

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri Selulolitik Termofilik Dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto

Isolasi bakteri dari sumber air panas Pacet Mojokerto dilakukan dengan media selektif yaitu *Carboxil Methyl Cellulosa* (CMC), sebagai media untuk menyeleksi bakteri yang mampu menghasilkan enzim selulase. Sampel air diambil dari sumber air panas menggunakan termos air panas untuk menjaga suhu air. Air panas kemudian diambil 5 mL untuk dimasukkan ke dalam media CMC broth 45 mL (pengenceran 10^{-1}), diinkubasi dalam inkubator suhu 50°C selama 24 jam, selanjutnya dilakukan pengenceran mulai dari 10^{-2} sampai 10^{-10} . Pengenceran dilakukan untuk mengurangi kepadatan koloni yang tumbuh pada media isolasi sehingga memudahkan proses isolasi. Pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-10} ditanam ke dalam media CMC agar dengan metode tuang (*pour plate*) dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengamatan morfologi koloni masing-masing isolat bakteri yang diamati yaitu meliputi karakterisasi bentuk, tepi, elevasi dan warna koloni dari tiap-tiap koloni. Koloni tersebut kemudian dimurnikan dengan metode *streak kuadran* pada media agar miring dan diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 50°C . Koloni murni yang diperoleh digunakan sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya.

Berdasarkan hasil isolasi yang telah dilakukan maka didapatkan 8 isolat mampu tumbuh dan berkoloni pada media CMC agar. Isolat yang tumbuh dari hasil isolasi dari air panas Pacet Mojokerto dengan media CMC agar dikarakterisasi

morfologi pada masing- masing koloni yang meliputi bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni dan warna koloni. Menurut Dwijoseputro (2005), pengamatan makroskopis morfologi koloni meliputi karakteristik bentuk koloni (dilihat dari atas), permukaan koloni (dilihat dari samping), tepi koloni (dilihat dari atas) dan warna koloni bakteri. Hasil isolasi bakteri yang dilakukan dengan menggunakan media *Carboxil Methyl Cellulosa* (CMC) agar diperoleh 6 isolat yang memiliki karakteristik koloni yang berbeda satu sama lain setelah dilakukan tahap pemurnia (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Karakter Morfologi Koloni Bakteri dari Air Panas Pacet Mojokerto

No	Kode Isolat	Morfologi Koloni			
		Bentuk	Permukaan	Tepi	Warna
1	PS 1	Tak teratur	Rata	Bergerigi	Kekuning-kuningan
2	PS 2	Tak teratur	Rata	Berombak	Kekuning-kuningan
3	PS 3	Bulat	Rata	Bergerigi	Kekuning-kuningan
4	PS 4	Bulat	Rata	Utuh	Keputih-putihan
5	PS 5	Bulat	Rata	Berombak	Keputih-putihan
6	PS 6	Bulat	Rata	Utuh	Kecoklatan tepi putih
7	PS 7	Bulat	Rata	Bergerigi	Keputih-putihan dengan tengah coklat
8	PS 8	Bulat	Rata	Utuh	Keputih-putihan tengah coklat

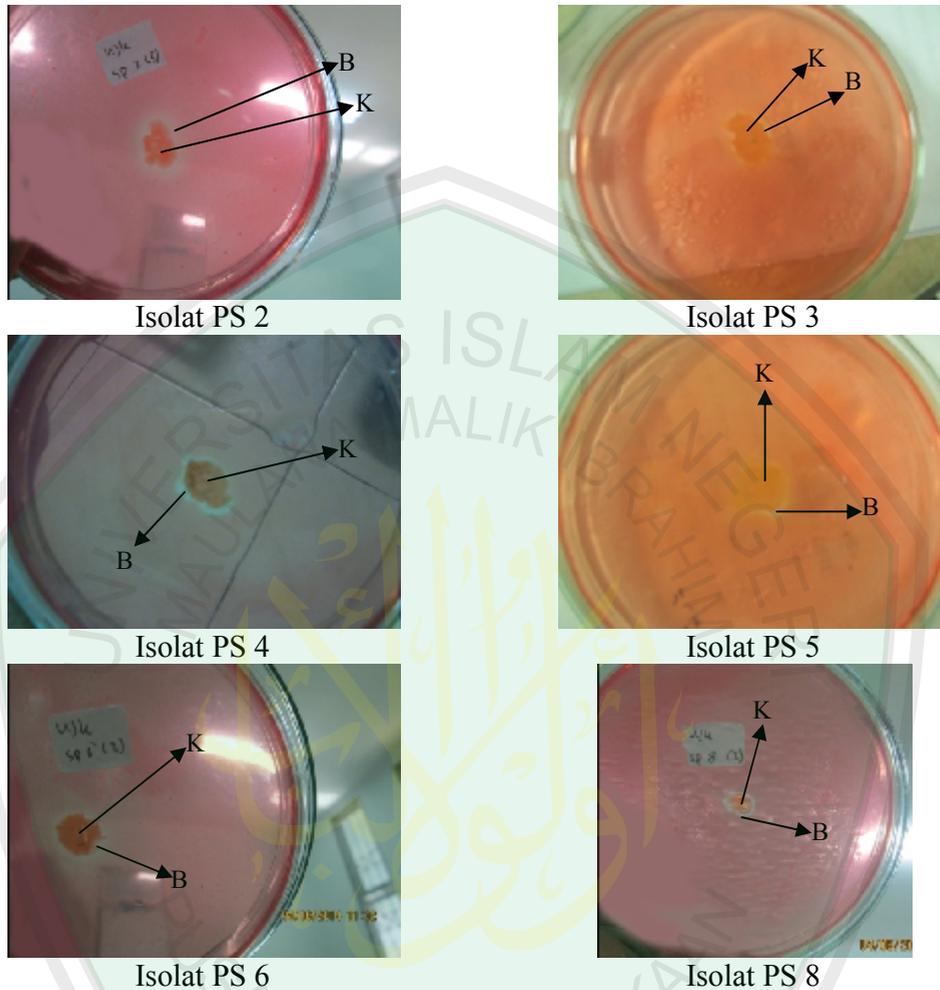
Hasil pengamatan morfologi koloni bakteri secara makroskopis pada media CMC agar tampak sebagian besar koloni bakteri berbentuk bulat dan sebagian kecil berbentuk tak teratur, permukaan morfologi pada semua bakteri berbentuk rata, tepi koloni sebagian besar berciri utuh dan yang lain berciri berombak dan bergerigi, morfologi bakteri memiliki ciri warna yang bervariasi ada yang keputih-putihan, ada yang kekuning-kuningan, dan coklat. Dwijoseputro (2005) menyebutkan pengamatan makroskopis karakteristik morfologi koloni pada media pertumbuhan bakteri yaitu bentuk koloni berupa bulat (circular), berbenang (filamentous), tak teratur (irregular), serupa akar (rhizoid), dan serupa kumparan (spindle). Permukaan koloni berupa rata (flat), timbul datar (raised), melengkung (convex), dan membukit. Tepi koloni dapat berupa utuh (entire), berombak (undulate), berbelah (lobate), bergerigi (serrate), berbenang (filamentous), keriting (curled) dan warna koloni bakteri berupa keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.

Berdasarkan karakterisasi morfologi koloni bakteri di atas maka dapat diketahui bahwa terdapat 8 isolat yang memiliki ciri-ciri yang berbeda. Seleksi bakteri yang dilakukan berdasarkan perbedaan dari masing-masing morfologi koloni bakteri tersebut, tetapi isolat PS 1 dan isolat PS 7 setelah diremajakan tidak dapat tumbuh lagi pada media CMC agar, ini mungkin diakibatkan oleh matinya isolat tersebut jadi tinggal 6 isolat yang didapatkan. 6 isolat tersebut selanjutnya dilakukan uji kualitatif bakteri selulolitik.

4.2 Uji Bakteri Penghasil Selulase secara Kualitatif

Berdasarkan hasil seleksi bakteri maka didapatkan 6 isolat yang berbeda yang akan diuji kemampuan enzim selulasenya secara kualitatif. Uji bakteri selulolitik (penghasil selulase) secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim selulase. Coughlan (1991) menyatakan bahwa analisis kualitatif aktivitas bakteri selulolitik dapat dilakukan pengukuran zona bening yang terbentuk disekitar koloni. Perez dkk (2002) menyatakan pembentukan zona bening menunjukkan bahwa selulosa yang terdapat didalam media dihidrolisis oleh enzim selulase menjadi senyawa sederhana yaitu selobiosa yang kemudian disederhanakan menjadi dua molekul glukosa.

Uji bakteri selulolitik secara kualitatif (*screening*) menggunakan media padat *Carboxil Methil Cellulosa* (CMC agar) dengan metode inokulasi. Pengujian adanya aktivitas selulolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening pada media CMC agar setelah diberi pewarna *congo red*. *Congo red* berinteraksi kuat dengan ikatan β -1,4-glikosidik dalam CMC. Zona bening yang terbentuk dapat dilihat dengan pencucian menggunakan NaCl 1 M. *Congo red* merupakan garam natrium dari benzidinediazo-bis-1-naphthylamine-4 asam sulfonat ($C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$) sehingga pewarna ini akan larut dan tercuci oleh garam natrium lain, seperti NaCl. Dengan demikian, zona bening yang terbentuk akan tampak jelas. Uji *screening* bakteri selulolitik adalah perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni atau pengurangan antara diameter koloni dan diameter zona bening (Sudiana dkk, 2002).



Gambar 4.1. Hasil uji aktivitas enzim selulase secara kualitatif pada isolat bakteri dari sumber air panas Pacet Mojokerto Keterangan : K: Koloni bakteri dan B: Zona Bening

Uji bakteri selulolitik secara kualitatif dengan CMC agar dilakukan pada 6 isolat bakteri yang telah berhasil diisolasi sebelumnya, dari hasil pengujian didapatkan 6 isolat yang mempunyai aktivitas selulolitik berupa visualisasi zona bening disekitar koloni. Pada Gambar 4.1 dapat dilihat bahwa 6 isolat tersebut memiliki lebar zona bening yang hampir sama besar. Tapi terlihat bahwa isolat PS 4 memiliki lebar zona bening yang sedikit lebih lebar dari pada isolat-isolat yang lain

Berdasarkan tingginya diameter zona bening dari masing-masing koloni bakteri setelah diukur menggunakan penggaris maka dapat diketahui bahwa isolat PS 4 memiliki diameter tertinggi yaitu 30 mm. Isolat-isolat lainnya memiliki kisaran ratio dibawah PS 4 tapi tidak terlampau jauh selisihnya. Setelah Isolat PS 4 menyusul Isolat PS 2, Isolat PS 3, Isolat PS 6, Isolat PS 8 dan Isolat PS 5 yang memiliki lebar diameter zona bening masing-masing 27 mm, 24 mm, 20 mm, 20 mm dan 17 mm (Tabel 4.2). Hartanti (2010) berhasil mengisolasi bakteri selulolitik termofilik dari mata air panas gunung Pancar Bogor dengan lebar diameter zona bening terbesar yaitu 11 mm dan Sari (2012) dari sungai medan kirinci Jambi sebesar 13 mm.

Tabel 4.2 Hasil Pengujian dan Pengukuran Zona bening bakteri selulolitik secara kualitatif

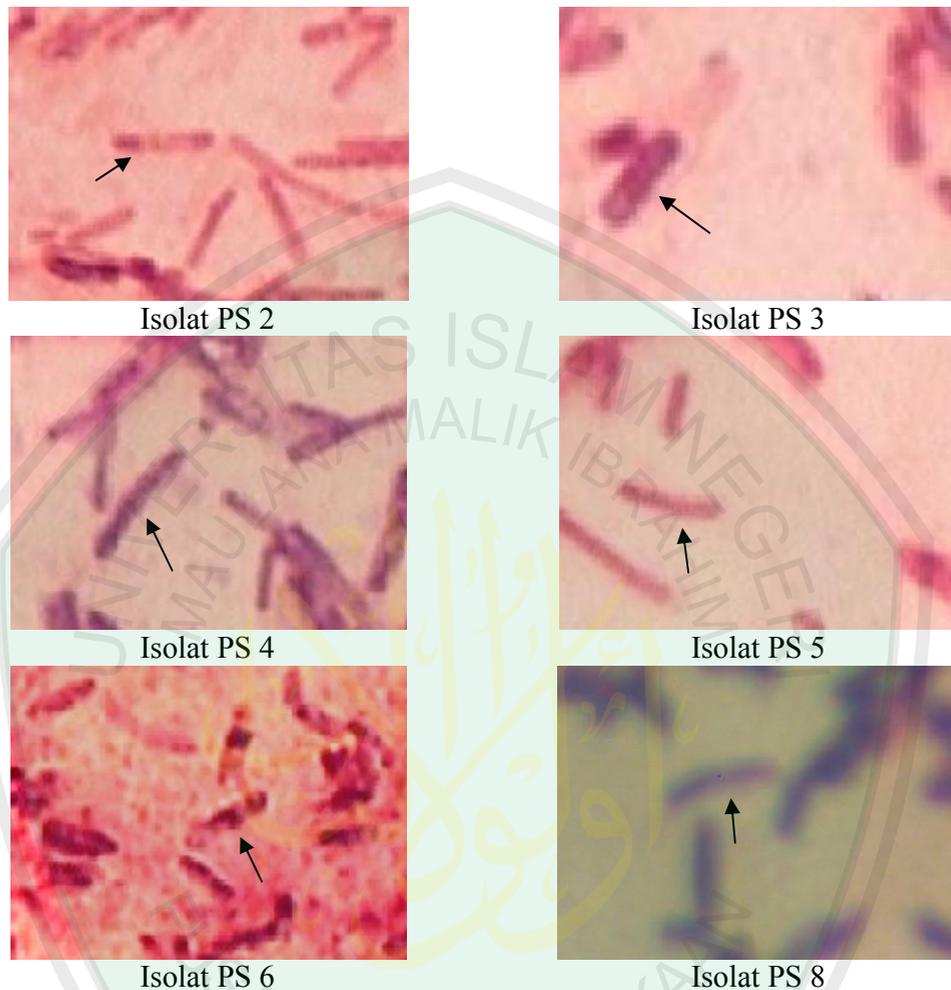
No	Kode Isolat	Diameter Zona Bening (mm)
1.	PS 2	27
2.	PS 3	24
3.	PS 4	30
4.	PS 5	17
5.	PS 6	20
6.	PS 8	20

4.3 Karakterisasi Sel Bakteri Selulolitik Termofilik Secara Mikroskopis dengan Pewarnaan Gram

Isolat bakteri yang menghasilkan zona bening selanjutnya dilakukan karakterisasi mikroskopis pada selnya. Karena bakteri merupakan kelompok

prokariotik yang belum memiliki organel-organel sel yang kompleks sehingga terdapat perbedaan struktur dinding sel bakteri yang dimasukkan dalam 4 kategori umum yaitu bakteri gram positif dan negatif yang mempunyai dinding sel, berdinding sel tidak sempurna dan archaeobacteria(Holt dkk, 1994). Sehingga pengidentifikasian dari masing-masing karakter sel bakteri yang mengacu pada buku pedoman Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ada beberapa macam pengujian. Diantaranya yaitu pengamatan bentuk sel, pengecatan gram, pewarnaan endospora dan pengujian katalase. Pengujian tersebut merupakan pengujian dasar dalam penggolongan jenis bakteri. Dalam penelitian ini pengujian yang digunakan untuk pengamatan mikroskopis sel hanya pengecatan gram karena pengidentifikasian spesies isolat bakteri menggunakan *Microbact*.

Pewarnaan Gram merupakan proses penentuan karakter sel isolat berdasarkan perbedaan dari struktur dari dinding sel bakteri. Ada dua macam yaitu dinding sel bakteri gram positif dan negatif. Dinding sel bakteri gram positif ditunjukkan warna ungu pada sel dan gram negatif ditunjukkan warna merah pada sel. Semua isolat yang didapatkan dari proses isolasi diwarnai dengan melakukan pewarnaan gram. Pengujian gram menunjukkan gram positif pada semua isolat bakteri selulolitik hasil isolasi dari sumber air panas Pacet Mojokerto(Tabel 4.3). Pada Gambar 4.2 dapat dilihat semua isolat bakteri selnya memiliki warna ungu dan sel berbentuk basil.



Gambar 4.2. Hasil Pewarnaan Gram pada Bakteri Selulolitik Termofilik yang diisolasi dari air panas Pacet Mojokerto.

Perbedaan sifat gram negatif dengan warna merah pada sel bakteri dan gram positif dengan warna ungu pada sel didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Pelzar dan Chan (2009) menyatakan bakteri gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi seperti lemak dalam persentasi yang lebih tinggi dari pada yang dikandung bakteri gram positif. Kandungan lipid bakteri gram negatif mencapai 11-22% sedangkan kandungan lipid bakteri gram positif hanya 1-4%. Dinding sel

bakteri gram negatif juga tipis hanya 10-15 nm sedangkan dinding sel bakteri gram positif lebih tebal yaitu 15-80 nm. Perlakuan dengan alkohol terhadap bakteri gram negatif menyebabkan terekstraksinya lipid sehingga memperbesar daya rembes atau permeabilitas dinding sel gram negatif. Jadi kompleks ungu kristal-yodium yang telah memasuki dinding sel selama langkah awal dalam proses pewarnaan dapat diekstraksi. Karena itu organisme gram negatif kehilangan warna tersebut. Karena kandungan lipidnya yang lebih rendah, dinding sel bakteri gram positif menjadi terdehidrasi selama perlakuan dengan alkohol. Ukuran pori-porinya mengecil, permeabilitasnya berkurang, dan kompleks ungu kristal-yodium tidak dapat terekstraksi.

Tabel 4.3. Hasil Pewarnaan Gram pada isolat bakteri selulolitik termofilik hasil isolasi dari air panas Pacet Mojokerto

No	Nama Isolat	Hasil	Bentuk
1	PS 2	+	Basil
2	PS 3	+	Basil
3	PS 4	+	Basil
4	PS 5	+	Basil
5	PS 6	+	Basil
6	PS 8	+	Basil

Bakteri gram positif maupun gram negatif akan dihasilkan warna yang sama (ungu), akan tetapi jumlah kristal violet yang diserap oleh bakteri gram negatif lebih

sedikit, karena tebal dinding sel bakteri gram negatif sebesar 2-7 nm tersusun dari peptidoglikan dan memiliki membrane luar dengan tebal 7-8 nm sehingga jika dibandingkan dengan bakteri gram positif yang memiliki dinding sel sebesar 20-80 nm, gram negatif jauh lebih kecil (Prescott dkk, 1999). Bakteri gram negatif dengan lapisan peptidoglikan yang tipis menyebabkan permeabilitas membran sel lebih besar sehingga kristal yodium yang berfungsi sebagai penguat warna menjadi mudah terlepas, adapun kadar lipid yang tinggi akan mudah larut selama pencucian dengan alkohol dan menyebabkan pori-pori membran sel membesar (Strohl dkk, 2001).

Bakteri gram negatif menghasilkan warna merah, dengan tebal peptidoglikan bakteri gram negatif hanya sebesar 2-7nm dan memiliki membran luar dengan tebal 7-8nm yang terdiri dari lipid, protein, dan lipopolisakarida yang berakibat pada banyaknya kristal violet yang di serap oleh bakteri gram negatif lebih kecil. Kristal iodine yang terjebak pada polisakarida peptidoglikan (dinding sel bakteri) yang semakin menambah pekat warna ungu. Ketika ditambah alkohol, maka banyak kristal violet dan iodine yang lepas, itu disebabkan karena tebal peptidoglikan bakteri gram negatif hanya sebesar 2-7nm. Sehingga ketika ditambahkan safranin, dengan mudah membentuk ikatan ion dengan dinding sel bakteri membentuk warna safranin (merah) (Prescott, 1999).

4.4 Identifikasi Isolat Bakteri Selulolitik dengan Mikrobact 12A/E

Berdasarkan perbedaan karakteristik koloni, morfologi sel dan zona bening yang dihasilkan maka terpilih empat isolat bakteri selulolitik termofilik yang dilakukan pengujian lanjutan identifikasi bakteri dengan menggunakan *Mikrobact 12*

A/E. Penggunaan test ini memungkinkan dilakukannya identifikasi bakteri sampai tingkat spesies. Evaluasi hasil identifikasi dilihat melalui sumur-sumur *Mikrobact*, positif atau negatifnya dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *patient record*. Bakteri yang diidentifikasi semua termasuk dalam golongan bakteri gram positif jadi nama spesies bakteri dilihat dengan mencocokkan hasil tes dengan bagan dibuku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th*.

Isolat bakteri dalam pegujian ini ditentukan jenis gram dari isolat bakteri tersebut, bila termasuk gram negatif maka hasil uji *microbact* langsung dimasukan dalam software *microbact* dan bila termasuk gram positif maka hasil pengujian *microbact* dijadikan rujukan dalam penelusuran bagan identifikasi spesies di buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th*. Bagan pengidentifikasian spesies bakteri bisa dilihat di lampiran 6.

Berdasarkan hasil identifikasi maka isolat bakteri PS 2 dan PS 3 teridentifikasi sama sebagai spesies *Bacillus megaterium*, isolat bakteri PS 4 teridentifikasi sebagai spesies *Bacillus stearothermophilus* dan isolat bakteri PS 8 teridentifikasi sebagai spesies *Bacillus laterosporus*. Menurut Holt (1994) bakteri termasuk dalam genus *Bacillus* apabila berbentuk batang, diameter tidak kurang dari 2,5 μm , tidak berfilamen, memproduksi atau tidak memproduksi endospora, motil, gram positif, aerob, katalase positif, mampu memfermentasi nitrate dan oxidase positif.

4.4.1 Identifikasi *Bacillus megaterium*

Isolat terpilih dari hasil uji aktifitas enzim kemudian dilakukan identifikasi secara biokimia dengan *Mikrobact 12A/E*. Pada identifikasi isolat bakteri yang tumbuh pada media CMC menunjukkan hasil sama untuk isolat PS 2 dan isolat PS 3 yaitu teridentifikasi sebagai spesies *Bacillus megaterium* (Tabel 4.6). Klasifikasi bakteri *Bacillus megaterium* yang ditemukan pada sumber air panas Pacet Mojokerto sebagai berikut (Holt, 1994):

Kingdom : Monera

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Ordo : Bacillales

Family : Bacillaceae

Genus : *Bacillus*

Spesies : *Bacillus megaterium*

Bentuk sel genus *Bacillus* adalah batang pendek dan lurus, berukuran antara 0,5-0,25 x 1,2-10 μm , dan golongan bakteri ini termasuk gram positif dan bersifat motil karena mempunyai flagel diseluruh bagian selnya. Endospora berbentuk oval atau berbentuk silindris sangat resisten teradap perubahan lingkungan. Golongan bakteri ini bersifat aerob atau fakultatif anaerobic, mempunyai kemampuan fisiologis tahan terhadap panas, pH dan salinitas. Bakteri ini dapat melakukan metabolisme fermentasi karbohidrat dan katalase positif (Holt, 1994).

Tabel 4.4. Hasil Identifikasi Bakteri Isolat PS 2 dan isolat PS 3

Jenis Tes	Hasil	Identifikasi spesies
Bgp	Positif	<i>Bacillus megaterium</i>
Spora	Positif	
Ferment Gula-Gula		
Glukosa	Positif	
Xylosa	Positif	
Mannitol	Positif	
Laktosa	Negatif	
Sukrosa	Positif	
Maltosa	Positif	
Arabinosa	Positif	
Suhu Pertumbuhan		
25° c	Positif	
37° c	Positif	
40° c	Positif	
45° c	Positif	
Tumbuh Di		
Nutrient Broth	Positif	
Mca	Negatif	
Tsi	A/A,H2s-	
Citrat	Negatif	
Indol	Negatif	
Mr	Negatif	
Vp	Negatif	
Nacl 7%	Positif	
Motilitas	Positif	
Starch Hydrolysis	Negatif	
Penicillin	Sensitiv	
Beta-Hemolisa	Positif	
Katalase	Positif	
Oksidase	Positif	
Reduksi Nitrat	Negatif	
Reduksi Methylene Blue	Negatif	

Berdasarkan hasil identifikasi mikroskopis sel bakteri ini termasuk bakteri Gram positif yang berbentuk batang. *Bacillus megaterium* adalah bakteri yang memproduksi endospora dalam siklus hidupnya. Isolat bakteri ini mempunyai endospora *terminal*, yaitu endospora yang letaknya di tengah sel. Menurut Pelczar (2010), bakteri yang mampu membentuk endospora dapat tumbuh dan bereproduksi selama banyak generasi sebagai sel vegetatif.

Pada uji fermentasi gula-gula, bakteri *Bacillus megaterium* terbukti mampu memfermentasi glukosa, xyloza, mannitol, sukrosa, maltose dan arabinosa. Selain itu dalam uji enzim, bakteri *B. megaterium* positif terhadap uji katalase dan oksidase. Uji karakteristik biokimia bakteri *B. megaterium* pada uji *Voges Proskauer* (VP) menunjukkan hasil negatif. Badjoeri (2007) menyatakan bakteri *B. megaterium* mempunyai enzim katalase, mampu menghemolisis darah, memfermentasi senyawa arabinosa, glukosa dan mannitol dan membentuk asam dari glukosa. Norman (2005) menambahkan bahwa hasil positif pada uji *Voges Proskauer* (VP) menunjukkan bahwa bakteri mampu mengkonversi glukosa menjadi asetonin dan juga mampu menghidrolisis triptofan dengan memanfaatkan enzim triptophanase. Selain itu menurut Madigan (2005) jenis ini memiliki sel berbentuk batang dan bersifat Gram positif, bergerak dengan menggunakan flagel dan dapat membentuk endospora apabila hidup pada lingkungan yang ekstrim. Berdasarkan tempat hidupnya bakteri *Bacillus megaterium* merupakan bakteri yang banyak ditemukan dalam tanah dan air

Bacillus megaterium dalam penelitian ini memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulase. Hal tersebut selaras dengan temuan Shakoork (2013) yang telah

mengidentifikasi isolat temuannya dari sayur-sayuran sebagai *Bacillus megaterium*. *B. megaterium* tersebut memiliki suhu dan pH pertumbuhan optimum 45°C dan 7.

4.4.2 Identifikasi *Bacillus stearothermophilus*

Berdasarkan hasil identifikasi spesies dengan *Mikrobact 12A/E*, isolat PS 4 teridentifikasi sebagai spesies bakteri *Bacillus stearothermophilus* (Tabel 4.4). Bakteri ini termasuk dalam genus *Bacillus* sama seperti isolat PS 2 dan PS 3. Klasifikasi bakteri *Bacillus stearothermophilus* yang ditemukan pada sumber air panas Pacet Mojokerto sebagai berikut (Holt, 1994):

Kingdom : Monera
 Phylum : Firmicutes
 Class : Bacilli
 Ordo : Bacillales
 Family : Bacillaceae
 Genus : *Bacillus*
 Spesies : *Bacillus stearothermophilus*

Berdasarkan pengamatan morfologi sel bakteri *Bacillus stearothermophilus* termasuk bakteri gram positif yang berbentuk batang atau basil kurus. Bakteri ini memproduksi endospora dalam siklus hidupnya. Isolat bakteri ini mempunyai endospora terminal, yaitu endospora yang letaknya di tengah sel. Pada uji fermentasi gula-gula bakteri *Bacillus stearothermophilus* terdeteksi positif mampu memfermentasi xylosa, mannitol dan arabinosa sedangkan pada glukosa, laktosa, sukrosa dan maltose terdeteksi negatif. Menurut Tortora dkk (2003) umumnya bakteri lebih optimal di dalam memanfaatkan golongan karbohidrat yang paling sederhana

daripada sumber karbohidrat yang lebih kompleks seperti laktosa, sukrosa dan arabinosa.

Dari hasil pengujian *Voges Proskauer* (VP) untuk bakteri *Bacillus stearothermophilus* menunjukkan hasil negatif artinya bakteri tersebut tidak dapat mengkonversi glukosa menjadi asetonin. Sedangkan untuk uji indol, pengujian menunjukkan hasil negatif artinya *Bacillus stearothermophilus* tidak mampu menghidrolisis senyawa triptofan dalam metabolismenya. Berdasarkan uji enzim katalase bakteri *Bacillus stearothermophilus* hasilnya positif, sehingga bakteri ini memiliki karakter respirasi yang bersifat aerob. Menurut Alexander dan Street (2001) sel bakteri secara fisiologis menghasilkan H_2O_2 selama proses respirasi erop. Adanya akumulasi H_2O_2 didalam sel bersifat toksik. Dengan demikian, bakteri yang memiliki kemampuan dalam memproduksi enzim katalase memiliki kemampuan dalam mereduksi H_2O_2 untuk keseimbangan reaksi kimiawi di dalam sel.

Beberapa peneliti telah berhasil mengisolasi bakteri *Bacillus stearothermophilus* dari berbagai lokasi. Lai dan Ingram (1993) berhasil mengisolasi bakteri *Bacillus stearothermophilus* dari kayu busuk di Florida, USA. Bakteri tersebut mampu tumbuh hingga suhu $65^{\circ}C$ dan juga mampu menghasilkan zona bening pada media selulosa agar. Chen dkk (1986) berhasil mengidentifikasi *Bacillus stearothermophilus* yang diisolasi dari tanah. Stenesh dan Roe (1972) berhasil mengisolasi *Bacillus stearothermophilus* dari sumber air panas Yellowstone, USA. Bartsch dkk (1996).menyatakan pada pengaplikasian bidang industri bakteri ini menjadi sumber penghasil enzim termostabil

Tabel 4.5. Hasil Identifikasi Bakteri Isolat PS 4

Jenis Tes	Hasil	Identifikasi spesies
Bgp	Positif	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Spora	Positif	
Ferment Gula-Gula		
Glukosa	Negatif	
Xylosa	Positif	
Mannitol	Positif	
Laktosa	Negatif	
Sukrosa	Negatif	
Maltosa	Negatif	
Arabinosa	Positif	
Suhu Pertumbuhan		
25° c	Positif	
37° c	Positif	
40° c	Positif	
65° c	Positif	
Tumbuh Di		
Nutrient Broth	Positif	
Mca	Negatif	
Tsi	Tdk	
Citrat	Positif	
Indol	Negatif	
Mr	Negatif	
Vp	Negatif	
Nacl 7%	Positif	
Motilitas	Positif	
Starch Hydrolysis	Negatif	
Penicillin	Sensitiv	
Beta-Hemolisa	Negatif	
Katalase	Positif	
Oksidase	Positif	
Reduksi Nitrat	Negatif	
Reduksi Meth. Blue	Negatif	

Bakteri ini mampu tumbuh pada temperature 25°- 65°C. Berdasarkan hasil uji bakteri ini memiliki motilitas positif artinya bakteri *Bacillus stearothermophyllus* mampu bergerak aktif karena mempunyai flagel di seluruh bagian selnya (Holt, 1994). Bakteri ini dapat tumbuh dalam media nutrient broth dan terdeteksi sensitif terhadap penicillin.

Bacillus stearothermophyllus memiliki panjang sel 0,6 – 1,0 µm dan lebar sel 2 – 3,5 µm, endospora berbentuk lonjong, sel motil, hidup antara suhu 37 - 65°C dan pH 6,0 – 8,0. Sering tersusun atau membentuk rantai. Termasuk bakteri Gram positif dan motil atau bergerak dengan flagella. Terdapat tidak atau lebih dari satu spora perselnya. Bersifat aerobik atau anaerobik fakultatif dan ditemukan di berbagai macam tempat atau habitat (Claus dan Berkeley, 1986).

4.4.3 Identifikasi *Bacillus laterosporus*

Berdasarkan hasil identifikasi spesies dengan *Mikrobact 12A/E*, isolat PS 8 teridentifikasi sebagai spesies bakteri *Bacillus laterosporus* (Tabel 4.4). Bakteri ini termasuk dalam genus *Bacillus* sama seperti isolat PS 2 dan PS 3. Klasifikasi bakteri *Bacillus laterosporus* yang ditemukan pada sumber air panas Pacet Mojokerto sebagai berikut (Holt, 1994):

Kingdom : Monera
Phylum : Firmicutes
Class : Bacilli
Ordo : Bacillales
Family : Bacillaceae
Genus : *Bacillus*

Spesies : *Bacillus laterosporus*

Tabel 4.6. Hasil Identifikasi Bakteri Isolat PS 8

Jenis Tes	Hasil	Identifikasi spesies
Bgp	Positif	<i>Bacillus laterosporus</i>
Spora	Positif	
Ferment Gula-Gula		
Glukosa	Positif	
Xylosa	Negatif	
Mannitol	Positif	
Laktosa	Negatif	
Sukrosa	Positif	
Maltosa	Positif	
Arabinosa	Negatif	
Suhu Pertumbuhan		
25° c	Positif	
37° c	Positif	
40° c	Positif	
55° c	Positif	
Tumbuh Di		
Nutrient Broth	Positif	
Mca	Negatif	
Tsi	A/A,H2s-	
Citrat	Negatif	
Indol	Negatif	
Mr	Negatif	
Vp	Negatif	
Nacl 7%	Negatif	
Motilitas	Positif	
Starch Hydrolysis	Negatif	
Penicillin	Sensitiv	
Beta-Hemolisa	Positif	
Katalase	Positif	
Oksidase	Positif	
Reduksi Nitrat	Positif	
Reduksi Methylene Blue	Negatif	

Berdasarkan pengamatan morfologi sel bakteri ini memiliki bentuk sel batang(basil) kurus. Bakteri *Bacillus laterosporus* terdeteksi menghasilkan endospora dalam siklus hidupnya. Endospora dari bakteri *Bacillus laterosporus* termasuk jenis endospora subterminal artinya endospora berada didekat ujung sel vegetatifnya. Pada hasil uji fermentasi gula-gula bakteri ini positif memfermentasi glukosa, mannitol, sukrosa, maltose. Bakteri *Bacillus laterosporus* mampu tumbuh pada suhu 25-55°C. Menurut Pelczar (2000) bakteri yang mampu tumbuh pada rentang suhu 25-55°C adalah bakteri golongan termofil fakultatif. Kisaran suhu tersebut sangat mempengaruhi laju pertumbuhan dari bakteri karena suhu mempengaruhi semua proses reaksi kimiawi dalam tubuh bakteri tersebut.

Bakteri *Bacillus laterosporus* termasuk dalam bakteri gram positif. Pada uji indol, citrat, MR, dan VP bakteri ini terdeteksi negatif. Bakteri *Bacillus laterosporus* mampu bergerak aktif atau motil. Menurut Pelczar (2010) motilitas pada sel bakteri disebabkan adanya flagellum (jamak, flagella). Tidak semua bakteri mempunyai flagellum, banyak spesies basilus dan spirillum memilikinya. Bukti-bukti tak langsung mengenai adanya flagella dapat diperoleh dengan cara memeriksa bakteri pada preparat basah untuk melihat adanya pergerakan.

Bacillus laterosporus telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi kegunaannya oleh beberapa peneliti. Bakteri ini memiliki habitat alami pada air, tanah dan serangga. Potensi bakteri ini sebagai biopestisida terhadap beberapa serangga yang meliputi Coleoptera, Lepidoptera, dan Diptera dan juga beberapa nematode dan moluska telah dilaporkan. Selain itu *B. laterosporus* juga memiliki aktivitas

antimikroba melawan bakteri dan fungi pathogen. *B. laterosporus* juga terdeteksi mampu menghasilkan antibiotik, yang telah diobservasi patoenisitasnya pada bidang medis. (Ruiu, 2013).

4.5 Uji Aktivitas Enzim Selulase Yang Dihasilkan Bakteri Selulolitik Secara Kuantitatif

Tahap awal dari uji aktivitas enzim adalah proses produksi enzim. Produksi enzim selulase dilakukan dengan cara menginokulasikan sebanyak 2 ose isolat bakteri selulolitik termofilik kedalam 50 mL media CMC Broth dan diinkubasi pada shaker inkubator dengan kecepatan 125 rpm pada suhu 50°C selama 18 jam, inokulum kemudian diambil sebanyak 5 mL medium CMC Broth dan diinkubasi pada shaker inkubator pada suhu 50°C selama 24 jam. Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C untuk mencegah terjadinya denaturasi protein enzim. Menurut Simanjuntak (2013) untuk memisahkan sel bakteri dari media produksinya dapat dilakukan dengan menggunakan sentrifugasi dingin sehingga didapatkan ekstrak kasar enzim selulase.. Dengan sentrifugasi, sel akan terendapkan karena adanya gaya sentrifugasi sedangkan enzim tetap berada dalam supernatan. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim selulase dan digunakan untuk penentuan aktivitas enzim. Menurut Bintang (2010) suhu 4°C merupakan suhu penyimpanan yang baik untuk enzim dimana aktivitas mikroorganisme tidak terjadi, selain itu pada suhu ini tidak terjadi denaturasi protein enzim.

CMC *Broth* digunakan sebagai media produksi enzim karena dalam media ini mengandung selulosa yang digunakan sebagai substrat pada reaksi enzimatik. Selain itu media ini mengandung sumber C, N, dan beberapa mineral lainnya yang diperlukan. Sumber karbon yang berfungsi sebagai sumber energy sel dan unsure utama dalam pembentukan sel dipenuhi oleh adanya CMC. Menurut Pratiwi (2008) dalam media pertumbuhan garam-garam mineral seperti KNO_3 , KH_2PO_4 , dan MgSO_4 digunakan sebagai nutrient untuk membantu pertumbuhan sel sedangkan logam kalium pada KNO_3 dan Magnesium pada MgSO_4 merupakan kofaktor bagi aktivitas enzim selulase.

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dihasilkan satu mikromol gula reduksi (glukosa) setiap menit (Lehninger, 1993).

Aktivitas selulase dapat diukur dengan menggunakan metode asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS). Prinsip dari metode ini yaitu didasarkan pada peristiwa tereduksinya DNS menjadi 3-amino-5-nitrosalisilat oleh senyawa gula pereduksi (glukosa) yang akan memberikan warna merah kecoklatan. Gula pereduksi akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat dalam suasana alkali, membentuk senyawa yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540-550 nm (Apriyanto dkk, 1989).

Pengujian aktivitas enzim selulase pada penelitian ini dilakukan dengan mereaksikan 1 mL enzim dengan 1 mL larutan substrat (CMC 1 % dalam buffer pH

7) dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 40 menit. Suhu 50°C dan penggunaan buffer pH 7 merupakan penyesuaian terhadap lingkungan tempat bakteri diisolasi. Selama proses inkubasi, terjadilah reaksi antara enzim dengan substrat yang kemudian menghasilkan gula reduksi berupa glukosa. Reaksi ini merupakan reaksi hidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan menggunakan enzim selulase. Menurut Purwoko (2007) degradasi selulosa menjadi glukosa memerlukan 3 enzim, yaitu endo β -1,4-glukanase yang memecah selulosa menjadi lebih pendek (oligosakarida), ekso β -1,4-glukanase memotong oligosakarida menjadi selobiosa (disakarida) dari ujung non reduksi, dan β -glukosidase memecah menjadi β -glukosa.

Glukosa yang dihasilkan, direaksikan dengan pereaksi DNS sebanyak 1 mL dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit untuk menyempurnakan reaksi yang terjadi. Untuk menstabilkan warna yang terbentuk, garam rochelle atau KNa-Tartrat 40% ditambahkan kedalam campuran enzim dan DNS 1 mL sesegera mungkin sebelum campuran dingin. Setelah itu ditambahkan aquades sampai volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm untuk menentukan kadar glukosa yang terbentuk. Kadar glukosa yang diperoleh inilah yang menunjukkan aktivitas ekstrak kasar selulase dalam menghasilkan glukosa.

Besar kecilnya aktivitas enzim selulase ini akan mempengaruhi kadar gula pereduksi (glukosa) yang dihasilkan. Komponen pereaksi DNS adalah asam dinitrosalisilat, garam Rochelle (KNa-Tartrat), fenol, sodium bisulfit, dan natrium hidroksida. Menurut Miller (1959), 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. Hasil pengukuran aktivitas ekstrak kasar selulase dapat dilihat pada Tabel 4.9.

Tabel 4.7 Hasil Perhitungan Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase

No	Kode Isolat	Aktivitas Ekstrak Kasar (U/mL)
1.	PS 2 (<i>Bacillus megaterium</i>)	$3,9 \times 10^{-3}$
2.	PS 3 (<i>Bacillus megaterium</i>)	$1,9 \times 10^{-3}$
3.	PS 4 (<i>Bacillus stearothermophyllus</i>)	$7,8 \times 10^{-3}$
4.	PS 8 (<i>Bacillus laterisporus</i>)	$4,2 \times 10^{-3}$

Berdasarkan hasil perhitungan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dapat diketahui bahwa Isolat PS 4 memiliki aktivitas enzim yang paling tinggi yaitu $7,8 \times 10^{-3}$ U/mL. Selanjutnya diikuti Isolat PS 8, Isolat PS 2 dan Isolat PS 3 yang memiliki masing-masing aktivitas enzim sebesar $4,2 \times 10^{-3}$ U/mL, $3,9 \times 10^{-3}$ U/mL dan $1,9 \times 10^{-3}$ U/mL. Aktivitas enzim yang dimiliki oleh keempat isolat tersebut masih kecil. Hal ini disebabkan karena isolat bakteri tersebut masih merupakan tipe liar (*wild type*). Hartanti (2010) mengisolasi bakteri selulolitik termofilik dari mata air panas gunung Pancar Bogor dengan aktivitas enzim terbesar $6,11 \times 10^{-3}$ U/mL. Narasimha dkk (2005), menyebutkan bahwa produksi selulase oleh tipe liar *Bacillus*

pumilus, *Cellulomonas biazotea*, dan *Trichoderma aureoviride* dalam media cair tidak akan melebihi 1.5 U/mL. Chang dkk (2009) *Bacillus* sp. yang diisolasi dari kompos *Brassica* memiliki aktivitas maksimum selulolitiknya sebesar 1.90-2.33 U/mL.

Berdasarkan uji kualitatif enzim selulase dan uji kuantitatif enzim selulase yang telah dilakukan maka dapat diketahui bahwa Isolat PS 4 memiliki zona bening terbesar yaitu 30 mm juga memiliki nilai aktivitas enzim yang terbesar pula yaitu $7,8 \times 10^{-3}$ U/mL. Isolat PS 2 yang memiliki nilai zona bening kedua sebesar 27 mm memiliki aktivitas enzim ketiga sebesar $3,9 \times 10^{-3}$ U/mL. Isolat PS 8 yang memiliki zona bening terkecil sebesar 17 mm memiliki nilai aktivitas enzim kedua sebesar $4,2 \times 10^{-3}$ U/mL.

Perbedaan korelasi antara urutan besar zona bening dan nilai aktivitas enzim pada tiap-tiap isolat dipengaruhi beberapa hal. Ward (1985) mengindikasikan bahwa tidak selalu terdapat korelasi yang baik antara zona jernih protein di sekitar koloni pada media padat dengan kemampuan organisme tersebut. Beberapa faktor yang diduga menjadi penyebab tidak terkorelasinya nilai aktivitas hidrolisis secara kualitatif dengan nilai enzim secara kuantitatif adalah perbedaan jenis mikroorganisme, kecepatan pertumbuhan setiap isolat pada medium padat dan cair, jumlah inokulum yang diberikan pada kedua medium, dan tipe enzim yang dihasilkan.

Isolat PS 2 dan Isolat PS 3 yang terdefinisi sebagai spesies yang sama yaitu *Bacillus megaterium* memiliki nilai aktivitas enzim dan zona bening yang berbeda.

Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh perbedaan strain dari dua isolat tersebut. Budi dan Nunang (2013) menyatakan bahwa strain *Bacillus cereus* GG3 dan *Bacillus cereus* GL5 yang ditemukannya memiliki lebar zona bening yang berbeda yang masing-masing yaitu 5,7 dan 4,1 cm. Hal tersebut menunjukkan bahwa perbedaan strain bakteri juga bisa diikuti oleh perbedaan kemampuan enzimatisnya.

4.6 Kajian Islam Terkait Bakteri Selulolitik Termofilik

Bakteri merupakan salah satu jenis mikroorganisme yang banyak dieksplorasi, terutama bakteri dari golongan termofilik. Bakteri ini mampu tumbuh dalam lingkungan yang bersuhu tinggi misalnya sumber air panas. Trismilah dan Sumaryanto (2005) menyatakan bahwa bakteri termofilik merupakan mikroorganisme yang tahan terhadap suhu tinggi dengan suhu optimum pertumbuhan mencapai lebih dari 60°C.

Bakteri merupakan mikroorganisme atau makhluk kecil yang tidak kasat mata. Keberadaan makhluk kecil yang tidak kasat di Bumi ini telah disebutkan Allah *Subhanahu wata'ala* dalam Al-Qur'an surat Yunus ayat 61 yang berbunyi 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) (QS. Yunus : 61)

Asy-Syuyuti dan Jalaludin (1505) dalam kitab tafsir jalalain menyebutkan bahwa yang dimaksud zarah disini adalah semut yang paling kecil. 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. Jadi ada makhluk yang lebih kecil dari pada semut yang berada di bumi ataupun di langit melainkan semua tercatat dalam kitab yang jelas yaitu Lauh Mahfuzh. Makhluk yang lebih kecil dari semut misalnya mikroorganisme. Ukuran mikroorganisme sangat kecil sehingga untuk melihatnya tidak bisa dengan mata telanjang, harus dengan bantuan alat berupa mikroskop.

Mikroorganisme misalnya bakteri meskipun ukurannya sangat kecil tapi memiliki kemampuan hidup yang lebih unggul dari makhluk yang lebih besar darinya. Bakteri mampu hidup hampir di semua tempat bahkan bakteri juga ditemukan dalam kondisi lingkungan yang ekstrim seperti suhu, salinitas, pH yang relatif tinggi atau rendah dan lingkungan yang berkadar garam tinggi dimana organisme lain tidak dapat hidup. Bakteri yang dapat hidup dan tumbuh pada lingkungan panas dikenal sebagai mikroba termofilik (Madigan dkk, 2000).

Allah *Subhanahu wata'ala* yang menciptakan bakteri hingga mampu hidup dan tumbuh pada lingkungan yang ekstrim tersebut tentu telah dibekali Allah keperluan-keperluan guna menunjang hidup bakteri tersebut. Hal tersebut misalnya

kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim yang tahan akan panas. Allah berfirman dalam surat Al-Hijr ayat 20 yang berbunyi sebagai berikut :

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشَ 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.

Enzim tersebut mampu memecah senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana sehingga mampu di makan oleh bakteri. Enzim tidak hanya bermanfaat bagi bakteri tapi juga bermanfaat bagi manusia. Salah satu enzim yang bermanfaat adalah enzim selulase yang berfungsi memecah selulosa menjadi glukosa. Raza dan Rehman (2008) menyatakan bahwa selulase merupakan kelompok enzim yang dapat mengkatalis hidrolisis ikatan β -1.4-glikosidik dalam selulosa, selodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya. Molekul tersebut dihidrolisis menjadi unit-unit monomer yang lebih kecil, seperti glukosa (Lynd dkk. 2002).

Bakteri yang mampu menghasilkan enzim selulase disebut dengan bakteri selulolitik dan apabila bakteri tersebut mampu tumbuh dan berkembang dalam lingkungan bersuhu panas disebut bakteri selulolitik termofilik. Bakteri tersebut memiliki berbagai manfaat bagi manusia khususnya dari pemanfaatan produk enzim selulasenya misalnya untuk pemutih kertas alami (Andrade dkk, 1999) dan penjaga warna kain alami (Ibrahim dan El-diwany, 2007). Keberadaan bakteri selulolitik termofilik yang bermanfaat tersebut merupakan salah satu hikmah dari ciptaan Allah *Subhanahu wata'ala*. Allah *Subhanahu wata'ala* berfirman dalam surat Shaad ayat 27 sebagai berikut :

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطِيلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۚ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ

Artinya : *dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya dengan bathil. yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, Maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka.*

Asy-Syuyuti dan Jalaludin (1505) dalam kitab tafsir jalalain menerangkan ayat ini dengan menyebut bathil dengan istilah tanpa hikmah. Jadi Allah *Subhanahu wata'ala* menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya dengan penuh hikmah. Manusia harus pandai dalam mencari hikmah atau manfaat tersebut agar mampu memperkuat imannya supaya tidak bernasip sama seperti orang kafir yang akan dimasukkan neraka oleh Allah *Subhanahu wata'ala* seperti disebutkan dalam ayat tersebut.