

SELEKSI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI SELULOLITIK PENDEGRADASI DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta*) YANG DIISOLASI DARI SALURAN PENCERNAAN IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)

Selection and Identification of Cellulolytic Bacteria Degrading Cassava Leaf Crude Fiber (Manihot esculenta) Isolated from Gouramy Fish (Osphronemus gouramy) Digesting Tract

Mulyasari¹, Widanarni¹, M. Agus Suprayudi¹, M. Zairin Junior¹, dan M. Tri Djoko Sunarno²

¹ Program Studi Ilmu Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

² Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Ikan Air Tawar Bogor, Indonesia

* Korespondensi Penulis: mulyasari_bogor@yahoo.co.id

Diterima: 5 Oktober 2015; Disetujui: 1 Desember 2015

ABSTRAK

Pemanfaatan daun singkong sebagai bahan baku pakan ikan belum dilaksanakan secara optimal karena mengandung selulosa yang cukup tinggi. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan bakteri yang dapat mendegradasi serat daun singkong dan melakukan identifikasi jenis bakteri selulolitik tersebut. Seleksi bakteri selulolitik dilakukan pada 4 jenis isolat bakteri asal saluran pencernaan ikan gurame yaitu UG3, UG6, UG7, dan UG8 dengan mengukur aktivitas enzim selulase secara kuantitatif pada substrat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dan daun singkong menggunakan metode *3,5-dinitrosalicylic acid* (DNS). Identifikasi bakteri dilakukan pada 3 isolat yang memiliki aktivitas enzim selulase tertinggi pada substrat daun singkong berdasarkan morfologi (perwarnaan Gram, motilitas dan bentuk bakteri), uji biokimia (oksidase dan katalase) dan analisis gen (16S-rRNA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 4 isolat yang diuji cobakan, isolat UG7 memiliki aktivitas enzim selulase (CMCase) tertinggi (0,0043 U/ml) sedangkan yang terendah adalah UG3 (0,0018 U/ml). Pada uji coba di substrat daun singkong, aktivitas enzim tertinggi terlihat pada isolat UG3 (0,107 U/ml) dan terendah adalah UG6 (0,077 U/ml). Hasil identifikasi dari 3 jenis isolat bakteri uji yang memiliki kemampuan mendegradasi daun singkong tertinggi (UG3, UG7, dan UG8) menunjukkan bahwa ketiga jenis isolat tersebut merupakan bakteri jenis Gram positif berbentuk batang (basil). Berdasarkan *data base* dari *GenBank*, isolat UG3 memiliki kemiripan sebesar 93% dengan *Bacillus clausii*, UG7 memiliki kemiripan sebesar 96% dengan *Bacillus amyloliquefaciens* dan UG8 memiliki kemiripan sebesar 88% dengan *Bacillus subtilis*.

KATA KUNCI: bakteri selulolitik, daun singkong, enzim selulase, gurame

ABSTRACT

*The utilization of cassava leaves as one of fish feed ingredient cannot be carried out optimally because of its high cellulose content. The aims of these research were to find isolates that can degrade cassava leaves and identify those bacteria. Four isolates were selected (UG3, UG6, UG7 and UG8) and measured its cellulase activity on Carboxy Methyl Cellulose (CMC) and cassava leaf substrate by using 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. Three bacteria which have higher activity of cellulase enzyme were identified based on morphology test (Gram staining, motility and bacteria shape), biochemical test (oxidase and catalase test) and analysis of 16S-rRNA. The result showed that isolate UG7 has the highest cellulase activity on CMC substrate (0.0043 U/ml) while UG3 was the lowest one (0.0018 U/ml). On the contrary, the highest activity was seen on UG3 (0.107 U/ml) and the lowest was on UG6 (0.077 U/ml) when the isolates were applied on cassava leaf substrate. The identification result of three isolates that have the highest cellulase activity on cassava leaf substrate (UG3, UG7 and UG8), showed that all isolates were rod shapes, and Gram positive bacteria. Based on data base of GenBank, UG3 93% was similar to *Bacillus clausii*, UG7 96% was similar to *B. amyloliquefaciens* and UG8 88% was similar to *B. Subtilis*.*

KEYWORDS: cellulolytic bacteria, cassava leaf, cellulase enzyme, gouramy

PENDAHULUAN

Bakteri selulolitik adalah jenis bakteri yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi substrat yang mengandung selulosa. Bakteri selulolitik mampu mengubah selulosa menjadi gula yang lebih sederhana untuk digunakan sebagai sumber karbon dan energi bagi metabolisme dan pertumbuhannya. Kemampuan ini disebabkan bakteri dapat memproduksi enzim selulase. Enzim selulase adalah biokatalisator yang berperan mengkatalisis proses hidrolisis selulosa menjadi rantai selulosa yang lebih pendek atau oligosakarida yang selanjutnya akan diubah lagi menjadi glukosa. Selulase merupakan nama kelompok enzim yang memutuskan ikatan glikosidik beta-1,4 di dalam selulosa, selodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya. Selulase terdiri dari enzim - enzim yang bekerja bersama-sama secara sinergis untuk menghidrolisis selulosa (Zhang & Zhang, 2013).

Bakteri selulolitik dan enzim selulasenya banyak dimanfaatkan untuk berbagai macam keperluan industri karena biaya produksinya murah, waktu produksi singkat, menghasilkan kompleks multienzim dan cenderung stabil pada kondisi ekstrem (Ladeira, *et al.*, 2015). Selulase banyak digunakan dalam industri *pulp* dan kertas untuk modifikasi serat, penghilangan warna dan peningkatan drainase (Ladeira, *et al.*, 2015), industri tekstil sebagai *bio-polishing* kain dan deterjen yang digunakan untuk meningkatkan kelembutan dan kecerahan kain (Shadu & Maiti, 2013) serta produksi biofuel (Bogati, 2011). Aplikasi selulase di bidang peternakan telah dilakukan untuk peningkatan kualitas bahan pakan ternak. Selulase digunakan untuk meningkatkan pencernaan rumput raja (Prabowo *et al.*, 2007), jerami padi (Nur *et al.*, 2008), bagas tebu (Rayhan *et al.*, 2013), eceng gondok (Riswandi, 2014) dan bahan baku lainnya.

Dalam bidang perikanan penggunaan enzim selulase juga sudah mulai diujicobakan untuk peningkatan kualitas pakan ikan. Saat ini mulai dilakukan eksplorasi penggunaan bahan baku lokal untuk pakan ikan karena harga pakan komersial yang semakin lama semakin mahal. Namun banyak bahan baku lokal khususnya nabati yang masih memiliki kualitas rendah karena kandungan serat kasarnya tinggi yang menyebabkan bahan tersebut tidak dapat dimanfaatkan secara optimal. Daun singkong (*Manihot esculenta*) meskipun mengandung serat yang tinggi, berpotensi digunakan sebagai bahan pakan ikan karena merupakan hasil samping pertanian yang mudah di peroleh, melimpah, kontinyuitasnya terjamin dan harganya murah. Menurut Badan Pusat Statistik (BPS) 2014 produksi singkong tahun 2013 di Indonesia

mencapai 25 juta ton dengan luas panen sebesar 1,1 juta Ha di mana proporsi daun singkong adalah sekitar 2,30 ton. Jumlah ini cukup besar dan menjamin ketersediaan bahan baku untuk pembuatan pakan ikan. Selain ketersediaannya yang melimpah, kandungan protein daun singkong cukup tinggi (17-34 %) (Sirait & Simanihuruk, 2010; Mokemiabeka, 2011) serta kaya akan mineral dan vitamin (Kobawila, 2005). Kandungan serat kasar yang tinggi yaitu sebesar 16–26% (Mokemiabeka, 2001) menyebabkan pemanfaatan daun singkong dalam pakan menjadi terbatas. Penggunaan mikroba selulolitik atau enzim selulase untuk mendegradasi serat kasar tinggi dalam daun singkong merupakan salah satu alternatif solusi dalam mengatasi masalah tersebut.

Bakteri pendegradasi selulosa banyak diisolasi dan dikarakterisasi dari berbagai sumber seperti tanah, tanaman busuk, air panas, bahan organik, feses ruminansia, dan kompos (Irfan *et al.*, 2012). Selain itu bakteri selulolitik juga banyak terdapat dalam saluran pencernaan hewan termasuk ikan. De Castro *et al.* (2011) menemukan strain bakteri selulolitik baru yaitu *Paenibacillus sp* yang diisolasi dari usus ikan perisai (*armored catfish*) *Parotocinclus maculicaud*. Sedangkan Ganguly dan Prasad (2012) menyatakan bahwa ikan karper India (*Indian major carp*) yang merupakan hewan poikilotermik memproduksi selulase secara endogen dan dalam saluran pencernaannya terdapat mikroflora selulolitik yang menetap di sana. Ikan gurame *Osphronemus gouramy* merupakan ikan yang memiliki kebiasaan memakan tumbuh-tumbuhan (Cholik *et al.*, 2005). Hal ini yang menjadi indikasi bahwa ikan gurame memiliki bakteri selulolitik dalam saluran pencernaannya. Menurut Ganguly dan Prasad (2012), saluran pencernaan ikan menyimpan populasi mikroba (mikroflora) khususnya bakteri dari lingkungan perairan baik melalui air maupun makanannya. Mikroflora ini ikut berperan dalam menyumbangkan enzim pencernaan eksogen untuk mendegradasi nutrien pakan yang dikonsumsi oleh ikan (Aslamyiah *et al.*, 2009). Berdasarkan hal ini, maka peluang untuk mendapatkan bakteri selulolitik dari saluran pencernaan ikan gurame cukup besar. Hal ini didukung oleh beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa bakteri selulolitik banyak terdapat dalam saluran pencernaan ikan, seperti ikan gurame (Murwantoko *et al.*, 2009; Kurniasih *et al.*, 2012), ikan perisai (De Castro *et al.*, 2011) dan ikan mas, mola, nila (Ganguly & Prasad, 2012).

Penelitian ini bertujuan mendapatkan bakteri dari saluran pencernaan ikan gurame *O. gouramy* yang dapat mendegradasi serat daun singkong, sehingga penggunaan daun singkong dalam pakan ikan dapat ditingkatkan. Selain itu, dilakukan pula identifikasi terhadap bakteri selulolitik yang memiliki aktivitas mendegradasi daun singkong paling tinggi.

BAHAN DAN METODE

Isolat Bakteri Selulolitik

Bakteri selulolitik yang digunakan dalam penelitian ini adalah empat isolat bakteri hasil isolasi dari saluran pencernaan ikan gurami yang memiliki indeks selulolitik tinggi yaitu UG3, UG6, UG7, dan UG8 (Kurniasih et al., 2012).

Seleksi Isolat Bakteri Selulolitik

Seleksi isolat bakteri penghasil selulase dilakukan berdasarkan aktivitas enzim selulase pada substrat CMC dan daun singkong.

Uji aktivitas enzim selulase pada substrat CMC

Uji ini dimaksudkan untuk mengkonfirmasi hasil penapisan berdasarkan uji kualitatif (indeks selulolitik), sekaligus untuk mengetahui waktu produksi yang menghasilkan aktivitas enzim selulase yang tinggi.

Masing-masing sebanyak dua lup isolat berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam 100 ml media CMC 1% cair yang mengandung 1 g CMC; 0,02 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,075 g KNO_3 ; 0,05g K_2HPO_4 ; 0,002 g $FeCl_2 \cdot 7H_2O$; 0,004g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,2 g ekstrak khamir, dan 0,1 g glukosa diinkubasi dalam inkubator statis pada suhu 37 °C selama 24 jam. Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan melakukan sentrifugasi hasil kultur pada kecepatan 2500 rpm (menggunakan sentrifuge merek Hanil No 7 dengan kode rotor A 50 S-8) selama 10 menit pada suhu 4 °C, kemudian diukur aktivitasnya menggunakan metode 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) di mana glukosa digunakan sebagai standar pada konsentrasi 0,01–0,1 mg/ml. Aktivitas enzim selulase diuji terhadap substrat CMC Sigma 1% (b/v) yang dilakukan dalam buffer sitrat fosfat pH 5 pada suhu 37 °C selama 60 menit dan diinaktivasi menggunakan cara pemanasan pada suhu 100 °C selama 15 menit. Aktivitas enzim selulase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/ml. Satu unit aktivitas selulase merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah 1 μ mol selulosa menjadi gula pereduksi (glukosa) per menit pada kondisi pengujian. Kadar glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa dengan enzim selulase diperoleh dari kurva standar glukosa berdasarkan nilai absorbansi pada λ 550 nm.

$$\text{Absorbansi} = ((A_s - A_b) - (A_k - A_b))$$

Keterangan:

A_s = Absorbansi sampel

A_b = Absorbansi blanko

A_k = Absorbansi kontrol

Nilai absorbansi yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam persamaan yang diperoleh dari kurva standar glukosa sehingga didapatkan nilai konsentrasi (kadar glukosa). Aktivitas selulase dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas selulase (U/ml)} = \frac{\text{Kadar glukosa (mg/l)} \times 1000}{V \times t \times BM}$$

Keterangan :

V = Volume enzim (0,2 ml)

t = Waktu inkubasi (60 menit)

BM = Berat molekul glukosa (180 Dalton)

Produksi enzim dengan waktu inkubasi yang berbeda dilakukan untuk mengetahui waktu produksi yang menghasilkan aktivitas enzim selulase yang paling tinggi. Selama produksi enzim dilakukan pengambilan sampel setiap 24 jam sekali selama 72 jam. Penentuan aktivitas enzim dilakukan menggunakan metode DNS seperti disebutkan di atas dengan substrat CMC 1% tetapi suhu inkubasi yang digunakan adalah 50 °C. Suhu aktivitas sebesar 50 °C ditentukan berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang menunjukkan aktivitas enzim selulase bakteri saluran pencernaan gurame tersebut tertinggi pada suhu 50 °C.

Uji aktivitas enzim selulase pada substrat daun singkong

Uji ini dilakukan untuk menseleksi isolat bakteri yang dapat menghidrolisis daun singkong. Daun singkong yang digunakan dalam uji ini adalah dari jenis *Manihot esculenta* berupa campuran daun muda dan tua. Daun dikeringkan di bawah sinar matahari sampai kering ($ka \pm 12\%$), kemudian digiling menjadi tepung dengan ukuran 65 mesh dan digunakan sebagai substrat untuk uji aktivitas selulase.

Sebanyak 0,05 g substrat daun singkong dicampurkan dengan 5 ml bufer dan 5 ml enzim ekstrak kasar. Reaksi antara substrat dan enzim ekstrak kasar dilakukan selama 60 menit pada suhu 50 °C. Kemudian diinaktivasi dengan cara pemanasan pada suhu 100 °C selama 15 menit. Suspensi tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 25 menit. Sebanyak 2 ml supernatan diambil dan ditambahkan 2 ml DNS lalu diinkubasi pada suhu 100 °C selama 15 menit. Setelah dingin larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Konsentrasi substrat adalah 1% (b/v) (Meryandini et al., 2009).

Identifikasi isolat bakteri terpilih

Isolat bakteri yang terpilih diidentifikasi baik secara biokimia (uji katalase dan oksidase), morfologi (bentuk

bakteri, uji motilitas dan pewarnaan Gram) maupun sekuensing yang diawali dengan PCR menggunakan primer 16 S-rRNA. Identifikasi isolat bakteri secara molekuler dilakukan berdasarkan sekuen gen penyandi 16S-rRNA (Suwanto *et al.*, 2000). Primer yang digunakan adalah primer universal spesifik untuk bakteri yaitu 63f (5'-CAGGCCTAACACAGGCAAGTC) dan 1387r (5'GGGCGGWGTGTACAAGGC) (Marchesi *et al.*, 1998). Tahap-tahap identifikasi isolat bakteri meliputi a) isolasi DNA total, b) amplifikasi gen penyandi 16S-rRNA dengan PCR, c) verifikasi dengan elektroforesis gel agarosa, d) ekstraksi DNA dari agarosa, e) *cycle sequencing*, f) purifikasi hasil PCR, dan g) *sequencing* hasil PCR.

HASIL DAN BAHASAN

Aktivitas Enzim Selulase pada Substrat CMC

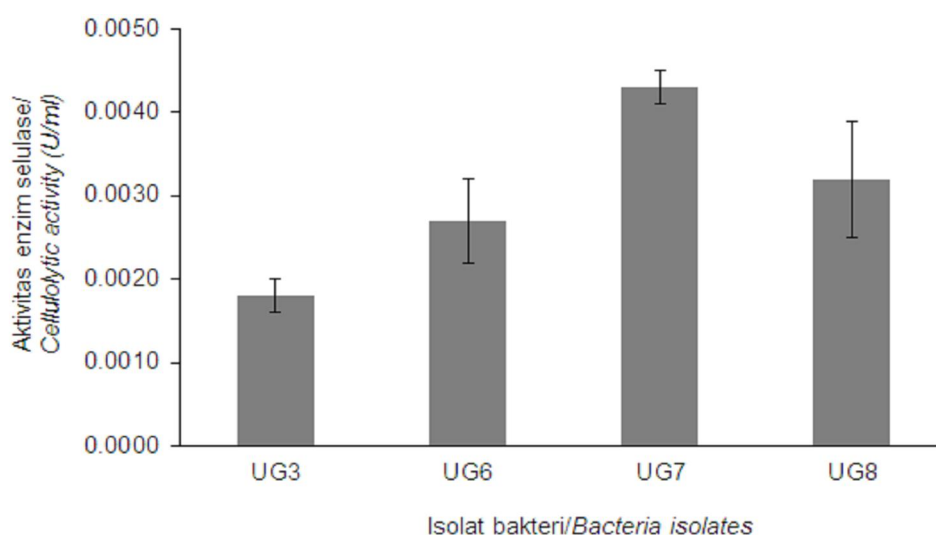
Berdasarkan hasil uji aktivitas selulase menggunakan media CMC cair 1% terlihat bahwa keempat isolat bakteri selulolitik yang diuji memiliki kemampuan untuk menghidrolisis CMC. Aktivitas enzim selulolitik (CMCase) tertinggi dihasilkan oleh isolate UG7 yaitu sebesar 0,0043 U/ml (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim endo-1,4-β-glukanase yang dihasilkan oleh isolat UG7 paling tinggi dibandingkan tiga isolat lainnya. CMC adalah jenis selulosa murni yang berbentuk *amorphous* dan hanya dapat dihidrolisis menggunakan enzim selulase jenis endo-1,4-β-glukanase. Enzim endo-1,4-β-glukanase bekerja pada rantai dalam CMC menghasilkan rantai oligosakarida atau rantai selulosa yang lebih pendek (Meryandini *et al.*, 2009).

Aktivitas enzim selulase pada substrat CMC 1% dengan lama waktu inkubasi tertentu disajikan pada Gambar 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh setiap isolat, kecuali isolat UG6, cenderung meningkat dengan bertambahnya waktu inkubasi. Aktivitas enzim tertinggi terdapat pada isolat UG7 yang diinkubasi selama 72 jam, yaitu dengan nilai 0,0116 U/ml.

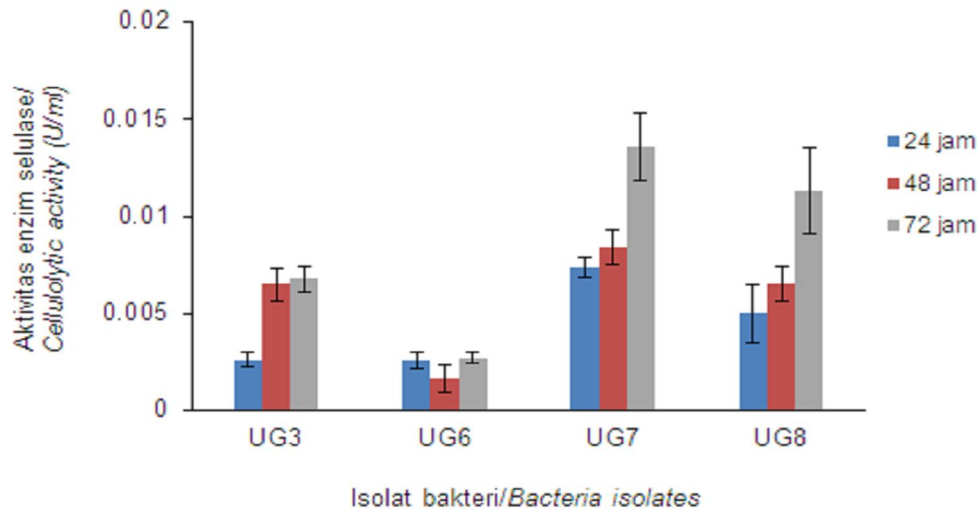
Menurut Meryandini *et al.* (2009), aktivitas enzim selulase meningkat seiring dengan pertumbuhan sel bakteri, tetapi ketika sel memasuki fase stasioner aktivitas enzim mulai menurun. Pada fase stasioner saat substrat yang dibutuhkan bakteri untuk tumbuh telah menipis, bakteri berkompetisi untuk dapat bertahan hidup. Bakteri mengeluarkan enzim-enzim seperti protease yang dapat mendegradasi protein termasuk enzim selulase itu sendiri, sehingga dapat menurunkan aktivitas enzim selulase tersebut. Data tersebut mengindikasikan bahwa waktu inkubasi 72 jam belum merupakan fase stasioner karena aktivitasnya belum mengalami penurunan.

Pada awal pengujian aktivitas enzim selulase, enzim tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C sedangkan pada saat produksi enzim suhu inkubasi yang digunakan adalah 50 °C. Penggunaan suhu inkubasi 50 °C pada produksi enzim ini dipilih karena dari hasil aktivitas enzim selulase, bakteri saluran pencernaan gurame ini sebagian besar memiliki aktivitas lebih tinggi pada suhu seperti terlihat pada Tabel 1.

Menurut Prasad *et al.* (2013), faktor lingkungan seperti pH, suhu dan salinitas merupakan parameter penting yang berpengaruh pada aktivitas enzim selulase. Saat suhu bertambah mencapai suhu



Gambar 1. Aktivitas enzim selulase dari 4 isolat bakteri selulolitik
 Figure 1. Cellulase activity of 4 cellulolytic bacteria



Gambar 2. Aktivitas enzim selulase dari 4 jenis isolat bakteri selulolitik asal saluran pencernaan ikan gurame selama 72 jam.

Figure 2. Cellulase activity of 4 cellulolytic bacteria isolated from gouramy fish digesting tract during 72 hours.

Tabel 1. Aktivitas enzim selulase dari 4 jenis bakteri selulolitik asal saluran pencernaan ikan gurame pada suhu 37 °C dan 50 °C

Table 1. Cellulase activity of 4 cellulolytic bacteria isolated from gouramy fish digesting tract at temperature of 37 °C and 50 °C

Isolat Bakteri/Bacteria Isolates	Aktivitas Enzim/Enzyme Activity (U/ml)	
	Suhu/Temperature 37 °C	Suhu/Temperature 50 °C
UG3	0.0018 ± 0.0002	0.0026 ± 0.0004
UG6	0.0027 ± 0.0005	0.0026 ± 0.0004
UG7	0.0043 ± 0.0002	0.0074 ± 0.0005
UG8	0.0032 ± 0.0007	0.0050 ± 0.0015

optimum, kecepatan reaksi enzim meningkat karena energi kinetik bertambah. Bertambahnya energi kinetik akan mempercepat gerak vibrasi, translasi, dan rotasi baik enzim maupun substrat. Hal ini akan memperbesar peluang enzim dan substrat untuk bereaksi. Namun enzim dapat berubah konformasinya pada suhu yang tidak sesuai, sehingga substrat tidak dapat masuk ke dalam sisi aktif enzim (Meryandini et al., 2009).

Kemampuan Isolat Bakteri Selulolitik dalam Mendegradasi Substrat Daun Singkong

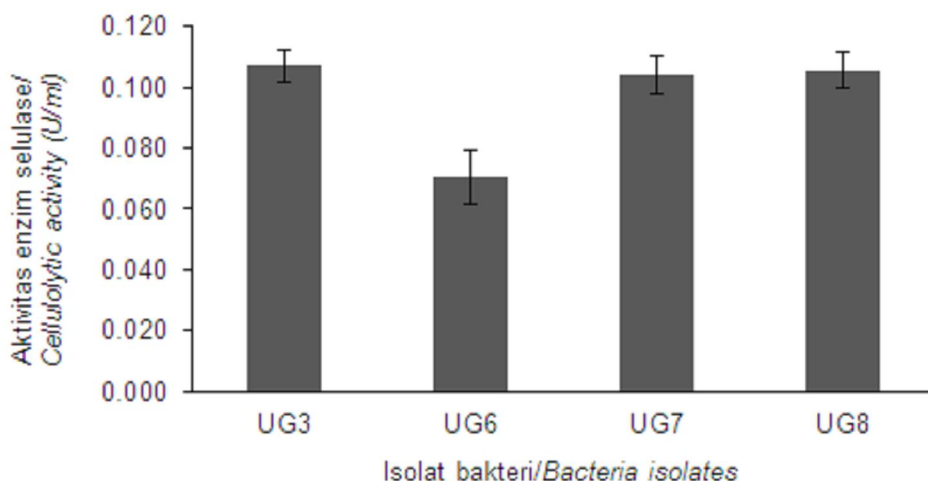
Secara umum enzim selulase dari bakteri UG3, UG6, UG7, dan UG8 mampu mendegradasi substrat daun singkong. Aktivitas selulase dari isolat UG3, UG7 dan UG8 relatif hampir sama, yaitu berturut-turut sebesar 0,107; 0,105; dan 0,104 U/ml. Sedangkan aktivitas enzim selulase UG6 paling rendah dalam

mendegradasi daun singkong yaitu sebesar 0,077 U/ml (Gambar 3).

Isolat UG3, meskipun memiliki kemampuan yang rendah dalam mendegradasi CMC namun kemampuannya dalam mendegradasi daun singkong lebih tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya. Hal ini diduga karena daun singkong merupakan substrat selulosa yang tidak murni dan memiliki struktur selulosa yang berbeda dari CMC serta memiliki kesesuaian yang tinggi dengan enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri UG3.

Identifikasi Isolat Bakteri Terpilih

Identifikasi dilakukan pada tiga jenis isolat yang memiliki kemampuan tertinggi untuk mendegradasi daun singkong yaitu UG3, UG7, dan UG8. Hasil identifikasi secara morfologi menunjukkan bahwa isolat UG3, UG7, dan UG8 memiliki bentuk seperti



Gambar 3. Aktivitas enzim selulase dari isolat UG3, UG6, UG7, dan UG8 dalam substrat daun singkong.
 Figure 3. Cellulase activity of isolates UG3, UG6, UG7 and UG8 on cassava leaf substrate.

Tabel 2. Identifikasi isolat bakteri UG3, UG7, dan UG8 secara biokimia dan morfologi
 Table 2. Identification of isolates UG3, UG7 and UG8 biochemically and morphologically

Isolat Bakteri/ Bacteria Isolates	Jenis uji/Kind of test				
	Gram	Bentuk/ Shape	Oksidase/ Oxidase	Katalase/ Catalase	Motilitas/ Motility
UG3	+	batang/rod	+	+	+
UG7	+	batang/rod	-	+	+
UG8	+	batang/rod	-	+	-

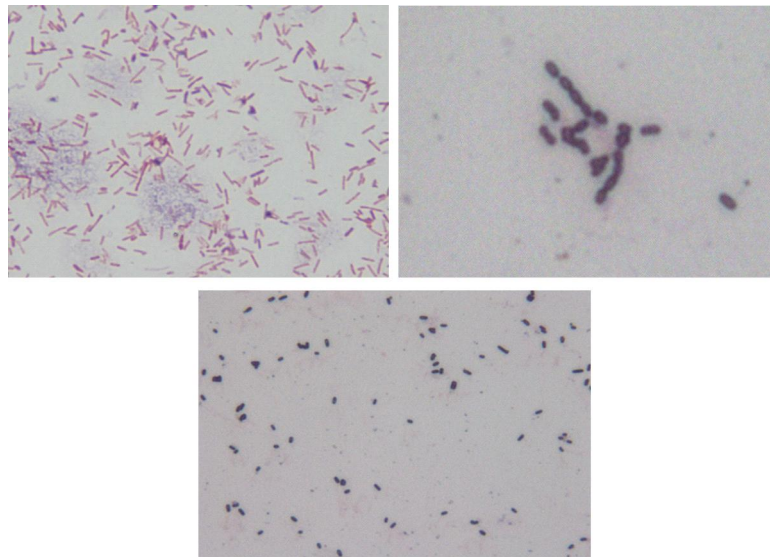
batang dan merupakan bakteri Gram positif. UG3 positif terhadap uji katalase, oksidase, dan bersifat motil atau dapat bergerak. Sedangkan isolat UG7 dan UG8 positif terhadap uji katalase tetapi negatif pada uji oksidase, UG7 bersifat motil sedangkan UG8 tidak motil (Tabel 2). Hasil pengamatan morfologi dari isolat UG3, UG7, dan UG8 disajikan pada Gambar 4.

Katalase positif menunjukkan bahwa bakteri UG3, UG7, dan UG8 dapat hidup dalam kondisi aerobik. Bakteri aerobik menggunakan enzim katalase ini untuk mendetoksifikasi hidrogen peroksida dan superoksida radikal yang merupakan toksin hasil samping dari metabolisme aerobik (Martins *et al.*, 2011). Bakteri UG3 bersifat oksidase positif yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki sitokrom oksidase sebagai ciri dari bakteri organisme aerob atau anaerob fakultatif (Trevaldi *et al.*, 2010).

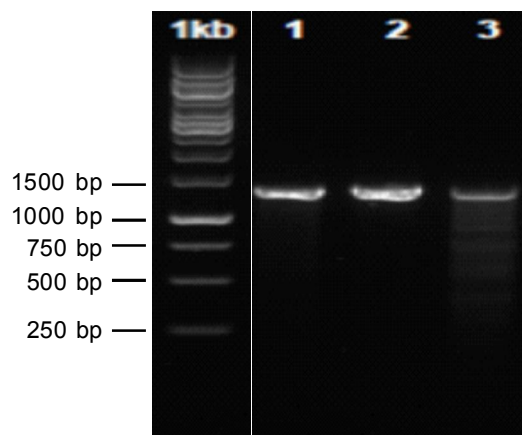
Identifikasi bakteri secara molekuler, diawali dengan amplifikasi gen 16S-rRNA menggunakan

Polymerase Chain Reaction (PCR). Hasil amplifikasi dari isolat UG3, UG7 dan UG8 menunjukkan bahwa gen 16S-rRNA berada pada ukuran 1500 bp (Gambar 5). Menurut Madigan *et al.* (2000), bakteri atau prokariot memiliki tiga jenis ribosomal ribonucleic acid (rRNA) yaitu 23S-rRNA yang memiliki 2900 nukleotida, 16S-rRNA yang memiliki 1500 nukleotida dan 5S-rRNA yang memiliki nukleotida sebanyak kurang lebih 120 nukleotida.

Gen penyandi 16S-rRNA mempunyai sekuen konservatif yang dapat digunakan untuk menduga hubungan kekerabatan secara alami antara spesies yang memiliki kedekatan, sehingga dapat digunakan untuk menganalisis filogenetik bakteri tingkat famili, genus, spesies bahkan sampai subspecies (Rahmadini, 2012). Hasil PCR yang diperoleh kemudian disekuensi di mana hasilnya dibaca menggunakan program FASTA dari koleksi genetik *National Center Biotechnology Information* (NCBI). Berdasarkan data yang ada di *GenBank*, isolat UG3,



Gambar 4. Morfologi isolat bakteri UG3 (kiri), UG7 (kanan), dan UG8 (bawah) (perbesaran 1000x).
Figure 4. The morphology of UG3 (left), UG7 (right) and UG8 (under) (magnificent of 1000x).



Gambar 5. Hasil amplifikasi gen 16S-rRNA UG3, UG7 dan UG8.
Figure 5. Amplification result of 16S-rRNA gene of UG3, UG7 and UG8.

UG7 dan UG8 memiliki kemiripan dengan beberapa bakteri dari jenis *Bacillus* sp (Tabel 3).

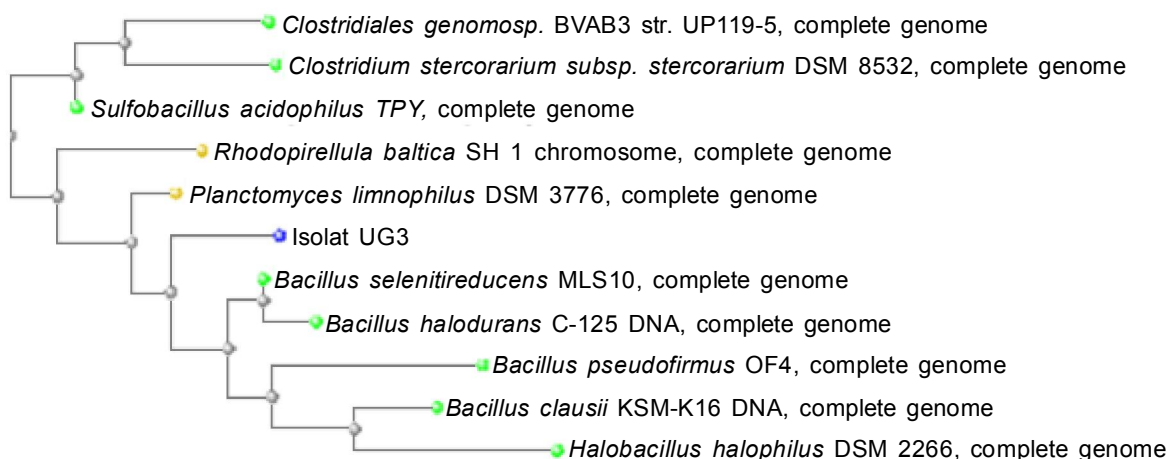
Data base GenBank menunjukkan bahwa isolat UG3 memiliki kemiripan dengan *Bacillus clausii* KSM-K16 DNA dan *B. selenitireducens* MLS10 sebesar 93%, UG3 juga memiliki kemiripan dengan *B. halodurans* C125 DNA namun tingkat kemiripannya hanya sebesar 90%. Selain itu, isolat UG3 memiliki kemiripan dengan bakteri *Halobacillus halophilus* DSM 2266 sebesar 89% serta dengan beberapa jenis *Bacillus* sp lainnya dengan tingkat kemiripan dibawah 86% (Gambar 6).

Berdasarkan *data base* dari *GenBank*, isolat UG7 memiliki kemiripan dengan bakteri jenis *Bacillus*

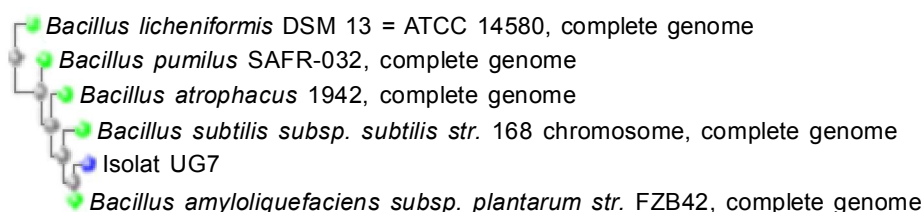
amyloliquefaciens subspecies *plantarum* strain FZB42, *B. subtilis* strain 168 dan *B. atrophaeus* 1942 sebesar 96% (Tabel 3) serta relatif mirip dengan *Bacillus* sp lainnya dengan tingkat kemiripan di bawah 96% (Gambar 7). Demikian pula dengan isolat UG8 yang juga memiliki kemiripan dengan jenis *Bacillus subtilis* strain 168, *Bacillus amyloliquefaciens* subspecies *plantarum* strain FZB42, dan *B. atrophaeus* 1942 sebesar 88%, sedangkan dengan *B. licheniformis* DSM 13 adalah sebesar 87%, dan kemiripannya dengan *Bacillus* sp. lainnya berada di bawah 87% (Gambar 8). Tingkat kesamaan nukleotida sekitar 80% termasuk ke dalam tingkat kesamaan yang tinggi (Melati, 2014). Namun, tingkat kesamaan

Tabel 3. Hasil BLAST isolat UG3, UG7, dan UG8
 Table 3. BLAST result of UG3, UG7 and UG8 isolates

Isolat Bakteri/ Bacteria Isolates	Kemiripan/ Similarity	Deskripsi/Description
UG3	93%	<i>Bacillus clausii</i> KSM4-K16 DNA, <i>B. selenitireducens</i> MLS10
UG7	96%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp <i>plantarum</i> , <i>B. subtilis</i> strain 168, <i>B. atrophaeus</i> 1942, dan <i>B. pumilus</i>
UG8	88%	<i>Bacillus subtilis</i> strain 168, <i>B. amyloliquefaciens</i> subspecies <i>plantarum</i> FZB42, <i>B. atrophaeus</i> 1942



Gambar 6. Hubungan filogenetik isolat UG3 berdasarkan pembacaan NCBI BLAST.
 Figure 6. Phylogenetic relationship of isolate UG3 based on NCBI BLAST description.

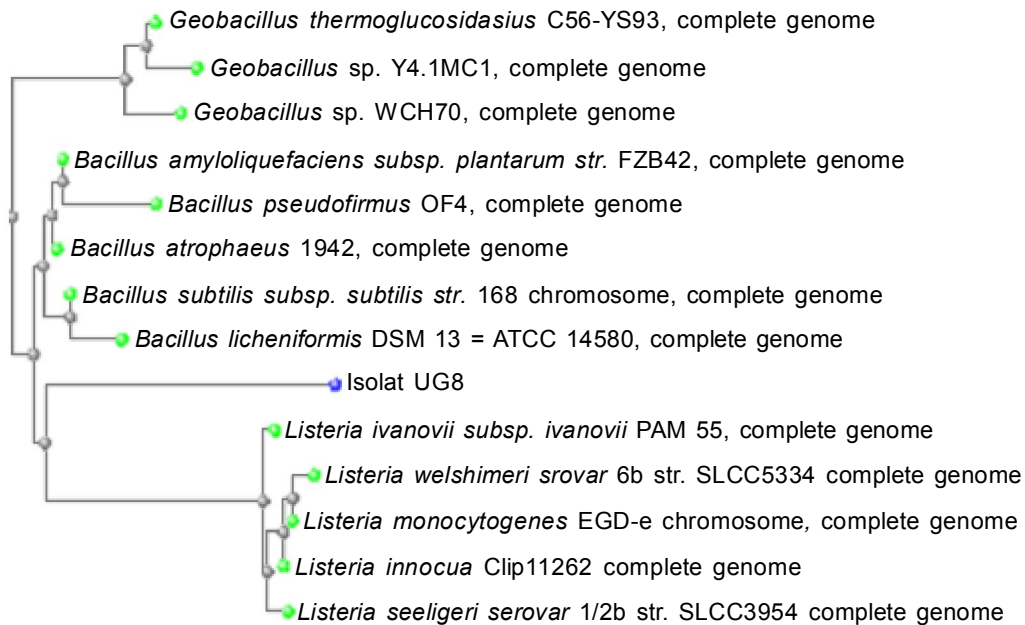


Gambar 7. Hubungan filogenetik isolat UG7 berdasarkan pembacaan program NCBI BLAST.
 Figure 7. Phylogenetic relationship of UG7 based on NCBI BLAST description.

yang hanya mencapai 80% mengindikasikan adanya kemungkinan bakteri tersebut merupakan strain baru dari bakteri yang ada di *GenBank* tersebut.

Menurut Rahayu *et al.* (2014) beberapa jenis bakteri yang memiliki aktivitas selulase berasal dari genus *Bacillus* sp. Chang *et al.* (2009) menemukan bahwa *Bacillus* sp yang diisolasi dari kompos limbah

Brassica memiliki aktivitas selulase berkisar antara 1,9–2,33 U/ml. Demikian pula Pandey *et al.* (2014) dan Ladeira *et al.* (2015) melaporkan strain *Bacillus* sp. yang dapat memproduksi enzim selulase yang berguna untuk industri dan penanganan limbah domestik. Beberapa dari jenis tersebut di antaranya adalah *Bacillus clausii*, *B. amyloliquefaciens* dan *B. subtilis*.



Gambar 8. Hubungan filogenetik isolat UG8 berdasarkan pembacaan NCBI BLAST.
 Figure 8. Phylogenetic relationship of UG8 based on NCBI BLAST identification.

Bacillus clausii adalah bakteri berbentuk batang, merupakan bakteri Gram positif, motil dan membentuk endospora (Hema & Shiny, 2012). Bakteri ini dikenal memiliki potensi sebagai bakteri probiotik (Sun et al., 2010) karena memiliki aktivitas antibakteri (Bouhss et al., 2009) serta dapat memproduksi enzim penting seperti alkaline serine protease (Dilek et al., 2009), xilanase dan selulase (Ochieng, 2014). Sama halnya dengan *B. clausii*, *B. amyloliquefaciens* merupakan jenis bakteri Gram positif berbentuk batang, seringkali membentuk rantai panjang, bersifat motil dan dapat membentuk spora (Singh et al., 2013). *B. amyloliquefaciens* juga dikenal sebagai salah satu jenis bakteri probiotik yang mampu memproduksi beberapa jenis enzim ekstra seluler seperti amilase (Gangadharan et al., 2006; Basma et al., 2015), fitase (Cao et al., 2007) dan selulase (Wizna et al., 2009). *B. amyloliquefaciens* memiliki aktivitas enzim selulase seperti eksoglukanase sebesar 1,200 U/ml dan endoglukanase sebesar 0,488 U/ml (Wizna et al., 2009) dan antimikroba (Nastro et al., 2013).

Bacillus subtilis merupakan bakteri Gram positif dengan katalase positif (Madigan & Martinko, 2005), berbentuk batang dan mampu membentuk endospora (Pant et al., 2015). *B. subtilis* dilaporkan memiliki kemampuan memproduksi selulase, yaitu CMCase dan avicelase saat ditumbuhkan pada media yang mengandung karbohidrat (Chan & Au, 1987), fitase (Cao et al., 2007), hemiselulase (pullulanase, endo- β -1,4-mannase dan endo- β -1,4-xilanase) (Govender et al., 2009), α -amilase (Oyeleke et al., 2011), kitinase

(Narasimhan et al., 2013), serta pectate lyase (Al Balaa et al., 2014).

KESIMPULAN

Isolat bakteri UG3, UG6, UG7, dan UG8 dapat mendegradasi substrat daun singkong dengan aktivitas tertinggi dihasilkan oleh isolat UG3 (0,107 U/ml) dan terendah dihasilkan dari UG6 (0,077 U/ml). Isolat UG3, UG7, dan UG8 merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang (rod). Berdasarkan analisis sekuen gen 16 S-rRNA, bakteri UG3 memiliki kemiripan sebesar 93% dengan *Bacillus clausii* KSM-K16 DNA dan *B. selenitireducens* MLS10. Isolat UG7 memiliki kemiripan sebesar 96% dengan *Bacillus amyloliquefaciens* subspecies *plantarum* strain FZB42, *B. subtilis* strain 168 dan *B. atrophaeus* 1942. Isolat UG8 memiliki kemiripan sebesar 88% dengan *Bacillus subtilis* strain 168, *Bacillus amyloliquefaciens* subspecies *plantarum* strain FZB42, dan *B. atrophaeus* 1942.

DAFTAR PUSTAKA

- Al Balaa, B., Esmail, R. & Yazaji, S. (2014). Purification and characterization of an extracellular alkaline pectate lyase from (*Bacillus subtilis* BPLSY 1). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(1), 193-198.
- Aslamyiah, S., Azis, H.Y., Sriwulan, & Wiryawan, K.G. (2009). Mikroflora saluran pencernaan ikan gurame

- (*Osphronemus gouramy* Lacepede). *Torani-Jurnal Ilmu Kelautan dan Perikanan*, 19(1), 66 – 73.
- Badan Pusat Statistik (2014). *Luas panen, produktivitas dan produksi tanaman ubi kayu seluruh provinsi tahun 2013*. Retrieved from http://www.bps.go.id/tmn_pgn.php?kat=3.
- Basma, T., Elhalem, A., El-Sawy, M., Gamal, R.F., Khadiga, A., & Taleb, A. (2015). Production of amylases from (*Bacillus amyloliquefaciens*) under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Annals of Agricultural Science*. Article in press.
- Bogati, D.R. (2011). *Cellulose based on biochemicals and their applications*. Bachelor's Thesis. Faculty of Technology, Degree Programme in Paper Technology, Saimaa University of Applied Sciences, Finlandia.
- Bouhss, A., Al-Dabbagh, B., Vincent, M., Odaert, B., Nicaise, M.A., Bressolier, P., Desmdaril, M., Lecreux, D.M., Urdaci, M.C., & Gallay, J. (2009). Specific interactions of clausin, a new lantibiotic, with lipid precursors of the bacterial cell wall. *Biophysical Journal*, 97, 1390–1397.
- Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z., & Li, D. (2007). Review: Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology*, 498–505.
- Chan, K.Y. & Au, K.S. (1987). Studies on cellulase production by *Bacillus subtilis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53(2), 125–136.
- Chang, C.C., Ng, C.C., Wang, C.Y., & Shyu, T.T. (2009). Activity of cellulase from thermoactinomycetes and *Bacillus* spp. isolated from brassica waste compost. *Science of Agriculture*, 66(3), 304–308.
- Cholik, F., Jagatraya, A.G., Poernomo, R.P., & Jauzi, A. (2005). *Akuakultur: Tumpuan Harapan Masa Depan Bangsa*. Masyarakat Perikanan Nusantara & Taman Akuarium Air Tawar TMII, Jakarta.
- De Castro, A.L.M., Vollú, R.E., Peixoto, R.S., Lima, A.L.G., Coelho, R.R.R., Bon, E.P.S., Rosado, A.S., & Seldin, L. (2011). Cellulolytic potential of a novel strain of *Paenibacillus* sp. isolated from the armored catfish (*Parotocinclus maculicauda*) gut. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1–10.
- Dilek, K., Bal, H., Denizci, A.A., Ozturk, C.N., Ozturk, U.H., Dilgimen, S., A., Ozturk, C.D., & Erarsian, A. (2009). Studies on Alkaline Serine Protease Produced by *Bacillus clausii* GMBE 22. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 39(3), 289–307.
- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M., & Pandey, A. (2006). α -Amylase Production by *B. Amyloliquefaciens*. *Food Technology Biotechnology*, 44(2), 269–274.
- Ganguly, S. & Prasad, A. (2012). Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Revision of Fish Biological Fisheries*, 22, 11–16.
- Govender, L., Naidoo, L. & Setati, M.E. (2009). Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-1, 4-bxylanase from a newly isolated haloalkaliphilic (*Nesterenkonia* sp). *African Journal of Biotechnology*, 8(20), 5458–5466.
- Hema, T.A. & Shiny, M. (2012). Production of Protease Enzyme from *Bacillus clausii* Sm3. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(4), 37–40.
- Irfan, M., Safdar, A., Syed, Q., & Nadeem, M. (2012). Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. *Turkish Journal of Biochemistry*, 37(3), 287–293.
- Kobawila, S.C., Louembe, D., Keleke, S., Hounhouigan, J., Gamba, C. (2005). Reduction of the cyanide content during fermentation of cassava roots and leaves to produce bikedi and ntoba mbodi, two food products from Congo. *African Journal of Biotechnolog*, 4(7), 689–696.
- Kurniasih, T., Mulyasari, Samsudin, R., & Melati, I. (2012). *Pemanfaatan mikroba untuk perbaikan kualitas bahan baku pakan*. Laporan Kegiatan Seminar Hasil Riset 2012. Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar-Badan Penelitian dan Pengembangan Kelautan dan Perikanan, Bogor.
- Ladeira, S.A., Cruz, E., Delatorre, A.B., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 110–115.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., & Parker, J. (2000). *Brocks Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, London.
- Madigan, M.T. & Martinko, J.M. (2005). *Brocks Biology of Microorganisms (11th Ed.)*. Prentice Hall, London.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Andrew, J., Weightman, Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., & Wade, W.G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *Applied Environmental of Microbiology*, 64(2), 795–799.
- Martins, P.F., Carvalho, G., Gratao, P.L., Dourado, M.N., Pileggi, M., Araujo, W.L., & Azeveda, R.A. (2011). Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. *Process Biochemistry*, 46, 1186–1195.
- Melati, I. (2014). *Mikroba Selulolitik dari Rumput Laut untuk Peningkatan Mutu Hasil Samping Olahan Ubi Kayu sebagai Bahan Baku Pakan Ikan*. Tesis. Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T.C., Rachmania, N., & Satria, H. (2009). Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Jurnal Makara Sains*, 13(1), 33–38.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analysis of Chemistry*, 31, 426–428.
- Mokemiabeka, S., Dhellot, J., Kobawila, S.C., Diakabana, P., & Loukombo, R.N.N. (2011). Softening and mineral content of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) leaves during the fermentation to produce *Ntoba mbodi*.

- Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(6), 418–423.
- Murwantoko, Setyobudi, E., & Istiqomah, I. (2009). *Isolasi dan karakterisasi jasad probiotik pada gurame (Osphronemus) untuk penanggulangan penyakit bakterial Aeromonas hydrophilla*. Laporan Kegiatan Penelitian Hibah Multi Tahun Hibah Bersaing XVI Perguruan Tinggi Periode 3 April sampai dengan 30 Oktober 2009. Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Narasimhan, A., Bist, D., Suresh, S., & Shivakumar, S. (2013). Optimization of mycolytic enzymes (chitinase, B-1,3–glukanase and cellulase) production by *Bacillus subtilis*, a potensial biocontrol agent using one factor approach. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 72, 172–178.
- Nastro, R.A., Vitiello, F., Gesuele, R., Cannavacciuolo, P.L., & Guida, M. (2013). *Bacillus amyloliquefaciens* ANT1 activity against *Penicillium* spp. as bread spoliage mould. In Vilas, A.M. (eds). *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education* (pp. 989–993). Formatex Publisher, Spain.
- Nur, H.S., Meryandini, A., & Hamim. (2008). Pemanfaatan bakteri selulolitik dan xilanolitik yang potensial untukdekomposisi jerami padi. *Jurnal Tanah Tropika*, 14(1), 71–80.
- Ochieng, O.R. (2014). *Characterization of extracellular cellulolytic and xylolytic enzymes from organic waste degrading bacteria*. Thesis. School of Pure and Applied Science Kenyatta University, Kenya.
- Oyeleke, S.B., Oyewole, O.A., & Egwim, E.C. (2011). Production of protease and amylase from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* using *Parkia biglobosa* (africa locust beans) as substrate in solid state fermentation. *Advances in Life Sciences*, 1(2), 49–53.
- Pant, G., Prakash, A., Pavana, J.V.P., Bera, S., Deviram, G.V.N.S., Kumar, A., Panchpuri, M., & Prasuna, R.G. (2015). Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, 9, 50–55.
- Pandey, S., Kushwah, J., Tiwari, R., Kumar, R., Somvanshi, V.S. Nain, L., & Kumar, A. (2014). Cloning and expression of α -1, 4-endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* isolated from soil long term irrigated with effluents of paper and pulp mill. *Microbiological Research*, 169, 693–698.
- Prabowo, A., Padmowijoto, S., Bachruddin, Z., & Syukur, A. (2007). Penggunaan mikroba selulolitik campuran dari ekstrak rayap, larutan feses gajah dan cairan rumen kerbau untuk meningkatkan kecernaan *in vitro* rumput raja *JITV*, 12(2), 105–111.
- Prasad, P., Singh, T., & Bedi, S. (2013). Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil. *Journal of King Saud University-Science*, 24(3), 245–250.
- Rahayu, A.G., Haryani, Y., & Puspita F. (2014). Uji aktivitas selulolitik dari tiga isolat bakteri *Bacillus* sp. galur lokal Riau. *JOM FMIPA*, 1(2), 319–327.
- Rahmadini, I. (2012). *Pemurnian dan karakterisasi enzim selulase dari bakteri yang diisolasi dari limbah rumput laut*. Tesis. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rayhan, M. Suryapratama, W., & Sutardi T.H. (2013). Fermentasi ampas tebu (bagasse) menggunakan *Phanerochaete chrysosporium* sebagai upaya untuk meningkatkan kecernaan bahan kering dan kecernaan bahan organik secara *in vitro*. *Jurnal Ilmiah Peternakan*, 1(2), 583–589.
- Riswandi. (2014). Kualitas silase eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) dengan penambahan dedak halus dan ubi kayu. *Jurnal Peternakan Sriwijaya*, 3(1), 1–6.
- Shadu, S. & Maiti, T.K. (2013). Cellulase production by bacteria: a review. *British Microbiology Research Journal*. 3(3), 235–258.
- Singh, S. Moholkar, V.S. & Arun, G. (2013). Isolation, Identification, and characterization of a cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain SS35 from rhinoceros dung. *ISRN Microbiology*, 1–7.
- Sirait, J. & Simanihuruk, K. (2010). Potensi dan pemanfaatan daun ubikayu dan ubijalar sebagai sumber pakan ternak. *Wartazoa*, 20(2), 75–84.
- Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L., & Lin, W.Y. (2010). Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 803–809.
- Suwanto, A., Yogiana, Suryanto, D., Tan, I., & Puspitasari, E. (2000). *Selected Protocols Training Course on Advances in Molecular Biology Techniques to Assess Microbial Diversity*. SEAMEO-BIOTROP, Bogor.
- Trevaldi, P.C., Pandey, S., & Bhadauria, S. (2010). *Text Book of Microbiology*. Aaviskhar Pub., New Delhi.
- Wizna, Abbas, H., Rizal, Y., & Dharma, A. (2009). Improving the quality of tapioca by product (onggok) as poultry feed through fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(10), 1636–1640.
- Zhang, X.Z. & Zhang, Y.H.P. (2013). Cellulases: Characteristics, Sources, Production and Applications. Bioprocessing Technologies. In Yang, S.T., El-Enshasy, H.A. and Thongchul, N. (eds.) *Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers First Edition* (pp. 131–146). John Wiley & Sons, Inc., New York. '