

BAB II KAJIAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Termofilik

Bakteri termofilik merupakan kelompok bakteri yang memiliki kondisi pertumbuhan optimum pada suhu tinggi (Nam dkk. 2004). Bakteri termofilik berbeda dengan sel-sel eukariotik karena kemampuannya untuk beradaptasi dan tumbuh pada suhu tinggi serta kondisi ekstrim, seperti salinitas tinggi (NaCl jenuh), pH ekstrim (kurang dari 2.0 dan lebih dari 10.0), dan tekanan substrat. Berdasarkan kisaran suhu pertumbuhannya, bakteri termofilik terdiri atas tiga golongan, yaitu termofilik (45-65°C), ekstrim termofilik (65-85°C), dan hipertermofilik (85-110°C) (Andrade dkk. 1999).

Habitat alami bakteri termofilik tersebar luas di seluruh permukaan bumi. Salah satu lingkungan alaminya terbentuk akibat aktivitas vulkanik atau perpindahan kerak bumi pada saat gempa tektonik. Fenomena geologi tersebut menghasilkan kawah air panas yang biasanya memiliki pH netral. Bakteri termofilik juga dapat ditemukan di geotermal laut dalam yang memiliki kadar mineral dan salinitas yang tinggi. Oleh karena itu, bakteri ini sulit diisolasi dan di kulturkan di laboratorium. Bakteri termofilik dan hipertermofilik telah berhasil diisolasi dari daerah sumber panas bumi, sedimen lautan geotermal, dan kawah air panas. Termofilik halofil dari laut dalam juga telah berhasil diisolasi. Salah satunya adalah spesies *Thermus* yang dapat tumbuh dengan adanya NaCl 3% atau lebih (Edwards, 1990).

Selain lingkungan tersebut, bakteri termofilik juga dapat ditemukan pada tanah, kompos, sampah, dan lumpur sungai. Fikrinda (2000) berhasil mengisolasi bakteri termofilik yang berasal dari tanah ekosistem air hitam, Kalimantan Tengah. Mikroba termofilik yang telah ditemukan dalam kompos, diantaranya adalah *Thermonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermonospora chromogena*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Actinomycetes*, dan *Thermus* (Mayende dkk. 2006).

Organisme dalam kelompok termofil ini mampu hidup di alam pada tempat-tempat seperti sumber air panas atau tumpukan sampah-sampah yang membusuk yang telah menghasilkan panas yang cukup tinggi sebagai akibat metabolismenya (Volk dan Wheeler, 1988). Eksplorasi terhadap bakteri termofilik yang berasal dari sumber air panas Gunung Pancar juga pernah dilakukan, delapan belas isolat termofil aerob yang berhasil diisolasi dari sumber air panas Gunung Pancar memiliki berbagai aktivitas enzim hidrolitik ekstraseluler, yaitu proteolitik, amilolitik, lipolitik, kitinolitik, dan xilanolitik (Dirnawan, 1999).

Harahap (2007), berhasil melakukan amplifikasi gen 16S-rRNA bakteri yang diisolasi dari Kawah Merah, Putih, Asin, dan Hitam Gunung Pancar. Bakteri yang berasal dari Kawah Hitam juga telah diketahui memiliki potensi sebagai bioflokulan (Susanti, 2007). Suyono dkk, (2008), mengisolasi bakteri termofilik penghasil asam laktat dari Kawah Putih Gunung Pancar. Menurut Brock (1986), terdapat tiga faktor yang menyebabkan bakteri termofilik mampu bertahan dan berkembang dalam kondisi suhu tinggi, yaitu kandungan enzim dan protein lebih stabil dan tahan panas dibandingkan dengan mesofil, molekul pensintesis protein (seperti ribosom dan

komponen lainnya) stabil terhadap panas, dan membran lipid sel termofil mengandung banyak asam lemak jenuh yang membentuk ikatan hidrofobik yang sangat kuat.

Kemampuan hidup dari mikroorganisma termofil ini berhubungan dengan struktur selnya yang memiliki kelebihan dalam beberapa hal, yaitu :

a. Struktur membran sel

Membran sel setiap makhluk hidup tersusun atas senyawa lipid dan protein yang disebut lipoprotein. Pada umumnya bagian lipid dari membran sel makhluk hidup dihubungkan oleh ikatan ester, sedangkan pada organisma termofil senyawa lipid membran selnya mengandung ikatan eter yang terbentuk lewat proses kondensasi dari gliserol atau senyawa poliol kompleks lainnya dengan alcohol isoprenoid yang mengandung 20, 25 atau 40 atom karbon (de Rossa dkk, 1986). Lebih jauh lagi senyawa eter gliserol pada Archaeobacteria ini mengandung 2,3 *O-sn-gliserol* yang menyebabkan struktur lipoprotein dari membran sel termofil tersebut lebih stabil (Sianturi, 2008).

b. Struktur Protein

Chaperonin merupakan suatu jenis protein yang merupakan jenis protein yang tidak umum dijumpai pada protein-protein fungsional lainnya di dalam sel. Protein ini berperan dalam mempertahankan kembali struktur tiga dimensi dari protein fungsional sel dari denaturasi suhu lingkungan yang bersifat ekstrim. Protein ini memiliki struktur yang tetap stabil, tahan terhadap denaturasi dan proteolisis (Kumar & Nussinov, 2001). Protein ini dapat membantu organism termofil mengembalikan

fungsi aktifitas enzimnya bila terdenaturasi oleh suhu yang tinggi (Everly & Alberto, 2000).

c. Struktur DNA Gyrase

DNA gyrase merupakan salah satu anggota kelompok enzim topoisomerase yang berperan dalam mengontrol topologi DNA suatu sel dan memegang peran penting dalam proses replikasi dan transkripsi DNA. Semua jenis topoisomerase dapat merelaksasikan DNA tetapi hanya DNA gyrase yang dapat mempertahankan struktur DNA tetap berbentuk supercoil. DNA gyrase disusun oleh 90-150 pasangan basa-N DNA. DNA gyrase ini juga selalu dijumpai pada organisma yang hidup di lingkungan di atas 70°C dan juga dapat dijumpai pada organisma yang hidup pada suhu sekitar 60°C. DNA ini merupakan salah satu kelengkapan sel dari organisma termofil (Maxwell, 1999).

2.2 Bakteri Selulolitik

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 tersebut adalah kompleks selulase. Enzim ini disintesis oleh mikroba selama tumbuh dalam media selulosa (Ibrahim dan El diwany, 2007).

Mikroba yang mampu mendegradasi selulosa kristal dapat mensekresikan kompleks selulase (Shimada dkk, 1994). Selulase dihasilkan sebagai respon terhadap

adanya selulosa pada lingkungannya. Proses ini berlangsung apabila terjadi kontak langsung antara sel bakteri dan permukaan selulosa (Busto dkk, 1995). Kemampuan biosintesis selulase dimiliki oleh banyak mikroba (Raza dan Rehman, 2008).

Mikroba penghasil selulase secara ekstraseluler tersebar pada kapang dan bakteri. Meskipun bakteri selulolitik memiliki sistem metabolisme yang berbeda dengan kapang dan sedikit sekali data tentang bakteri penghasil enzim ini, akan tetapi, umumnya diasumsikan memiliki tingkah laku yang sama (Fikrinda, 2000). Mikroba selulolitik dari kelompok bakteri memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi selulase menjadi lebih pendek. Selain itu, tingkat variasi genetik kelompok bakteri sangat beragam sehingga memungkinkan dilakukan rekayasa genetic untuk optimasi produksi maupun aktivitas selulasenya (Alam dkk, 2004). Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim yang berdeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan. Selain itu, jumlah dan komponen selulase yang dihasilkan dipengaruhi oleh jenis substrat, konsentrasi substrat, dan suhu (Aguiar, 2001).

Secara alami, bakteri dapat menghidrolisis selulosa baik secara aerob maupun anaerob, akan tetapi tidak dapat secara kedua-duanya (Lynd dkk, 2002). Bakteri selulolitik anaerob hanya tumbuh pada sumber selulosa dan produk hidrolitiknya. Bakteri ini tidak dapat tumbuh pada monosakarida, oligosakarida, dan polisakarida yang berasal dari gula lain selain glukosa (Lynd dkk, 2002). Bakteri dan kemampuannya untuk mensekresikan enzim tidak lepas dari pengetahuan dan kehendak Allah sebagaimana firmanNya dalam surat Yunus ayat 61 sebagai berikut :

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦١﴾

Artinya: kamu tidak berada dalam suatu Keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarah (atom) di bumi ataupun di langit. tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh).

Bahreisy (1988), dalam kitab tafsir Ibnu Katsir menyatakan bahwa Allah mengetahui tentang semua makhluk-Nya pada tiap saat. Tidak ada sesuatu walau seberat zarah atau lebih kecil dari itu yang luput dari jangkauan pengetahuanNya. Asy-Syuyuti dan jalaludin (1505) dalam tafsir jalalain menjelaskan bahwa yang dimaksud zarah adalah semut kecil, tidak ada yang lebih kecil dan lebih besar dari itu melainkan semua tercatat dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh). Musthofa (1942) dalam tafsir al maraghi menjelaskan bahwa yang dimaksud zarah adalah semut kecil dan segala hal yang menyerupai hal tersebut seperti halnya debu dan juga cahaya matahari.

Berdasarkan hal tersebut maka dapat disimpulkan bahwa yang dimaksud zarah adalah segala hal yang berukuran kecil yang dapat dilihat mata telanjang maupun tidak dapat dilihat mata telanjang. Salah satu contohnya adalah bakteri. Meskipun bakteri kecil dan tidak dapat dilihat oleh mata telanjang manusia tetapi tidak akan luput dari pengetahuan Allah *Subhanahu wata'ala*.

2.3 Enzim Termotabil

Enzim hidrolitik yang dihasilkan oleh mikroorganisme termofil merupakan salah satu kelompok yang menarik perhatian untuk dipelajari (Cordeiro dkk, 2002). Enzim dari mikroorganisme termofil ini memiliki nilai komersial yang cukup tinggi dalam bidang industri karena memiliki daya termotabilitas yang tinggi, stabil terhadap zat-zat yang bersifat dapat mendenaturasi enzim seperti detergen dan senyawa organik lainnya, stabil dalam kondisi lingkungan yang asam maupun alkalis, sangat cocok untuk proses fermentasi di bidang industry. Kelebihan-kelebihan ini menjadikan enzim yang berasal dari mikroorganisme termofil semakin berkembang penggunaannya dalam bidang industri dan bioteknologi (Sianturi, 2008).

Konsep tentang termotabilitas yang dimiliki oleh enzim yang berasal dari mikroorganisme termofil ini dilandaskan pada dua konsep yaitu pertama struktur molekular pada selnya yang memang tersusun oleh molekul protein yang termotabil, kedua termotabilitas itu berkaitan dengan adanya asosiasi senyawa protein enzim dengan molekul lainnya seperti lipid, polisakarida maupun protein lainnya yang menyebabkan terbentuknya suatu senyawa yang memiliki mekanisme yang memungkinkannya tetap stabil saat menghadapi kondisi yang dapat menginaktivasinya (Hibino dkk, 1974).

Faktor-faktor yang dianggap berhubungan dengan termotabilitas enzim-enzim dari mikroorganisme termofil bervariasi pada berbagai spesies termofil, namun beberapa hal umum yang ditemukan antara lain terjadinya peningkatan ikatan hidrogen dan *salt bridge* pada protein dari enzim termofilik. Selain itu ditemukan juga

adanya perbedaan jenis dan komposisi asam amino penyusun protein enzim termofil bila dibandingkan dengan protein enzim yang mesofilik. Pada enzim termofilik terjadi penurunan jumlah sistein dan serin secara nyata, sedangkan jumlah arginin dan tirosin meningkat secara nyata. Asam amino prolin juga lebih sedikit ditemukan pada struktur α -heliks pada protein termofilik (Kumar dan Nussinov, 2000).

2.4 Enzim Selulase

Enzim menurut susunan kimianya termasuk golongan protein. Enzim merupakan biokatalisator yaitu agen kimiawi yang secara selektif mempercepat reaksi tanpa ikut bereaksi. Enzim yang menolong dalam perubahan karbohidrat, lemak, protein dan beberapa zat lainnya yang terdapat di dalam medium sehingga zat-zat tersebut dapat diserap oleh mikroba, enzim ini disebut ekso-enzim. Sebaliknya, enzim-enzim yang menolong dalam pembongkaran zat makanan seperti pada peristiwa pernafasan dan fermentasi, masuk golongan endo-enzim (Dwidjoseputro, 1994).

Enzim termasuk metabolit primer. Metabolit primer merupakan produk akhir yang dihasilkan pada fase eksponensial oleh mikroba. Metabolit primer dibutuhkan untuk pertumbuhan setiap mikroba (Gandjar, 1999). Keberadaan enzim merupakan sebuah fenomena alam yang menunjukkan tanda-tanda kebesaran Allah *Subhanahu wata'ala* bagi manusia yang mau berfikir. Allah berfirman dalam surat Al-Hijr ayat 20 :

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشَةً وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ ﴿٢٠﴾

Artinya : *dan Kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, dan (Kami menciptakan pula) makhluk-makhluk yang kamu sekali-kali bukan pemberi rezki kepadanya (QS. Al-Hijr: 20).*

Asy-Syuyuti dan Jalaludin (1505) dalam tafsir jalalin menjelaskan bahwa Allah *Subhanahu wata'ala* keperluan-keperluan hidup bagi manusia berupa buah-buahan dan biji-bijian dan Allah *Subhanahu wata'ala* menjadikan makhluk-makhluk misalnya berupa hamba-hamba sahaya, binatang-binatang dan berbagai macam jenis ternak yang mana hanya Allahlah yang memberi rizki kepada mereka. Rizki yang diberikan Allah kepada makhluk ciptaan-Nya sangatlah lengkap, termasuk enzim untuk membantu memenuhi kebutuhan hidup pada tiap makhluk ciptaan Allah. Salah satu enzim tersebut adalah selulase.

Selulase merupakan kelompok enzim yang dapat mengkatalis hidrolisis ikatan β -1.4-glikosidik dalam selulosa, selodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya (Raza dan Rehman, 2008). Molekul tersebut dihidrolisis menjadi unit-unit monomer yang lebih kecil, seperti glukosa. Enzim ini mampu menghidrolisis ikatan β -1.4-glikosidik di antara residu glikosil melalui mekanisme hidrolisis asam (Lynd dkk. 2002). Struktur selulase terdiri atas satu pusat katalitik, daerah pengikatan selulosa, dan rantai terglukosilasi. Selulase diklasifikasikan menjadi tiga kelompok, yaitu endoglukanase, exoglukanase, dan glukosidase (Sinigani dan Emtiazi, 2006).

Ketiga komponen enzim tersebut bekerjasama dalam menghidrolisis selulosa yang tidak dapat larut menjadi glukosa sehingga aktivitas gabungan dari ketiga enzim tersebut dapat diukur dengan mengidentifikasi jumlah glukosa yang dihasilkannya

(Fikrinda, 2000). Endoglukanase merupakan komponen selulase yang menghidrolisis daerah amorf selulosa secara acak. Hidrolisis oleh enzim ini membentuk oligosakarida dengan panjang rantai yang berbeda-beda dan membentuk ujung rantai non-pereduksi baru (Sinigani dan Emtiazi, 2008).

Endoglukanase selalu ditemukan dalam mikroba selulolitik, baik fungi maupun bakteri. Endoglukanase menghidrolisis selodekstrin dan turunan selulosa lain, seperti *carboxymethylcellulose* (CMC). Enzim ini memiliki aktivitas yang tinggi terhadap substrat CMC sehingga disebut pula dengan CMCase. Eksoselobiohidrolase (eksoglukanase) adalah komponen enzim yang produk hidrolisis utamanya adalah selobiosa. Enzim ini memecah selulosa dengan cara menghilangkan ujung akhir gugus selobiosa pada rantai selulosa (Raza dan Rehman, 2008). Eksoglukanase memiliki aktivitas tinggi dalam menghidrolisis selulosa kristal tetapi sangat rendah pada selulosa amorf (Sinigani dan Emtiazi, 2006).

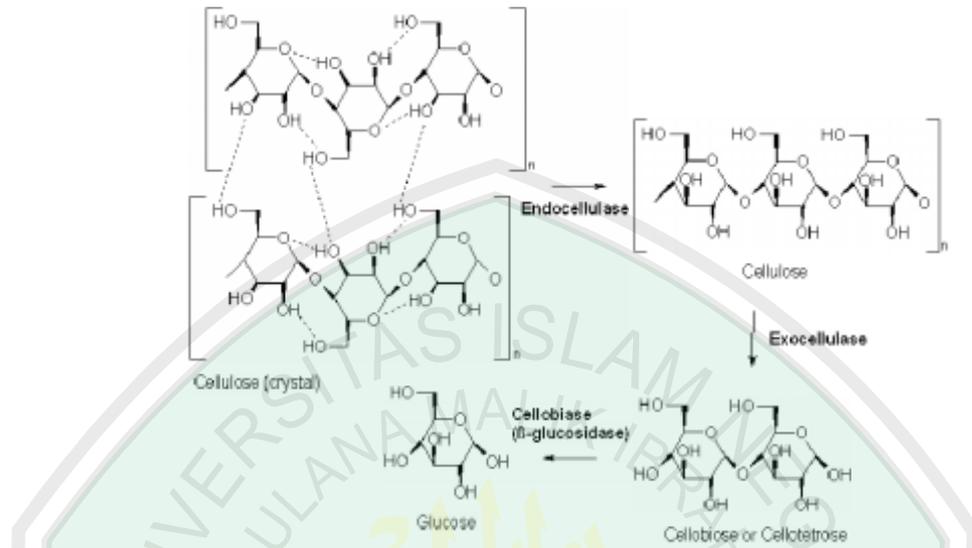
Selobiohidrolase juga memiliki kemampuan dalam menghidrolisis selotriosa maupun selotetraosa yang merupakan hasil kerja endoglukanase. Kerja sama endoglukanase dan eksoglukanase dapat menghasilkan hidrolisis selulosa yang optimum (Fikrinda, 2000). β -glukosidase merupakan komponen selulase yang memutuskan unit glukosa secara spesifik dari ujung nonpereduksi dari selooligosakarida (Sinigani dan Emtiazi, 2006).

Enzim ini tidak menghidrolisis CMC atau selulosa tetapi menghidrolisis selooligosakarida, pNPG, dan selobiosa menjadi glukosa. Komponen enzim ketiga dari selulase ini, bertugas dalam mengatur seluruh proses selulolitik dan merupakan

enzim terpenting meskipun tidak beraksi secara langsung dalam menghidrolisis selulosa. Hal tersebut dikarenakan kemampuan enzim ini dalam menghidrolisis selobiosa yang merupakan penghambat bagi aktivitas endoglukanase dan eksoglukanase dalam menghidrolisis selulosa (Fikrinda dkk, 2000).

Efektivitas biokonversi selulosa tergantung dari sumber selulase, jenis substrat selulosa, dan kondisi optimum untuk produksi dan aktivitas enzim (Alam dkk. 2004). Aktivitas total selulase ditentukan dari aktivitas campuran enzim yang menghidrolisis bahan yang mengandung selulosa dan menghasilkan produk akhir berupa glukosa. Aktivitas ini menggambarkan pengaruh dari kerja ketiga enzim yang berbeda dan pengaruh hambatan dari produk akhir. Secara umum, hidrolisis selulosa oleh kompleks selulase terbagi ke dalam tiga tahapan utama.

Tahap pertama dilakukan oleh enzim endoglukanase. Enzim ini menyerang daerah amorf dari selulosa secara acak dan membentuk ujung-ujung nonpereduksi yang akan memudahkan kerja eksoglukanase. Tahapan selanjutnya dilakukan oleh eksoglukanase yang menghidrolisis daerah kristal dari selulosa dengan melepaskan selobiosa. Selobiosa akan dihidrolisis oleh β -glukosidase menghasilkan glukosa (Raza dan Rehman, 2008). Lihat gambar 1.



Gambar 1. Reaksi Kimia tahap-tahap hidrolisis selulosa(Pikukuh,2014)

2.5 Pemanfaatan Selulase

Selulase dalam industri kertas digunakan sebagai *biopulping* dan *biobleaching*. Selulase dapat memperhalus bubur kertas, membantu proses pemutihan (*bleaching*) sehingga kertas lebih putih, dan memperkuat serat kertas sehingga permukaannya menjadi lebih halus. Sebelumnya, proses tersebut dilakukan secara konvensional menggunakan bahan kimia, seperti klorin dan klorin dioksida sebagai agen pemutih. Proses tersebut dapat menghasilkan sekitar 95 % limbah cair yang dapat mencemari lingkungan (Andrade dkk, 1999).

Selulase berperan dalam proses *deinking*, yaitu penghilangan tinta agar memperoleh serat kertas yang baik pada pembuatan kertas daur ulang. Proses ini secara konvensional dilakukan dengan menggunakan natrium hidroksida, hidrogen peroksida, agen pengkelat, dan natrium silikat. Penggunaan bahan-bahan kimia

tersebut dapat mencemari lingkungan karena mempengaruhi nilai BOD dan COD air (Rismijana dkk, 2002). Penggunaan selulase pada industri tekstil berfungsi menjaga warna kain agar tetap cemerlang (Ibrahim dan El-diwany, 2007).

Selulase juga berperan sebagai pembersih komponen tumbuhan pada proses akhir pembuatan wol. Selulase dapat berikatan secara kuat dan selektif pada molekul selulosa sehingga dimanfaatkan sebagai agen pembawa bahan pelembut (*softener*) menuju serat kain pada industri detergen. Industri minuman (jus buah-buahan) menggunakan selulase untuk meningkatkan perolehan jus lebih banyak karena selulase dapat menguraikan sari-sari buah yang masih terperangkap dalam buah (Heaton, 2004). Salah satu peran selulase yang terpenting adalah biokonversi selulosa menjadi berbagai senyawa kimia yang bermanfaat. Selulosa memegang peranan yang sangat potensial sebagai sumber serat, energi, dan makanan (Baig dkk, 2004).

Senyawa ini baru dapat dimanfaatkan setelah mengalami pengolahan yang optimal dengan memanfaatkan selulase. Selulase mampu menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Glukosa dapat ditransformasi menjadi etanol, butanol, aseton, protein sel tunggal, dan metan (Fikrinda dkk, 2000). Selain itu, hidrolisis selulosa dan hemiselulosa dengan selulase dapat meningkatkan efisiensi limbah pertanian sebagai bahan pakan dan dapat mengurangi dampak negatif dari polusi limbah terhadap lingkungan (Sari, 2008).

2.6 Mikroorganisme Penghasil Enzim Selulase Ekstraseluler

Mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim selulase ekstraseluler tersebar dalam kapang dan bakteri. Wahyuningtyas dkk (2013) berhasil melakukan

studi produksi enzim selulase dari kapang *Trichoderma reesei* dengan kondisi optimal produksi enzim selulase diperoleh pada perlakuan suhu 35°C, pH 6, dan waktu inkubasi 8 hari dengan aktivitas enzim mencapai 1,0313 U/mL.

Beberapa bakteri selulolitik termofilik telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi. (Ibrahim dan El-diwany, 2007), telah mengisolasi bakteri selulolitik termofilik yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 75°C dari kawah air panas Egyptian, pantai laut merah dengan aktivitas enzim mencapai 65,56 U/mL. (Fikrinda dkk, 2000), mengisolasi bakteri selulolitik yang mampu tumbuh pada suhu 60-70°C dari ekosistem air hitam Kalimantan Tengah, ditemukan 30 isolat dengan 13 isolat termofil dengan ratio zona bening terbesar yaitu 58,00.

Mariyandinin dkk (2009) berhasil mengisolasi 31 isolat bakteri selulolitik dari tanah pertanian dan terdapat 8 isolat yang mampu tumbuh pada suhu 50°C dengan aktivitas enzim maksimum 7,84 U/mL. Sumardi dkk (2009) berhasil mengisolasi *Bacillus* penghasil enzim selulase dari saluran pencernaan ayam kampung, dihasilkan 47 isolat dengan 4 isolat bakteri berzona bening mencapai 480 mm.. Alam dkk (2013) berhasil melakukan isolasi bakteri selulolitik termofilik dari kompos pertanian Desa Bayat, Klaten, Jawa Tengah. Penelitian tersebut menghasilkan 2 isolat bakteri dengan aktifitas maksimum pada suhu 50°C. Hartanti (2010) berhasil melakukan isolasi bakteri selulolitik termofilik dari kawah air panas Gunung Pancar, Bogor, dan didapatkan 8 isolat yang menghasilkan zona bening dengan besar diameter zona bening terbesar yaitu 20 mm.

2.7 Identifikasi Spesies Bakteri Menggunakan *Microbact*

Salah satu cara pengidentifikasian mikroorganisme yaitu dengan menganalisa kemampuan metabolismenya dengan menggunakan suatu metode uji biokimia. Uji biokimia yaitu meliputi kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan berbagai jenis sumber karbon dan senyawa kimia lainnya. Uji biokimia yang beragam dan semakin banyak jenis senyawa pengujian maka akan menghasilkan pengidentifikasian yang spesifik hingga tingkat spesies (Buckle dkk, 1987).

Kit *Microbact* 12E dan *Microbact* 12B adalah sistem identifikasi komersial untuk bakteri secara umum dan bakteri Gram negatif dan Gram positif golongan enterobacter. *Microbact* 12E untuk bakteri Gram negatif dan *Microbact* 12B untuk bakteri Gram positif. Tes ini terdiri dari 12 substrat biokimia yang berbeda, tes ditempatkan di sumur *microbact*. Pengujian dengan menggunakan *Microbact* akan mempermudah metode pengidentifikasian suatu mikroorganisme. *Microbact* mempunyai sistem yang dirancang untuk mengidentifikasi bakteri dengan komposisi substrat dan pereaksi yang telah distandarisasi. Pengujian dengan *Microbact* memiliki beberapa ketentuan sebelum dilakukan pengujian, yaitu sampel isolat yang digunakan merupakan isolat yang telah dimurnikan dan dilarutkan ke dalam garam fisiologis (Oxoid, 2004).

Prinsip kerja dari *Microbact* yaitu dengan mereaksikan suspensi isolat ke dalam sumur-sumur yang telah berisi sumber karbon dan senyawa-senyawa biokimia lain yang berjumlah 12 jenis. Suspensi bakteri yang dilarutkan ke dalam garam fisiologis ditambahkan ke masing-masing 12 sumur uji biokimia yang tersedia.

Setelah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C reagen yang sesuai ditambahkan dan perubahan warna tes pada tiap sumur yang berbeda dicatat. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan table warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*. Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*). Nama bakteri dilihat dengan komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat (Oxoid, 2004).

2.8 Penentuan Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai suatu jumlah enzim yang dapat menyebabkan perubahan atau transformasi substrat sebanyak 1 mikromol per menit pada suhu dan lingkungan optimal selama pengukuran aktivitas berlangsung. Secara umum aktivitas enzim itu dinyatakan dalam satuan unit (U), besarnya setara dengan 16,67 nkat/mL (Dybkaer, 2001).

Aktivitas enzim selulase dihitung berdasarkan data kadar glukosa relatif sebagai 1 mg glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL filtrat kasar selulase. Satu Unit aktifitas enzim didefenisikan sebagai banyaknya 1 μmol glukosa yang dihasilkan dari hidrolisa media oleh 1 mL ekstrak kasar enzim selulase selama masa inkubasi. Untuk melihat besarnya satu unit aktifitas enzim tersebut digunakan rumus (Kombong, 2004):

$$AE = \frac{C}{BM \text{ glukosa} \times t} \times \frac{H}{E} \dots\dots\dots (2.1)$$

Keterangan:

- AE = Aktifitas enzim (Unit/mL)
- C = Konsentrasi glukosa
- BM = Berat Molekul Glukosa = 180 g/mol
- t = Waktu Inkubasi (menit)
- H = Volume total enzim-substrat (mL)
- E = Volume enzim (mL)

Metode kuantitatif yang dapat digunakan dalam uji aktivitas selulase adalah dengan mengamati kadar gula tereduksi yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim terhadap substrat. Dari berbagai cara uji aktivitas selulase yang paling sering digunakan dalam penelitian adalah dengan menggunakan metode dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) atau Somogy-Nelson (Somogy, 1952).

Glukosa mudah didestruksi oleh oksidasi pereaksi basa yang digunakan pada pereaksi DNS. Metode Somogy-Nelson memiliki kekurangan pada perlakuan analisis yang lama dan lebih rumit (tidak nyaman) serta tingkat bahaya racunnya lebih tinggi bila dibandingkan dengan metode DNS (Muawanah, 2006).

Komponen pereaksi DNS adalah asam dinitrosalisilat, garam *rochelle* (KNa-Tartrat), fenol, sodium bisulfit, dan natrium hidroksida. Komponen-komponen tersebut memiliki fungsi, yaitu asam 3,5-dinitrosalisilat untuk mereduksi glukosa dalam keadaan basa yang dibantu oleh natrium hidroksida, garam *rochelle* untuk menghilangkan pengaruh senyawa yang mengganggu sehingga kompleks warna tetap stabil, fenol berfungsi untuk stabilisasi warna yang terbentuk, dan sodium bisulfit

untuk menghilangkan pengaruh oksigen terlarut yang dapat mengoksidasi glukosa produk (Miller, 1959).

2.9 Sumber Air Panas Pacet Mojokerto

Manifestasi panas bumi di permukaan adalah sebagai indikasi adanya aktifitas panas bumi di bawah permukaan tersebut. Bentuk manifestasi aktifitas panas bumi di dalam perut bumi itu dapat berupa munculnya mata air panas, munculnya bualan gas ke permukaan tanah, fumarola, solfatara dan tanah panas. Mata air panas yang muncul ke permukaan ini dapat mengandung klorida, bikarbonat ataupun sulfat (Sianturi, 2008).

Sumber air panas meskipun memiliki suhu cukup tinggi ternyata dapat dijadikan untuk lingkungan tempat kehidupan bagi beberapa mikroorganisma yang tahan terhadap suhu air yang panas tersebut, seperti bakteri, fungi maupun alga yang bersifat termofil. Sumber air panas selain memiliki air yang suhunya cukup tinggi juga memiliki suatu aroma khas yaitu berupa aroma hydrogen peroksida (H_2S) yang berasal dari aktifitas bakteri anaerob yang menggunakan senyawa-senyawa sulfur (Sianturi, 2008).

Sumber mata air panas Ubalan Pacet terletak di kawasan wisata Ubalan di daerah pegunungan di Desa Padusan Kecamatan Pacet Kabupaten Mojokerto Propinsi Jawa Timur Indonesia. Berada pada ketinggian 800 mdpl di bawah kaki gunung Welirang, suhu rata-rata $20^{\circ}C$ dengan curah hujan rata-rata 3.000mm/tahun. Jarak dari Kabupaten Mojokerto sejauh 30 km dan kota Batu 29 km. Lokasi ini tepatnya

terletak pada $7^{\circ},41',8.0''$ LS dan $112^{\circ},32',52.35''$ LT (Anonimous, 2014). Berdasarkan observasi sumber air panas disini memiliki suhu air $40^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$ dan pH netral 6,8-7.

