

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kemajuan perindustrian berkembang pesat, beberapa industri menggunakan bahan-bahan kimia berbahaya dan beracun. Enzim merupakan alternatif yang dapat digunakan sebagai pengganti bahan kimia berbahaya karena enzim merupakan bahan alami yang tidak beracun (Page, 1997). Penggunaan enzim telah dilakukan dalam sejumlah industri, terutama enzim-enzim hidrolase seperti selulase, protease, lipase, amilase, kitinase, dan xilanase (Falch, 1991). Enzim selulase banyak dibutuhkan oleh berbagai bidang industri seperti tekstil, kertas, dan untuk proses sakarifikasi selulosa menjadi gula sederhana (Bhat, 2000). Enzim selulase berperan dalam proses sakarifikasi selulosa menjadi gula yang dapat digunakan untuk memproduksi asam laktat dan juga produksi bioetanol yang dapat digunakan untuk mengatasi kekurangan bahan bakar minyak bumi (Maki *et al.*, 2009).

Enzim selulase merupakan enzim yang memegang peranan penting dalam proses biokonversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa (Silva *et al.*, 2005). Selulosa merupakan polimer glukosa yang saling berikatan dengan tipe ikatan β -1,4-glikosidik (Morana *et al.*, 2011). Enzim selulase menghidrolisis molekul selulosa dengan memotong ikatan β -1,4 glikosidik dan menghasilkan gula sederhana yaitu glukosa (Afsahi, 2007). Enzim selulase merupakan gabungan dari tiga komponen yaitu enzim ekso- β -1,4-glukanase, endo- β -1,4- glukanase, dan β -glukosidase yang saling bekerjasama untuk menghidrolisis selulosa menjadi senyawa yang lebih sederhana (Vrijc *et al.*, 2002). Selulase merupakan enzim yang dapat dihasilkan oleh mikroorganisme (Febriyanto, 2013). Mikroorganisme yang mampu mensekresikan enzim selulase salah satunya adalah kapang dan bakteri (Amstrup, 1979). Bakteri yang memiliki kemampuan untuk mensekresikan enzim selulase menjadikan bakteri tersebut termasuk kedalam golongan bakteri selulolitik (Wenzel *et al.*, 2002).

Bakteri selulolitik banyak ditemukan pada pencernaan rayap, rumen sapi, pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) (Shinde *et al.*, 2017; Lokapirnasari *et al.*, 2016; Anam *et al.*, 2012). Pada saluran pencernaan rayap terkandung bakteri selulolitik, lignolitik, bakteri pengurai hemiselulosa, bakteri pengurai *aromatic*, dan bakteri pembentuk nitrogen (Wenzel *et al.*, 2002; Borji *et al.*, 2003; Schafer *et al.*, 1996; Harazono *et al.*, 2003; Frohlick *et al.*, 2007). Bakteri selulolitik pada saluran pencernaan rayap memiliki peran dalam mengurai selulosa yang dikonsumsi oleh inangnya (rayap) (Purwadaria *et al.*, 2003). Rayap memiliki peran penting dalam proses mineralisasi biopolimer kompleks seperti kayu dan bahan berselulosa dan hemiselulosa (Breznak & Brune, 1994). Rayap mampu mencerna selulosa karena peran mikroorganisme yang bersimbiosis pada saluran pencernaannya (Auer *et al.*, 2017). Salah satu contoh mikroba yang mampu menghasilkan enzim selulase adalah *Aspergillus niger*, *Penicillium brasilianum*, *Chaetomium cellulyticum*, *Trichoderma atroviride* yang termasuk golongan fungi, selain itu pada golongan bakteri adalah *Acinetobacter junii*, *Cellulomonas biazotea*, *Ruminococcus albus*, *Bacillus cereus* (Kuhad *et al.*, 2011).

Karakteristik dari bakteri selulolitik dapat diketahui dengan pengamatan morfologi koloni bakteri dan melakukan juga melakukan identifikasi bakteri itu sendiri (Tito, 2014). Identifikasi bakteri bisa dilakukan dengan melihat perbedaan karakteristik morfologi dan secara biokimia (Krieg, 1994; Smibert & Krieg, 1994). Metode mikrobiologi konvensional dinilai kurang akurat dalam mengidentifikasi spesies bakteri (Nolte, 2008). Identifikasi dengan metode konvensional membutuhkan waktu yang lebih lama (Rinanda, 2011). Berkembangnya ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang molekuler maka karakterisasi spesies bakteri dapat menggunakan sekuensing gen 16S rRNA. Bakteri memiliki gen 5S, 16S, dan 23S (Jill, 2004). Gen 16S memiliki daerah konservatif yaitu gen yang termasuk lambat untuk berevolusi dan mampu mempertahankan kelestariannya berjuta tahun, sehingga daerah konservatif tersebut dijadikan sebagai sekuen primer universal dan digunakan dalam proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Rinanda, 2011).

Gen 16S ini memiliki daerah yang disebut *hypervariable region* yaitu bagian yang menjadi ciri khas dari setiap spesies dan digunakan untuk mengidentifikasi spesies bakteri (Jill, 2004). Identifikasi spesies bakteri menggunakan gen 16S memiliki sensitivitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan melakukan uji biokimia (Rinanda, 2011). Menurut Aabo *et al.* (1995) sensitivitas metode identifikasi molekuler dengan PCR sebesar 92% sedangkan identifikasi dengan metode konvensional atau metode uji biokimia hanya 50%. Al-arif *et al.* (2012) melakukan identifikasi bakteri selulolitik dari pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) dengan uji biokimia dan gen 16S rRNA, hasil uji biokimia menunjukkan bahwa isolat C-4 merupakan *Actinobacillus* sp. namun setelah dilakukan identifikasi 16S rRNA didapatkan isolat C-4 merupakan *Klebsiella* sp ini menunjukkan bahwa terdapat kesalahan identifikasi bakteri selulolitik menggunakan uji biokimia.

Identifikasi bakteri selulolitik menggunakan gen 16S rRNA telah digunakan pada spesies rayap yaitu *Macrotermes gilvus* (Febriyanto, 2013). Penelitian Ohkuma (1998) telah melakukan identifikasi mikroorganisme simbiotik sistem pencernaan rayap *Cryptotermes domesticus* menggunakan sekuensing gen 16S rRNA. Selain itu, Tsegaye *et al.* (2018) juga melakukan identifikasi bakteri selulolitik dari rayap *Cryptotermes brevis* menggunakan gen 16S rRNA. Baik penelitian Ohkuma (1998) maupun Tsegaye *et al.* (2018) keduanya melakukan proses identifikasi bakteri selulolitik dari rayap *Cryptotermes* yang berasal dari Jepang dan India. Menurut Ulrich *et al.* (2008) kondisi lingkungan dan pakan yang berbeda akan menghasilkan populasi bakteri selulolitik yang berbeda. Pengaruh kondisi lingkungan tersebut dapat membedakan populasi bakteri selulolitik yang hidup didalam pencernaan rayap *Cryptotermes* yang berasal dari Indonesia. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk melakukan identifikasi spesies bakteri selulolitik yang terdapat pada pencernaan *Cryptotermes* sp. menggunakan gen 16S rRNA.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut “Bakteri apa saja yang mampu mencerna selulosa berdasarkan identifikasi menggunakan gen 16S rRNA ?”.

1.3 Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan latar belakang, terdapat pertanyaan penelitian dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana potensi isolat bakteri dalam menghasilkan enzim selulase?
2. Bakteri apa saja yang mampu mencerna selulosa berdasarkan identifikasi menggunakan gen 16S rRNA ?

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Bakteri yang digunakan merupakan bakteri yang diisolasi dari pencernaan rayap *Cryptotermes* sp.
2. Isolat yang diidentifikasi merupakan isolat dengan nilai Indeks Selulolitik (IS) yang termasuk kategori sedang dan tinggi.

1.5 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri selulolitik pada pencernaan rayap (*Cryptotermes* sp.) dan mengidentifikasi spesies bakteri selulolitik berdasarkan gen 16S rRNA.

1.6 Manfaat Penelitian

Dari penelitian yang dilakukan ini diharapkan dapat memberikan beberapa manfaat diantaranya :

1. Bakteri yang telah teridentifikasi dapat digunakan sebagai data awal untuk proses produksi enzim selulase ekstrak kasar.
2. Bakteri yang telah teridentifikasi dapat diketahui kemampuannya dalam menghasilkan enzim selulase.

3. Bakteri yang telah teridentifikasi dapat melengkapi penelitian lain yang berkaitan dengan bakteri selulolitik.

1.7 Struktur Organisasi

Penulisan skripsi ini terdiri dari lima bagian, diantaranya yaitu Bab I merupakan pendahuluan yang berisikan latar belakang penelitian mengapa penelitian ini dilakukan dan penjelasan mengenai objek penelitian yang dilakukan. Kemudian terdiri dari rumusan masalah, pertanyaan penelitian, dan batasan masalah yang berisikan mengenai permasalahan secara spesifik dari penelitian yang akan dilakukan. Selanjutnya tujuan penelitian serta manfaat dari penelitian yang dilakukan.

BAB II merupakan kajian pustaka atau landasan teori yang memaparkan tentang deskripsi yang jelas dari objek penelitian, antara lain rayap (*Cryptotermes* sp.), bakteri selulolitik, enzim selulase, dan identifikasi gen 16S rRNA.

BAB III merupakan uraian mengenai tata cara penelitian, terdiri dari jenis penelitian yang merupakan penelitian deskriptif. Selanjutnya terdapat desain penelitian yang merupakan gambaran umum tentang penelitian yang akan dilakukan, populasi dan sampel penelitian merupakan yang objek penelitian, waktu dan tempat penelitian, prosedur kerja serta analisis data.

BAB IV menjelaskan tentang temuan penelitian yang diperoleh berdasarkan hasil analisis data dan pembahasan mengenai temuan tersebut. Pembahasan yang didukung dengan teori dari penelitian yang serupa dan penelitian sebelumnya.

BAB V merupakan kesimpulan, implikasi dan rekomendasi. Kesimpulan mencakup semua temuan penelitian dan pembahasan pada Bab IV. Menjelaskan temuan secara ringkas dan jelas.

BAB II

RAYAP (*Cryptotermes* sp.), BAKTERI SELULOLITIK, ENZIM SELULASE, IDENTIFIKASI GEN 16S rRNA

2.1. Rayap (*Cryptotermes* sp.)

Secara taksonomi, rayap termasuk ke dalam Ordo Isoptera yang berasal dari Bahasa Yunani, yakni *iso* berarti sama dan *ptera* berarti sayap (Pearce, 1997). Borror *et al.* (1992) ordo isoptera kebanyakan memiliki sayap (laron) berjumlah empat dan berselaput tipis yang ukurannya hampir sama dengan sayap depan dan belakang. Rayap merupakan konsumen utama dari biomolekul yang paling melimpah di darat yaitu selulosa dan lignoselulosa. Rayap memegang peran penting dalam ekosistem dengan mendaur ulang limbah material seperti kayu mati, tinja, dan tanaman (Sanderson, 2011). Rayap diperkirakan memakan 50% - 100% dari biomassa tanaman mati (Bignell & Eggleton, 2000). Perkembangan rayap di ekosistem sangat melimpah dikarenakan sumber makanannya yang melimpah, suatu koloni populasi rayap mencapai lebih dari satu juta individu (Chhotani, 1997).

Rayap dapat dibagi menjadi dua kelompok, rayap golongan rendah (lower termites) dan rayap golongan tinggi (higher termites). Rayap golongan rendah terbatas pada makanan kayu atau rumput. Rayap golongan tinggi, memakan tanah, kayu dan makan rumput, dan spesies pemakan jamur (Inward *et al.*, 2007; Noirot, 1992). Rayap secara umum dikenal sebagai serangga pemakan kayu, namun selain itu terdapat beberapa macam makanan yang bisa dikonsumsi oleh rayap di alam (Miura & Matsumoto, 1998). Rayap terbagi menjadi beberapa golongan berdasarkan sumber nutrisinya, yaitu rayap pemakan kayu, rumput, jamur, dan tanah. Rayap pemakan kayu berasal dari famili Mastotermitidae dan Kalotermitidae. Jenis kayu yang dimakan biasanya berasal dari pohon hidup ataupun kayu mati. Rayap pemakan rumput berasal dari famili Hodotermitidae. Selanjutnya, rayap pemakan jamur berasal dari famili Basidiomyces dan berasal dari spesies Mastotermitidae. Rayap pemakan tanah yaitu berasal dari spesies Termitidae. Rayap termitidae memakan tanah

yang mengandung mineral, karbohidrat, mikroorganisme tanah dan senyawa polifenolat (Arsyad, 2017).

Rayap merupakan anggota ordo isoptera yang berperan sebagai dekomposer (Kalsholven, 1981). Rayap merupakan serangga yang hidup berkelompok dimana dalam komunitasnya terdapat sistem kasta teroganisir (Upadhayaya *et al.*, 2012). Kasta yang terdapat dalam suatu koloni rayap yaitu kasta pekerja, prajurit, raja, ratu, larva, reproduksi bersayap (laron) dan kasta reproduksi (calon ratu dan raja) (Watson & Gay, 1991). Setiap koloni rayap memiliki perbedaan bentuk tubuh, di dalam koloni tiap kelompok individu mencerminkan perbedaan tugas dalam koloni (Lee & Wood, 1971; Grimaldi & Engel, 2005). Rayap termasuk ke dalam golongan serangga sosial karena individu dan spesies yang sama di dalam koloni mampu berkomunikasi dan bekerja sama. Rayap memiliki siklus hidup yang berawal dari laron, selanjutnya setiap spesies rayap memiliki masa penetasan telur yang berbeda. Rayap yang belum dewasa (larva) mengalami pergantian kulit yang berlangsung sebanyak delapan kali sampai berkembang menjadi kasta pekerja, prajurit, dan calon laron (Nandika, 2003). Kasta pada rayap merupakan siklus hidup yang kompleks dengan perkembangan individu dan perilaku yang berbeda dari anggota kelompok lainnya (Baker, 2005). Tidak semua jenis rayap memiliki kasta yang lengkap, contohnya pada famili kalotermitidae yang tidak memiliki kasta pekerja. Selain itu termitidae merupakan famili yang tidak memiliki kasta prajurit (Borror *et al.*, 1992).

Tercatat terdapat 2800 jenis spesies rayap yang terbagi ke dalam tujuh famili antara lain Termitidae, Kalotermitidae, Serritermitidae, Hodotermitidae, Mastotermitidae, Rhinotermitidae, Termopsidae (Kambhampati & Eggleton, 2000). Tiga famili kalotermitidae, rhinotermitidae, dan termitidae merupakan ketiga famili yang ditemukan di kawasan indo-malayan (Ahmad, 1965; Thapa, 1981; Tho, 1992). *Cryptotermes* sp merupakan salah satu jenis rayap kalotermitidae yang banyak tersebar di Indonesia (Arsyad, 2017). *Cryptotermes* sp atau diketahui dengan rayap kayu kering karena hidup pada kayu kering dengan kandungan air yang rendah, terdapat pada bahan bangunan

dan perlengkapan rumah tangga yang terbuat dari kayu (Yunilasari, 2008). Pada umumnya *Cryptotermes* sp hidup pada kayu yang mempunyai kadar air 10 - 12% atau lebih rendah dan tidak memiliki kontak langsung dengan tanah (Gay & Watson, 1982). Keberadaan rayap merugikan karena merusak berbagai bahan yang dipergunakan oleh manusia salah satunya adalah kayu (Muhibuddin, 2011). Keberadaan rayap ditandai dengan adanya lubang bulat berukuran 0,3 – 1,5 mm pada kayu kering dibagian permukaan, terdapat hasil ekskresi berbentuk bulat pasir padat dan berada pada sekitar lubang (Huang *et al.*, 2013).

2.1.1. Taksonomi

Kingdom : Animalia
 Phylum : Arthropoda
 Class : Insecta
 Order : Isoptera
 Family : Kalotermitidae
 Genus : *Cryptotermes*
 Species : *Cryptotermes* sp.



Gambar 2.1 *Cryptotermes* sp.
 (Sobotnik & Dahlsjo, 2017)

2.1.2. Persebaran

Cryptotermes, *Incisitermes* dan *Kalotermites* merupakan rayap yang menyerang kayu di seluruh dunia maka disebut hama (Edwards & Mill, 1981). *Cryptotermes cynocephalus*, *Cryptotermes dudleyi* dan *Cryptotermes domesticus* merupakan spesies rayap yang menjadi hama di wilayah Indo-Malayan (Gay 1967, Gay & Watson, 1982). Di kawasan australia tersebar sejumlah spesies *Cryptotermes gearyi*, *Cryptotermes primus*, *Cryptotermes queenslandis*, *Cryptotermes secundus*, *Cryptotermes austrinus*, *Cryptotermes hili*, *Cryptotermes nitidus*, *Cryptotermes papulosus*, *Cryptotermes riverinae*, *Cryptotermes simulatus*, *Cryptotermes tropicalis*, *Cryptotermes brevis*,

Cryptotermes dudleyi, *Cryptotermes cynocephalus*, dan *Cryptotermes domesticus* (Gay & Watson, 1982).

Tiga famili kalotermitidae, rhinotermitidae, dan termitidae merupakan ketiga famili yang ditemukan di kawasan indo-malayan (Ahmad, 1965; Thapa, 1981; Tho, 1992). Rayap di Indonesia diperkirakan terdiri lebih dari 200 spesies (Roonwal & Maiti, 1966). Salah satu jenis rayap dari famili kalotermitidae adalah *Cryptotermes* sp. Rayap spesies *Cryptotermes* sp. diketahui menyebabkan kerusakan parah pada kayu dan produk kayu di seluruh dunia (Edwardo & Mill, 1986). *Cryptotermes* sp. banyak tersebar diberbagai negara antara lain Indonesia, Australia, Jepang, dan India (Gay & Watson, 1982; Ohkuma & Kudo, 1998; Tsegaye *et al.*, 2018). Persebaran rayap sebagian besar berada di daerah dataran rendah tropis dan subtropis karena dipengaruhi oleh faktor suhu dan curah hujan (Nandika *et al.*, 2003).

2.1.3. Morfologi

Morfologi rayap secara umum dibedakan berdasarkan kasta dari rayap itu sendiri. Rayap kasta laron / *alate* memiliki sayap sebanyak empat sayap dengan selaput tipis, sayap bagian depan dan bagian belakang memiliki ukuran yang hampir sama. Laron memiliki sungut yang berbentuk menguntai seperti manik atau benang-benang yang berfungsi untuk mengunyah, begitu pula pada kasta pekerja (Borror *et al.*, 1992). Kasta prajurit memiliki bentuk mandibula yang khas. Rayap dapat diidentifikasi dengan mengamati ukuran kepala serta mandibel dari kasta prajurit (Firmansyah, 2012).

Selain dibedakan berdasarkan kasta, morfologi rayap dapat dibedakan berdasarkan familinya. Famili Rhinotermitidae memiliki ciri morfologi yaitu memiliki ukuran tubuh yang kecil yaitu berkisar 6 – 8 mm. Rayap yang bersayap memiliki warna hitam sedangkan rayap yang tidak bersayap memiliki warna sangat pucat. Rayap dari famili rhinotermitidae ini memiliki ubun – ubun pada bagian atas depan kepala (Andri, 2012). Famili hodotermitidae memiliki ciri morfologi antara lain rayap yang tidak memiliki sayap berwarna pucat dan kepala berwarna hitam, sedangkan rayap yang memiliki sayap

berwarna coklat tua dan kepala berwarna kuning keemasan. Famili termitidae memiliki morfologi rayap dengan mandibel panjang contohnya pada genus *Nasutitermes* dan *Tenuirostriter*. Famili kalotermitidae memiliki ciri bentuk rayap dewasa yaitu silindris dan panjangnya sekitar 13 mm, pada kasta reproduksi berwarna coklat pucat (Borror *et al.*, 1992). *Cryptotermes* sp. yang termasuk ke dalam famili Kalotermitidae ini memiliki kepala berwarna coklat gelap kemerahan (Arsyad, 2017).

Semua spesies rayap sulit dibedakan ketika pada fase belum dewasa (larva), raja, ratu ataupun fase pekerja. Namun pada kasta reproduksi (laron) dan prajurit merupakan yang paling mudah untuk dibedakan dan digunakan dalam identifikasi. Rayap pada kasta laron/*alate* memiliki dua pasang sayap yang tidak berbulu dan berukuran dan berbentuk sama, serta memiliki tiga atau empat pembuluh darah yang gelap dan membesar. Badan *Cryptotermes brevis* pada kasta laron/*alate* berwarna kecoklatan dan panjang sekitar 11 cm (dengan sayap). Sayap memiliki panjang sekitar 9 mm dan memiliki kilauan ketika kering (Scheffrahn & Su, 1999).

2.2. Bakteri Selulolitik

Kemampuan rayap dalam mencerna selulosa dibantu oleh simbiosis mikroba yang terdapat pada pencernaan rayap itu sendiri (Nakashima *et al.*, 2002). Beberapa mikroorganisme diketahui mampu menghidrolisis selulosa yang digunakan sebagai sumber karbon dan sumber energi, seperti bakteri dan jamur (Sukumaran *et al.*, 2005). Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang mampu menghasilkan enzim selulase untuk menghidrolisis selulosa sehingga menjadi gula yang lebih sederhana yaitu glukosa (Baharuddin *et al.*, 2010). Bakteri selulolitik memanfaatkan glukosa hasil hidrolisis menjadi sumber energi dan sumber karbon (Hardjo, 1989).

Bakteri selulolitik menghidrolisis molekul kompleks yang tidak larut dalam air, proses hidrolisis dengan enzim selulase bersifat spesifik yaitu memotong ikatan β -(1,4)-glikosidik pada selulosa (Ambriyanto, 2010). Munifah *et al.* (2011) menyebutkan bahwa enzim selulase selain memotong ikatan β -(1,4)-

glikosidik pada selulosa juga memutus ikatan β -(1,4)-glikosidik pada selodektrin, selubiosa, dan turunan selulosa yang lainnya menjadi gula sederhana yaitu glukosa.

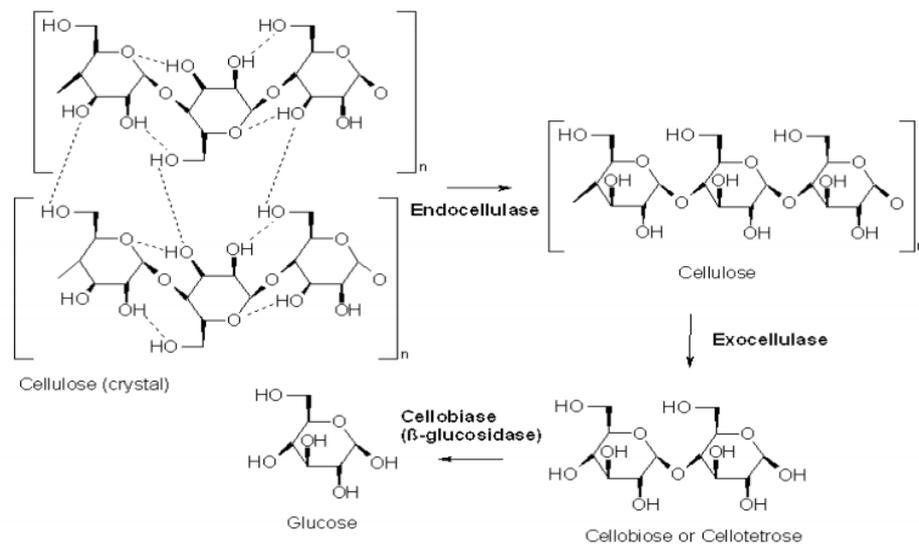
Bakteri selulolitik banyak ditemukan pada pencernaan rayap, rumen sapi, pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) (Shinde *et al.*, 2017; Lokapirnasari *et al.*, 2016; Anam *et al.*, 2012). Beberapa bakteri selulolitik yang terdapat pada pencernaan rayap antara lain adalah *Pseudomonas putida*, *Klebsiella variicola*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter cloacae* dan *Enterobacter aerogenes* (Shinde *et al.*, 2017). Bakteri *Enterobacter cloacae* juga ditemukan pada rumen sapi (Lokapirnasari *et al.*, 2016). Pada pencernaan keong emas ditemukan empat spesies bakteri selulolitik antara lain *Burkholderia pseudomallei*, *Buttiauxella* sp, *Kluyvera* sp, dan *Klebsiella* sp (Al-Arif *et al.*, 2012). Bakteri selulolitik mampu membentuk zona bening disekitar koloni pada medium yang mengandung CMC 1% setelah inkubasi, kemampuan menghidrolisis selulosa tersebut karena bakteri dapat menghasilkan enzim selulase (Aklyosov, 2004).

2.3. Enzim Selulase

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel yang bekerja dengan spesifik dan berfungsi sebagai katalisator didalam suatu reaksi (Lehninger, 1988). Enzim merupakan suatu protein yang mengkatalis berbagai reaksi kimia, senyawa kompleks enzim berasal dari sel hidup (Considine, 1983). Enzim berasal dari organisme hidup yaitu tanaman, hewan, dan mikroba, karena sangat dibutuhkan dalam proses metabolisme dari setiap organisme (Suhartono, 1989). Enzim memiliki daya katalitik dan spesifitas yang tinggi, dan bekerja dalam keadaan suhu dan pH yang tidak ekstrim. Aktivitas katalitik beberapa enzim dapat dikendalikan sehingga memungkinkan untuk memproduksi enzim (Stryer, 2002). Enzim yang dihasilkan oleh mikroba lebih banyak digunakan karena beberapa alasan yaitu produktivitasnya yang tinggi, pertumbuhan bakteri mudah dan cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk

menghasilkan enzim selulase lebih pendek dan menguntungkan bagi manusia (Alam *et al.*, 2004).

Menurut Winarno (1983) menjelaskan bahwa enzim secara garis besar dibagi menjadi enam kelompok antara lain kelompok enzim oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, dan ligase. Enzim oksidoreduktase merupakan enzim yang mengkatalis reaksi oksidasi atau reduksi suatu substrat. Enzim transferase merupakan enzim yang berperan dalam reaksi pemindahan (transfer) suatu gugus dan enzim ini ikut serta dalam reaksi. Enzim hidrolase merupakan enzim yang menghidrolisis suatu substrat dengan bantuan air. Enzim isomerase merupakan enzim yang mengkatalis reaksi-reaksi isomerisasi. Enzim ligase merupakan enzim yang bekerja mengkatalis pembentukan ikatan-ikatan tertentu. Mekanisme enzim dalam mengkatalis merupakan reaksi yang melibatkan gugus fungsi dari residu asam amino yang terdapat pada sisi aktif enzim. Enzim membentuk ikatan dengan substrat terlebih dahulu sebelum melakukan proses katalisisnya berupa pembentukan ikatan kimia. Enzim dan substrat berikatan pada bagian yang disebut sisi aktif dari enzim (*active site*) (Poedjiaji, 1994).



Gambar 2.2 Representasi Skema Selulolisis

Enzim dibagi menjadi dua macam berdasarkan tempat digunakannya yaitu enzim intraselular dan enzim ekstraselular. Enzim intraselular yaitu enzim yang melangsungkan reaksinya di dalam sel, sedangkan enzim ekstraseluler yaitu enzim yang melangsungkan reaksinya di luar sel (Webb & Dixon, 1979). Enzim intraselular menguraikan senyawa nutrisi untuk digunakan sebagai energi yang dibutuhkan oleh sel, sedangkan enzim ekstraseluler menguraikan senyawa nutrisi disekitar sel sehingga memungkinkan untuk masuk ke dalam sel (Pelczar & Chan, 2007). Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler yaitu bekerja di luar sel untuk memecah makromolekul selulosa menjadi molekul yang lebih sederhana (Duff & Murray, 1996). Enzim ekstraseluler pada umumnya diproduksi ketika terdapat induksi, artinya enzim akan diproduksi ketika terdapat substrat yang sesuai, pada kasus enzim selulase ini substratnya berupa CMC atau selulosa (Lee, 2001).

Enzim selulase merupakan kumpulan dari beberapa enzim yang saling bekerja sama dalam menghidrolisis selulosa, terdapat tiga tipe enzim yaitu kompleks endo β -1,4-glukanase, ekso β -1,4- glukanase, dan β -1,4- glukosidase atau selobiase (Crueger & Crueger, 1984). Kompleks endo β -1,4-glukanase enzim ini memiliki peran dalam memutus ikatan selulosa menjadi selooligosakarida secara acak. Ekso β -1,4- glukanase memotong ujung rantai selulosa menghasilkan molekul selobiosa. β -1,4- glukosidase Enzim ini menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Kim & Hong, 2001). Selulase merupakan enzim yang berperan penting dalam proses biokonversi limbah – limbah organik yang mengandung selulosa menjadi glukosa, makanan ternak, dan etanol (Mandels *et al.*, 1976).

2.3.1. Selulosa

Selulosa merupakan polimer glukosa berbentuk rantai linier yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4 glikosidik. Struktur linier pada selulosa menyebabkan selulosa bersifat tidak larut dalam air (Holtzapple *et al.*, 2003). Selulosa ditemukan di alam dengan jumlah yang melimpah dan terdapat pada kayu, daun kering, dan kapas (Koolman, 2001). Selulosa merupakan komponen

struktural utama dari tumbuhan yang ditemukan pada dinding sel tumbuhan dan ditemukan pada semua tumbuhan tingkat tinggi hingga tingkat rendah dan ganggang (Fengel & Wegener, 1995; Schlegel & Schmidt, 1994).

Salah satu turunan selulosa yang umum digunakan sebagai substrat untuk mendeteksi selulase adalah CMC (*Carboxymethyl cellulose*), cmc larut dalam air dan mampu terdegradasi dengan cepat oleh mikroorganisme (Mandels *et al.*, 1976). CMC merupakan substrat terbaik dalam uji seleksi bakteri selulolitik, dengan konsentrasi 1% merupakan konsentrasi paling optimum (Alam *et al.*, 2004). CMC juga berfungsi sebagai sumber karbon bagi bakteri yang menginduksi sintesis enzim selulase oleh bakteri (Sholihati *et al.*, 2015).

CMC merupakan substrat untuk menginduksi sintesis enzim selulase dan digunakan sebagai sumber selulosa dengan konsentrasi yang digunakan sebanyak 1% (Alam *et al.*, 2004). Enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut bersifat ekstraseluler. Sifat enzim ekstraseluler tersebut terlihat dari terbentuknya zona bening disekitar koloni (Lee & Blackburn, 1974). *Congo red* digunakan sebagai indikator terjadinya proses pemutusan ikatan β -(1,4)-glikosidik dalam medium cmc agar (Hartanti, 2010).

2.4. Identifikasi Gen 16S rRNA

Identifikasi berbasis molekuler memiliki tingkat sensitivitas dan spesifitas yang tinggi dan juga cepat, yaitu dengan analisis gen 16S rRNA (16S *Ribosomal Ribonucleic Acid*/Asam ribonukleat pengkode ribosom 16S (Rinanda, 2011). Menurut Chenool *et al.* (2003) identifikasi menggunakan metode fenotipik dinilai kurang efisien dan kurang akurat karena hanya mengandalkan ekspresi fenotip dibawah kondisi laboratorium dan dapat menyebabkan kesalahan identifikasi. Selain itu metode genotipik lebih banyak diaplikasikan dalam studi identifikasi mikroorganisme dengan menggunakan analisis gen 16S rRNA (Aniandita, 2013).

Carl Woese sebagai pelopor pengembangan identifikasi bakteri menggunakan sekuens 16S rRNA (Cai *et al.*, 2003). Dimulai pada tahun 1980 Carl Woese mengembangkan metode dalam identifikasi spesies bakteri

sekaligus menentukan hubungan kekerabatan bakteri dengan membandingkan kode genetik antar spesies (Jill, 2004). Gen rRNA merupakan gen yang paling konservatif, sehingga gen rRNA pada setiap spesies yang sekerabat adalah sama. Identifikasi menggunakan sekuen 16S rRNA selama 7 tahun 2001 - 2007 telah menghasilkan 215 bakteri spesies baru dan 29 bakteri genus baru yang berasal dari spesimen manusia (Woo *et al.*, 2008).

Alasan praktis penggunaan gen rRNA antara lain kesediaan *database* yang dapat diakses oleh umum. Sifat rRNA yang terkonservasi sehingga memungkinkan untuk mensistesis primer universal yang dapat digunakan untuk proses PCR yang mampu melekat pada sekuen gen rRNA dari ketiga domain yaitu archaea, bacteria, dan eukarya. Daerah konserv tersebut merupakan situs pelekatan primer dalam mengamplifikasi gen 16S rRNA secara in-vitro dari template DNA hasil isolasi (Drancourt *et al.*, 2000). Gen rRNA yang terdapat pada bakteri ada tiga jenis yaitu 5S, 16S, dan 23S. Gen 16S rRNA pada 500 bp dibagian ujung disebut daerah *hypervariable region*, dimana daerah tersebut merupakan daerah yang menjadi ciri khas setiap spesies. Daerah *hypervariable region* inilah yang nantinya digunakan untuk menentukan spesies (Jill, 2004). Identifikasi spesies dengan sekuen gen 16S rRNA digunakan karena memiliki beberapa alasan antara lain yaitu keberadaannya di hampir semua spesies bakteri, fungsinya yang seiring waktu tidak berubah, dan ukuran pasang basa dari gennya yang cukup besar yaitu 1500 bp (Janda & Abbott, 2007).

Identifikasi dengan gen 16S rRNA banyak dilakukan karena gen 16S rRNA bersifat *multi copy* yaitu terdapat 150 – 300 *copy* dalam suatu genom sehingga dapat mempermudah proses mendapatkan gen tersebut. Gen 16S rRNA memiliki daerah konservatif yang merupakan pembeda dari setiap spesies. Gen 16S rRNA ini memiliki evolusi yang berjalan lambat, dan umumnya gen ini merupakan gen yang non fungsional (Avisé 1994; Palys *et al.*, 1997). Gen 16S rRNA memiliki ukuran 1550 pasang basa dan memiliki daerah yang disebut dengan *hypervariable region* pada bagian 500 basa dibagian ujung sekuen, daerah *hypervariable region* merupakan daerah yang khas dari setiap

organisme sehingga daerah tersebut dapat digunakan untuk membedakan antar organisme (Jill, 2004). Gen 16S rRNA telah digunakan untuk menentukan taksonomi, mengetahui keragaman antar spesies, dan pembuatan pohon filogeni (Rinanda, 2011). Perpindahan gen 16S rRNA secara horizontal tidak dapat terjadi sehingga gen tersebut bisa digunakan sebagai penanda spesies, selain itu gen tersebut bersifat universal pada bakteri (Koonin 2003; Santos & Ochman 2004).

Menurut Suryati (2002) penggunaan metode analisis gen ribosomal RNA untuk pengklasifikasian mikroorganisme saat ini merupakan analisis yang cukup akurat. Gen 16S rRNA diketahui memiliki informasi genetik yang cukup lengkap untuk melihat kekerabatan bakteri (Leblond *et al.*, 1996). Teknik analisis 16S rRNA merupakan teknik yang akurat, lebih sensitif, dan cepat jika dibandingkan dengan teknik identifikasi konvensional seperti morfologi, biokimia atau serologi tes, selain itu teknik identifikasi konvensional rentan terhadap perubahan lingkungan (Macrae, 2000).