thermophilic bacteria that have the potential to produce thermostable cellulase and the characteristics of these bacteria. This research used samples from hot springs in Sungai Pinang Village, Kuantan Singingi Regency, with four different collection points. A total of 24 cellulolytic bacteria were isolated using a specific medium containing carboxymethyl cellulose (CMC). The cellulolytic activity of the isolates obtained was then determined based on the ability of the bacteria to hydrolyze the CMC substrate by measuring the clear zone that formed around the colonies on CMC-congo red medium. The results showed that 15 of 24 isolates (62.5%) were able to degrade cellulose with varying cellulolytic indexes (IS). SPT (III)7 isolate had the highest cellulolytic activity, with a cellulolytic index value of 4.80. The results of the morphological and physiological characterization of all identified isolates showed that the isolates were *Bacillus* sp₁ and *Bacillus* sp₂ bacteria.

Keywords: Cellulotic Bacteria; CMC; Thermophilic

PENDAHULUAN

Bakteri selulolitik adalah bakteri yang mampu menghidrolisis kompleks selulosa menjadi oligosakarida yang lebih kecil dan akhirnya menjadi glukosa. Glukosa tersebut digunakan sebagai sumber karbon dan sumber nutrisi bagi pertumbuhan organisme ini. Bakteri selulolitik mensintesis seperangkat enzim yang mampu menghidrolisis selulosa. Enzim ini disintesis oleh mikroba selama tumbuh dalam media selulosa (Rahayu et al., 2014).

Enzim merupakan molekul protein yang dihasilkan oleh sel hidup dan digunakan oleh sel-sel tersebut untuk mengkatalis reaksi biokimia secara spesifik (Suberata, 2021). Pemanfaatan enzim di dalam bioteknologi semakin menuntut adanya enzim bersifat tahan lingkungan yang mampu melakukan aktifitas pada kondisi ekstrim, salah satunya enzim termostabil yang mampu bekerja pada temperatur tinggi. Enzim tersebut dapat diperoleh dengan mencari mikroba penghasil enzim-enzim termostabil dari berbagai sumber alam seperti sumber air panas, daerah kawah gunung berapi dan daerah ekstrim lainnya (Hadriani, 2022).

Perkembangan penggunaan enzim sangat pesat dilihat dari komersialisasi enzim yang terus meningkat. Salah satu enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri adalah enzim selulase, yang berperan sebagai biokatalisator dalam bidang industri (Setiawati et al., 2022). Selain itu selulase juga digunakan dalam industri farmasi sebagai zat untuk membantu sistem pencernaan dan dapat mengurangi viskositas (Permatasari, 2018). Enzim Selulase juga banyak dimanfaatkan dalam produksi bioetanol guna mengatasi kekurangan bahan bakar minyak dan dalam proses fermentasi dari biomassa menjadi biofuel, seperti bioetanol bumi (Sindhuwati et al., 2021).

Pemilihan mikroba sebagai sumber enzim memiliki beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan sumber enzim dari tumbuhan atau hewan, sebab sel mikroba lebih mudah ditumbuhkan, kecepatan pertumbuhan lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan bila dikehendaki, biaya produksi relatif rendah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya pergantian musim, dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek (Aidul, 2022). Enzim selulase dapat dihasilkan dari aktivitas mikroorganisme yaitu bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang memiliki kemampuan menghidrolisis selulosa menjadi oligosakarida dan akhirnya menjadi glukosa. Glukosa digunakan sebagai sumber karbon untuk menghasilkan energi. Bakteri tersebut menghasilkan enzim selulase sebagai respon terhadap adanya selulosa pada lingkungannya. Proses ini terjadi apabila ada kontak langsung antara sel bakteri dan permukaan selulosa (Rahayu et al., 2014).

Selama ini kebutuhan akan enzim selulase untuk industri dipenuhi secara impor padahal kondisi alam Indonesia sangat mendukung untuk produksi enzim selulase melalui mikroba lokal terseleksi. Produksi enzim selulase termostabil dapat dilakukan melalui eksplorasi bakteri termofilik penghasil selulase yang berasal dari lingkungan ekstrim alam Indonesia. Salah satu lingkungan ekstrimnya adalah sumber air panas yang merupakan habitat bagi pertumbuhan bakteri termofilik. Peneliti terdahulu melaporkan bahwa beberapa bakteri termofilik isolat lokal telah berhasil di isolasi dari air panas Siak, Riau dan Kerinci, Jambi (Edlin et al., 2014; Rahayu et al., 2014). Namun, hingga saat ini belum ada informasi yang dapat diperoleh mengenai isolat bakteri selulolitik termofilik dari sumber air panas Sungai Pinang, Kabupaten Kuantan Singingi yang berada di Desa Sungai Pinang, Kecamatan Hulu Kuantan, Kabupaten Kuantan Singingi.

Berdasarkan survei yang telah dilakukan, sumber air panas tersebut mempunyai suhu 47-51°C dan pH 6-7 dan disekelilingnya terdapat berbagai vegetasi seperti lumut, rumput-rumputan, tanaman, pohon, sisa organisme yang telah mati seperti daun-daun, ranting-ranting kayu, serangga yang telah mati dan batu-batuan. Berdasarkan latar belakang diatas peneliti tertarik untuk melakukan penapisan dan karakterisasi bakteri termofilik dari sumber air panas di Desa Sungai Pinang, Kecamatan Hulu Kuantan, Kabupaten

Kuantan Singingi, Propinsi Riau. Isolat bakteri termofilik diharapkan potensial sebagai penghasil enzim selulase termostabil dan mengetahui karakteristik dari isolat bakteri tersebut.

METODE PENELITIAN

Pengumpulan Sampel

Sampel diambil dari sumber air panas di Desa Sungai Pinang dengan 4 titik pengambilan sampel yang berbeda tetapi dengan perlakuan yang sama. Sebelum sampel air diambil, pengukuran parameter fisika dan kimia lebih dahulu dilakukan. Parameter pertama adalah suhu air pada lokasi pengambilan sampel. Pengukuran dilakukan menggunakan termometer yang dicelupkan selama 1 menit. Parameter kedua adalah pH air di lokasi pengambilan sampel. Penentuan pH air dilakukan dengan mencelupkan pH meter ke permukaan air. Sampel diambil pada bagian permukaan kolam dan pada kedalaman 30 cm dari permukaan air, dikompositkan dan dimasukkan ke dalam termos agar suhunya tetap terjaga.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang terbuat dari gelas (tabung reaksi, cawan Petri, pipet ukur, pipet volume) yang sudah dibungkus dengan kertas koran, disterilkan menggunakan oven pada suhu 160°C selama 2 jam. Sedangkan media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Jarum Ose disterilkan dengan pemijaran langsung diatas nyala api setiap kali pemakaian. Pengujian dilakukan secara aseptis di dalam LAF (Laminar Air Flow) yang sebelumnya telah disinari dengan lampu UV selama 15 menit.

Penapisan Bakteri Termofilik dan Selulolitik

Sampel yang terdapat di dalam botol termos dikocok sampai homogen, kemudian dituang kedalam erlemeyer yang berisi Nutrient Broth sebanyak 225 ml kemudian di ad kan dengan sampel air panas 250 ml (9:1) Selanjutnya diinkubasi pada suhu tumbuh 50° C selama 20-24jam. Setelah di inkubasi selama 20-24 jam, suspensi tersebut di goreskanke permukaanawan Petri yang berisi media padat selulase dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 20-24 jam. Isolat bakteri yang tumbuh kemudian dimurnikan dengan menginokulasikan kembali ke media padat selulase dengan metode streak dan inkubasi pada suhu 50°C selama 20-24 jam. Setelah didapatkan koloni-koloni tunggal, koloni dipindahkan ke dalam stok agar miring Nutrient Agar dengan metode streak berdasarkan perbedaan bentuk dan warna koloni dan inkubasi pada suhu 50°C selama 20-24 jam dan disimpan di dalam lemari es (Edlin et al., 2014).

Seleksi Isolat Bakteri Selulolitik Termofilik

Stok isolat bakteri yang disimpan dalam lemari es diremajakan ke dalam media miring Nutrient Agar dengan cara digoreskan ke permukaan agar dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 20-24 jam, kemudian isolat di ambil dan ditumbuhkan pada media padat selulase dan inkubasi pada suhu 50°C selama 20-24 jam. Isolat yang terlihat atau tumbuh pada media padat selulase kemudian ditambahkan dengan 5 ml congo red0,1 % dengan cara dituang kemedian yang berisi isolat tersebut dan dibiarkan selama 1 hari. Setelah 1 hari warna dicuci dengan NaCl 1 M dan dibiarkan selama 1 hari (Mahmudah et al., 2016). Isolat bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulase ditandai dengan adanya zona bening yang terlihat disekitar koloni setelah diberi pewarna Congo red dan zona bening tampak lebih jelas dengan dicuci NaCl. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri diukur diameternya dengan jangka sorong.

Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Selulolitik Termofilik

Karakterisasi isolat bakteri selulolitik termofilik meliputi: makroskopis koloni, mikroskopis sel, dan uji biokimia.

Makroskopis

Pengamatan dilakukan secara organoleptis dengan mengamati bentuk koloni yang terbentuk, warna, tepi koloni dan elevasi atau bentuk permukaan bakteri.

Mikroskopis

Pengamatan dilakukan dengan penentuan jenis bakteri Gram positif atau Gram negatif dan bentuk dengan melakukan pewarnaan Gram yaitu: Kaca objek dibersihkan dari lemak dengan alkohol 96 % kemudian dipanaskan di atas nyala spiritus, ditetesi 1-2 tetes NaCl 0,9 %. Satu Ose bakteri diletakkan di atas tetesan NaCl 0,9 % diratakan dan difiksasi. Setelah dingin diwarnai dengan Kristal violet sebanyak 2-3 tetes dibiarkan selama 1 menit, dibilas dengan air, dan dikering anginkan. Larutan lugol ditetaskan, dibiarkan selama 1 menit dibilas dengan air, dikering anginkan. Warna dihilangkan dengan penambahan alkohol 96 % biarkan selama 10-20 detik, dibilas dengan air dan dikering anginkan. Safranin ditetaskan sebanyak 2-3 tetes, dibiarkan selama 1 menit dibilas dengan air dan dikering anginkan. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x, didapatkan bakteri Gram positif menyerap warna ungu atau Gram negatif menyerap warna merah (Dewi et al., 2017).

Uji dengan reaksi biokimia

Uji biokimia dilakukan dengan menginokulasikan koloni bakteri yang telah dimurnikan pada medium biokimia yang telah disiapkan, inkubasi pada suhu 50°C selama 24 jam, pengamatan dilakukan terhadap perubahan yang terjadi pada media biokimia (Rahayu et al., 2014).

Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA) dan H₂S

Satu Ose isolat bakteri digoreskan pada media miring TSIA, kemudian jarum Ose tersebut ditancapkan hingga mendekati dasar tabung berisi TSIA tersebut, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C. Perubahan warna kuning pada media mengindikasikan adanya asam dan apabila warnanya tidak berubah yaitu warna merah mengindikasikan basadan H₂S positif ditandai dengan adanya endapan hitam (Mahmudah et al., 2016).

Uji Motilitas

Satu Ose isolat bakteri diinokulasikan pada media *Sulfit Indol Motility* (SIM) dengan cara menusukkannya hingga setengah media pada tabung reaksi lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C. Uji positif ditunjukkan dengan adanya jejak pergerakan bakteri dan H₂S positif ditandai dengan adanya endapan hitam (Mahmudah et al., 2016).

Uji Pembentukan Indol

Satu Ose bakteri diinokulasikan pada medium kaldu tripton, diinkubasi pada suhu 50°C selama 24 jam, kemudian diberi pereaksi kovaks (terdiri dari pDAB, n-amyl alkohol dan HClp) sebanyak 0,2-0,3 ml ke dalam tabung dan dikocok selama 10 menit, warna merah tua pada permukaan menunjukkan reaksi indol positif dan warna kuning menunjukkan indol negatif.

Uji Fermentasi Karbohidrat (Laktosa, Glukosa, Sukrosa dan Manitol)

Satu Ose bakteri diinokulasikan pada medium kaldu glukosa, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C. Biakan diamati dengan indikator merah fenol, hasil positif apabila terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning (Fauziah & Ibrahim, 2020).

Uji Katalase

Koloni bakteri diletakkan diatas kaca objek sebanyak 1 Ose, kemudian ditetesi 2-3 tetes larutan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% dengan terbentuknya gelembung udara di sekitar permukaan bakteri bearti bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase dan apabila tidak menghasilkan maka gelembung udara tidak akan terbentuk (Chusniasih et al., 2023).

Uji Hidrolisis Urea

Satu Ose bakteri diinokulasikan pada medium Urea Agar (berwarna kuning), lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C. Hasil positif apabila terjadi perubahan warna pada medium dari hijau menjadi merah keunguan (Mahmudah et al., 2016).

Uji Sitrat

Satu Ose bakteri diinokulasikan pada medium Simmon Sitrat Agar (berwarna hijau) lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C. Hasil positif apabila terjadi perubahan warna dari kuning menjadi biru (Mahmudah et al., 2016).

Uji Metil Red

Satu Ose bakteri diinokulasikan pada medium MR-VP, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C. Kemudian ditambahkan 5 tetes metil red. Hasil positif apabila terjadi perubahan warna medium dari kuning menjadi merah (Mahmudah et al., 2016).

Uji Voges Proskauer

Satu Ose bakteri diinokulasikan pada medium MR-VP, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C. Kemudian ditambahkan 1 ml KOH 10% dan 1 ml Alfa naftol. Hasil positif apabila terjadi perubahan warna pada permukaan medium dari kuning menjadi merah (Mahmudah et al., 2016).

Uji Oksidasidan Uji Fermentasi (OF)

Satu koloni bakteri masing-masing ditotolkan pada permukaan medium OF, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C. Pada uji fermentatif medium ditutup dengan paraffin sedangkan uji oksidatif tidak. Oksidasi ditandai dengan perubahan warna pada medium OF yang tidak ditutupi paraffin menjadi kuning orange. Sedangkan fermentatif ditandai dengan perubahan warna pada kedua medium menjadi kuning orange (Novianti, 2023).

Uji Nitrat

Dilakukan bakteri diinokulasi dalam medium kaldu nitrat, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C, kemudian ditambahkan 1 ml asam sulfanilat dan 1 ml alpha-naftilamin ke dalam biakan. Hasil positif apabila terjadi perubahan warna medium dari putih susu menjadi merah (Mahmudah et al., 2016).

Uji Gelatinase

Dilakukan inokulasi bakteri dalam medium gelatin, lalu inkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C, kemudian amati pencairan gelatin.

Analisis Data

Data hasil penapisan isolat yang memiliki kemampuan selulolitik disajikan dalam bentuk tabel dan gambar, kemudian data dianalisis secara deskriptif berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Diameter zona bening yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong, kemudian dibagi dengan besarnya diameter koloni yang diperoleh (Edlin et al., 2014).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji parameter fisika, kimia dan jumlah isolat bakteri selulolitik termofilik yang didapatkan dari sumber air panas sungai pinang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kondisi Fisika dan Kimia serta Jumlah Isolat Bakteri Selulolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Sungai Pinang.

Titik Pengambilan Sampel	Suhu Inkubasi	pH Air	Suhu Air	Suhu lingkungan	Jumlah Isolat
Titik I	50°C	6	50°C	31°C	3
Titik II	50°C	7	51°C	31°C	3
Titik III	50°C	7	50°C	31°C	8
Titik IV	50°C	6	50°C	31°C	10

Hasil penapisan bakteri selulolitik termofilik dari sumber air panas pada suhu 50°C diperoleh 24 isolat bakteri selulolitik termofilik dan 15 isolat diantaranya menunjukkan adanya zona bening disekitar kolonidengan indeks selulolitik (IS) tertinggi pada isolat SPT (III)7 dengan nilai IS 4,80 mm dan indeks selulolitik terendah pada isolat SPT (III)2 dengan IS 1,5 mm.

Hasil karakterisasi mikroskopis dan makroskopis dari 24 isolat bakteri merupakan Gram positif dan berbentuk batang sedangkan secara makroskopis didapatkan hasil sebagai berikut: Warna koloni : putih dan krem, bentuk koloni : sirkuler dan tidak beraturan, tepian koloni : mulus dan bergelombang, elevasi koloni : naik, datar, dan cembung.

Penelitian penapisan dan karakterisasi bakteri selulolitik termofilik dari sumber air panas ini dilakukan untuk mendapatkan bakteri termofilik yang berpotensi sebagai penghasil selulase termostabil dan karakteristik bakteri tersebut. Penelitian ini menggunakan sampel dari sumber air panas Desa Sungai Pinang, Kabupaten Kuantan Singingi, dengan 4 titik pengambilan yang berbeda.

Berdasarkan kondisi fisika dan kimia air kolam pada Tabel 1 mikroorganisme memenuhi karakter yang tergolong bakteri termofilik dimana bakteri hidup pada sumber air panas dengan suhu 50-51°C dengan kadar keasaman air yang netral. Golongan mikroba termofilik memiliki suhu pertumbuhan optimum berkisar antara 45-60°C. Pada umumnya bakteri termofilik mampu hidup pada kisaran pH netral (6-9) (Siregar & Huda, 2017).

Penapisan koloni tunggal dan seleksi bakteri selulolitik ini dilakukan dalam media padat selulase yang mengandung carboxy methyl cellulose (CMC) 1% sebagai substrat. Media CMC yang terhidrolisis oleh enzim selulase jika digenangi oleh pewarna *Congo red* tidak akan terwarnai. Interaksi ini berlangsung secara non kovalen. *Congo red* dijadikan indikator terjadinya degradasi β -D-glukan dalam media agar. Metode ini dipilih karena proses seleksi dapat berlangsung cepat, mudah, dan sensitif. Pewarnaan dengan *Congo red* dapat menentukan mikroba selulolitik dalam konsentrasi substrat yang rendah dan mendeteksi aktivitas selulolitik dalam konsentrasi rendah. Zona bening yang terbentuk dapat dilihat setelah dicuci dengan menggunakan NaCl 1M. Congo red merupakan garam natrium dari benzenediazo-bis-1-naphthylamine-4-asamsulfonat ($C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$) sehingga pewarna ini akan larut dan tercuci oleh garam natrium seperti NaCl. Zona bening yang terbentuk akan tampak jelas. Zona bening menunjukkan zona tempat terputusnya ikatan β -1,4-glikosidik yang menghubungkan monomer D-glukosa pada CMC (Mahmudah et al., 2016).

Setelah dilakukan seleksi dari 24 isolat bakteri diperoleh 15 isolat bakteri selulolitik yang positif menghasilkan enzim selulase yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Penelitian menunjukkan bahwa dari hasil pengujian selulolitik didapatkan 15 isolat bakteri yaitu 3 isolat pada titik sampling I (suhu 50°C dan pH 6), 3 isolat dari titik sampling II (suhu 51°C dan pH 7), 6 isolat dari titik sampling III (suhu 50°C dan pH 7) dan 3 isolat dari titik sampling IV (50°C dan pH 6). Rentang indeks selulolitik antara 1,5-4,8 mm, isolat SPT (III)7 memiliki indeks selulolitik tertinggi yaitu 4,8 mm dan isolat SPT (III)2 memiliki indeks selulolitik terendah yaitu 1,5 mm. Sedangkan 9 isolat bakteri tidak

menunjukkan adanya zona bening meskipun tumbuh pada media padat selulase, hal ini dikarenakan enzim selulase yang dihasilkan tidak cukup banyak untuk memperlihatkan adanya zona bening di media padat selulase-congo red. Penelitian (Siti et al., 2011) juga menunjukkan tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni dari isolat bakteri yang diisolasi dari rayap lokal Indonesia. Hal ini disebabkan bakteri biasanya tidak langsung mengeluarkan enzim selulase ke luar sel tetapi masih terperangkap di dalam sel.

Isolat yang menghasilkan diameter zona bening dua kali diameter koloni merupakan produser enzim yang potensial. Sebanyak 12 dari 15 isolat (80%) yang diperoleh dari penelitian ini memiliki indeks selulolitik ≥ 2 . Oleh karena itu perlu dilakukan uji lebih lanjut secara kuantitatif untuk mengetahui aktivitas enzim dari isolat tersebut karena indeks selulolitik (IS) dan aktivitas enzim tidak selalu memiliki korelasi positif. Penelitian sebelumnya (Sari et al., 2012), melaporkan bahwa isolat yang ditemukannya dengan aktivitas selulase tertinggi 32,14 U/ml memiliki aktivitas selulolitik (indeks selulolitik) 2,40 mm, sedangkan isolat yang hanya menunjukkan aktivitas enzim selulase sebesar 3,57 U/ml adalah isolat dengan aktivitas selulolitik (indeks selulolitik) yang terbesar 5,40 mm.

Uji kemampuan degradasi dengan menggunakan metode zona bening adalah uji semi kuantitatif karena data yang diperoleh hanya berupa perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni. Zona bening yang terbentuk terkait dengan kelarutan dari enzim selulase. Semakin tinggi tingkat kelarutan suatu enzim maka semakin besar zona bening yang terbentuk (Mahmudah et al., 2016).

Dalam pengamatan di bawah mikroskop Gram positif ditandai dengan warna ungu dan Gram negatif ditandai dengan warna merah muda. Perbedaan warna ini terjadi karena adanya perbedaan komposisi dinding sel antara Gram positif dan Gram negatif. Pada Gram positif dinding selnya banyak mengandung lapisan peptidoglikan sehingga ketika dilakukan pencucian dengan alkohol, pewarna primer yaitu kristal violet tidak luntur, karena akan tertahan kuat dalam peptidoglikan, lalu ketika diberi pewarna sekunder yaitu safranin, dan ketika diamati di bawah mikroskop, bakteri Gram positif tetap akan berwarna ungu. Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis, ketika dilakukan pencucian, pewarna primernya akan ikut tercuci, tidak tertahan dalam peptidoglikan, sehingga ketika di beri pewarna pembanding safranin, ketika di lihat di bawah mikroskop akan kelihatan berwarna merah muda. Pada penelitian ini semua isolat Gram positif, hal ini membuktikan bahwa penghasil enzim ekstraselular pada umumnya Gram positif (Dewi et al., 2017).

Pada uji H₂S dengan medium Triple Sugar Iron Agar (TSIA) *Bacillus* sp memberikan reaksi negatif dimana tidak terbentuk logam sulfid yang berwarna hitam pada medium. Hal ini menunjukkan bahwa *Bacillus* sp tidak dapat menghidrolisis logam-logam berat yang terkandung dalam medium. *Bacillus* sp1 pada dasar dan permukaan miring medium berwarna kuning yang menunjukkan adanya fermentasi glukosa sedangkan pada *Bacillus* sp2 pada dasar dan permukaan miring medium berwarna merah yang menunjukkan tidak adanya fermentasi gula dan pembentukan gas atau pembentukan H₂S (Mahmudah et al., 2016).

Pada uji motilitas *Bacillus* sp menunjukkan reaksi yang positif, ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu melakukan pergerakan, yaitu biasa bergerak adalah bakteri yang mempunyai flagel. Flagellum terdiri dari tiga bagian yaitu tubuh dasar, struktur seperti kait, dan sehelai filament panjang di luar dinding sel (Rahayu et al., 2014). Pada uji indol *Bacillus* sp menunjukkan reaksi negatif dimana bakteri tidak dapat menghidrolisa asam amino triptofan menjadi indol dan asam piruvat sebagai sumber karbon, karena bakteri *Bacillus* sp tidak memiliki enzim triptofan.

Pada uji fermentasi karbohidrat bakteri *Bacillus* sp1 menunjukkan reaksi positif pada uji glukosa, sukrosa, manitol dan negatif pada uji laktosa, hal ini menunjukkan bahwa bakteri ini mampu memfermentasi karbohidrat menjadi asam dalam keadaan aerob yang ditandai dengan berubahnya warna medium menjadi kuning, perubahan warna medium menjadi kuning disebabkan karena terdapatnya indikator brom timol blue (BTB) dalam medium (Rahayu et al., 2014). Sedangkan *Bacillus* sp2 negatif pada semua uji karbohidrat hal ini menunjukkan bahwa bakteri ini tidak mampu memfermentasikan karbohidrat.

Pada uji katalase *Bacillus* sp memberikan reaksi positif karena bakteri ini bersifat aerob yang menggunakan oksigen akan menghasilkan hidrogen peroksida yang bersifat racun terhadap sistem enzimnya, tetapi bakteri ini dapat bertahan hidup karena dihasilkannya enzim katalase yang akan merubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Chusniasih et al., 2023). Pada uji urease bakteri *Bacillus* sp menunjukkan reaksi negatif, dimana bakteri ini tidak mampu menggunakan enzim urease sehingga tidak terjadi perubahan indikator merah fenol dari orange menjadi merah muda. Pada uji sitrat bakteri *Bacillus* sp menunjukkan reaksi negatif karena bakteri *Bacillus* sp tidak dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon sehingga tidak terjadi alkalinisasi dan tidak terjadi perubahan warna indikator brom timol biru (Cappuccino & Sherman, 2014)

Pada uji metil red *Bacillus* sp menunjukkan reaksi yang positif, ini menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus* sp mampu menghasilkan dan mempertahankan hasil akhir asam yang stabil dari fermentasi glukosa dalam medium yang menghasilkan asam laktat, asam asetat, asam suksinat, asam formiat, CO₂, H₂O dan etanol. Akumulasi dari asam-asam ini dapat menurunkan pH sampai 5 atau kurang yang akan memberikan perubahan warna pada media setelah ditambahkan 1-2 tetes indikator merah metil (Cappuccino & Sherman, 2014).

Pada uji voges proskauer *Bacillus* sp1 menunjukkan reaksi positif yang ditandai dengan terbentuknya warna merah mawar tua pada medium setelah penambahan pereaksi Barritt yang mengindikasikan adanya asetil metil karbinol. Sedangkan pada *Bacillus* sp2 menunjukkan reaksi negatif yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada medium setelah ditambahkan pereaksi (Cappuccino & Sherman, 2014).

Pada uji oksidasi fermentasi (OF) *Bacillus* sp menunjukkan reaksi negatif, dimana bakteri ini tidak mampu menggunakan karbohidrat dengan cara fermentasi atau oksidasi. Pada uji pencairan gelatin *Bacillus* sp menunjukkan reaksi positif dimana bakteri ini dapat menghasilkan enzim ekstraseluler proteolitik, yang disebut gelatinase, yang bekerja menghidrolisis protein menjadi asam-asam amino (Cappuccino & Sherman, 2014)

Pada uji nitrat *Bacillus* sp1 menunjukkan medium berubah menjadi merah yang menunjukkan telah terjadi reduksi nitrat menjadi nitrit. Sedangkan pada *Bacillus* sp2 tidak menghasilkan perubahan warna sehingga dinyatakan negatif menghasilkan enzim nitrat reduktase (Cappuccino & Sherman, 2014)

Dalam penelitian ini didapatkan 6 isolat bakteri *Bacillus* sp1 dan 18 isolat *Bacillus* sp2. Pada titik sampling I (1 isolat *Bacillus* sp1 dan 2 isolat *Bacillus* sp2), pada titik sampling II (1 isolat *Bacillus* sp1 dan 2 isolat *Bacillus* sp2), pada titik sampling III (1 isolat *Bacillus* sp1 dan 7 isolat *Bacillus* sp2), pada titik sampling IV (3 isolat *Bacillus* sp1 dan 7 isolat *Bacillus* sp2). Isolat bakteri yang diperoleh dalam setiap titik pengambilan sampel berbeda-beda, pada titik sampling III & IV didapatkan isolat yang lebih banyak dibandingkan dengan titik sampling I & II, ini dikarenakan pada titik sampling tersebut sampel air panasnya lebih kotor karena banyaknya sisa organisme yang telah mati seperti daun-daun, ranting-ranting kayu, serangga yang telah mati yang merupakan nutrisi bagi mikroorganisme.

Dalam setiap titik sampling I, II, III & IV pada masing-masing sampling terdapat 2 sub spesies bakteri *Bacillus* sp, ini disebabkan karena dari 4 titik pengambilan sampel masih dalam 1 kolam yang sama sehingga tidak terdapat variasi yang berarti. Genus *Bacillus* sp dengan ciri atau sifat yang berbeda diasumsikan merupakan sub spesies yang berbeda sehingga diberi label *Bacillus* sp1 dan *Bacillus* sp2. Kepastian spesies dapat ditentukan dengan pengujian lebih lanjut secara molekuler.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut: Diperoleh 15 isolat bakteri selulolitik termofilik yang menunjukkan adanya zona bening. Indeks selulolitik (IS) tertinggi pada isolat SPT (III)7 dengan nilai IS 4,80 mm. Dari identifikasi yang telah dilakukan diperoleh 2

subspesies bakteri yaitu *Bacillus* sp1 dan *Bacillus* sp2 dengan karakteristik sebagai berikut: aerob, motil, Gram positif, sel berbentuk batang, positif pada uji gelatinase dan katalase.

REFERENSI

- Aidul, A. (2022). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Xantin Oksidase Dari Sumber Air Panas Panggo Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan [PhD Thesis, Universitas Hasanuddin]. <http://repository.unhas.ac.id/id/eprint/13207/>
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. 2. (2014). Manual Laboratorium Mikrobiologi Edisi Kedelapan. (EGC, Ed.).
- Chusniasih, D., Suryanti, E., & Safitri, E. (2023). Isolasi Dan Uji Aktivitas Selulolitik Bakteri Asal Limbah Ampas Tebu (BAGASSE). *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 00. <https://journal.ipb.ac.id/index.php/JIPI/article/view/42327>
- Dewi, A. K., Meylina, L., & Rusli, R. (2017). Isolasi bakteri dari tanah mangrove *Rhizopora* sp. Di kota bontang. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 5, 59–68. <https://www.academia.edu/download/81292510/221.pdf>
- Edlin, Y. N., Agustien, A., & Tjong, D. H. (2014). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Alkali-Proteolitik Sumber Air Panas Semurup Kerinci Jambi. *Jurnal Biologi UNAND*, 3(4). <http://jbioua.fmipa.unand.ac.id/index.php/jbioua/article/view/145>
- Fauziah, S. I., & Ibrahim, M. (2020). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Selulolitik pada Tanah Gambut di Desa Tagagiri Tama Jaya, Kecamatan Pelangiran, Kabupaten Inhil, Riau. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 9(3), 194–203.
- Mahmudah, R., Baharuddin, M., & Sappewali, S. (2016). Identifikasi Isolat Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Lejja, Kabupaten Soppeng. *Al-Kimia*, 4(1), 31–42.
- Novianti, O. (2023). Biokonversi Selulosa Pada Ampas Tebu (Bagasse) Menjadi Nanokomposit Hidrogel Dengan Memanfaatkan Enzim Hidrolitik Dari Indigenous Composting Actinomycetes. <http://digilib.unila.ac.id/id/eprint/69197>
- Permatasari, M. (2018). Peningkatan Stabilitas Enzim Selulase Dari Bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 Dengan Amobilisasi Menggunakan Zeolit. <http://digilib.unila.ac.id/id/eprint/29892>
- Rahayu, A. G., Haryani, Y., & Puspita, F. (2014). Uji aktivitas selulolitik dari tiga isolat bakteri *Bacillus* sp. Galur lokal riau [PhD Thesis, Riau University]. <https://www.neliti.com/publications/189473/uji-aktivitas-selulolitik-dari-tiga-isolat-bakteri-bacillus-sp-galur-lokal-riau>
- Sari, U. M., Nurmiati, & Agustien, A. (2012). Penapisan dan Karakterisasi Bakteri Selulolitik Termofilik Sumber Air Panas Sungai Medang, Kerinci, Jambi. *Jurnal Biologi Universitas Andalas.*, 1 (2), 66-171.
- Setiawati, U. N., AR, M. M., Lestari, M. D., Nukmal, N., Setyaningrum, E., Aeny, T. N., & Arifiyanto, A. (2022). Penapisan enzim hidrolase pada bakteri *Streptomyces* sp. Strain I18. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 207–214.
- Sindhuwati, C., Mustain, A., Rosly, Y. O., Aprijaya, A. S., Mufid, M., Suryandari, A. S., Hardjono, H., & Rulianah, S. (2021). Potensi Tandan Kosong Kelapa Sawit sebagai Bahan Baku Pembuatan Bioetanol dengan Metode Fed Batch pada Proses Hidrolisis. *Jurnal Teknik Kimia Dan Lingkungan*, 5(2), 128–144.
- Siregar, M. T., & Huda, M. (2017). Isolasi dan identifikasi bakteri termofilik dari sumber air panas Way Panas Bumi Natar Lampung Selatan. *Jurnal Analis Kesehatan*, 3(1), 297–304.
- Siti, U., R, A., & Y., E. (2011). Identifikasi Bakteri Selulolitik Dari Saluran Pencernaan Rayap Lokal. *Jurnal*.