

Isolasi Bakteri Selulolitik Asal Saluran Pencernaan Rayap Dan Daya Hidupnya Pada Berbagai Substrak Yang Berasal Dari Limbah Pertanian Dan Perkebunan

(Isolation of Cellulolytic Bacteria From tractus digestivus of rayap and daya hidup on some plantation waste)

Vivi Susanti, Mairizal*, Yurleni, Adriani, Fahmida Manin

Program Studi Magister Ilmu Peternakan Pascasarjana Universitas Jambi

*Penulis koresponden: mairizal_fapet@unja.ac.id

Abstract

This study aims to identify isolates that produce cellulase enzymes derived from cellulolytic bacteria from the digestive tract of termites and to determine the best type of substrate as the carrier and survival of these isolates. This research consists of 3 (three) stages. The first stage of research was the isolation of cellulolytic bacteria using descriptive data analysis. The second stage of research was to determine the best carrier for selected cellulolytic isolates, while the third stage was to determine the shelf life of the isolates with the selected substrate as the best carrier by analyzing data using analysis of variance. The results of the first phase of research obtained 3 isolates of cellulolytic bacteria from the best termite digestive tract based on the clear zone index test with isolate code VR52, VR61 and VR81 with clear zone index for each isolate 1.087; 2,250 and 1,710 mm. Based on Gram staining, the three isolates were gram-positive bacteria in the form of bacilli. Maximum enzyme activity in isolate VR61 (*Bacillus sp*) with its enzyme activity (19.91 μ /mL). The results of the second stage study showed that rice bran was the best substrate based on total microbes with a value of 202×10^9 CFU / g. The results of the third stage research showed that the number of cellulolytic bacteria in the selected sub-extract (rice bran) at a storage temperature of 4°C (178.92×10^9 CFU / gr) was more than that of storage at 27°C (101.69×10^9 CFU / gr). This research concludes that the longer the storage time shows a decrease in the number of bacteria and pH in the sub-extract. The best interaction on rice bran sub-extract as a carrier at a storage temperature of 4°C in the second week with the number of cellulolytic bacteria 197.8×10^9 CFU / gr with a pH value of 6.46 and the fourth week of 167.85×10^9 CFU / gr with a pH value of 6.39.

Keywords: Cellulose, Cellulolytic Bacteria, Termites

Pendahuluan

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi khususnya dibidang pertanian, perkebunan dan peternakan telah menghasilkan berbagai macam produk yang dapat dimanfaatkan bagi kesejahteraan masyarakat. Seiring dengan meningkatnya produk tersebut diikuti pula dengan meningkatnya hasil samping serta limbah dari pengolahannya seperti bungkil inti sawit (BIS), onggok, dedak, jerami jagung dan kulit kopi. Namun dalam penggunaannya sering terkendala oleh kandungan serat kasar yang tinggi seperti tingginya kandungan

lignoselulosa. Penurunan kandungan lignoselulosa tersebut dapat dilakukan dengan carabiologis seperti fermentasi dengan menggunakan bakteri selulolitik. Salah satu bakteri selulolitik yang dapat dimanfaatkan dalam proses fermentasi adalah bakteri yang terdapat dalam saluran pencernaan rayap.

Rayap merupakan kelompok serangga yang hidupnya bergantung pada selulosa sebagai sumber makanannya. Kemampuan rayap dalam memanfaatkan selulosa sebagai sumber makanan karena rayap memiliki mikroorganisme simbiotik dalam saluran pencernaannya yaitu

bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik mampu mengubah selulosa menjadi gula sederhana untuk digunakan sebagai sumber karbon dan energi bagi metabolisme dan pertumbuhannya (Mulyasaridkk., 2015). Kemampuan ini disebabkan karena bakteri yang terdapat pada rayap dapat memproduksi enzim selulase.

Menurut Trakunalemsai dkk, (2004) menyatakan bahwa mikroorganisme yang bersimbiosis didalam usus rayap memainkan fungsi fisiologis utama seperti pencernaan selulosa, hemiselulosa, asetogenesis, hidrogenesis, metanogenesis, reduksi sulfat dan fiksasi nitrogen. Saluran pencernaan rayap (*Zootermopsis angusticollis*) mengandung bakteri Gram-positif. Kelompok *Actinomyces* ordo *Actinomycetales* yang meliputi genus *Cellulomonas/Orskovia*, *Microbacterium* dan *Kocuria*, selain itu terdapat juga genus *Afipia*, *Agrobacterium/Rhizobium*, *Brucella/Ochrobactrum*, *Pseudomonas* dan *Sphingomonas/Zymomonas* dari *Proteobacteria* dan *Spirosoma* dari "*Flexibacteriaceae*" yang merupakan bakteri Gram negatif (Wenzel dkk., 2002).

Kelompok bakteri selulolitik dapat dijadikan sebagai inokulum dalam proses fermentasi bahan pakan yang mengandung selulase yang tinggi sehingga dapat merombak bahan pakan tersebut dan meningkatkan kualitasnya sebagai bahan pakan ternak. Berdasarkan hal tersebut telah dilakukan suatu penelitian untuk mengkaji dan mengidentifikasi dari karakterisasi isolate yang menghasilkan enzim selulase yang diperoleh dari bakteri saluran pencernaan rayap dan menentukan jenis substrat terbaik

untuk pengemban dan daya hidup isolate tersebut.

Metode Penelitian

Materi

Alat yang digunakan terdiri dari: timbang analitik, pipet tetes, *spluid* (alat suntik), kartu label, cawan petri, *autoclave*, labu erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung raksi, mikroskop, *object glass*, rak pewarnaan, pembakar bunzen, nampan, *spatula*, kawat ose, *vortex*, *magnetic stirrer*, *mikropipet*, termometer, tabung mikro *Eppendorf*, pH meter Jenway 3505, *hotstirer* IKA RH basic 2, *incubator*, *autoclave* Tommy SX-500, *spreader*, *incubator* TAITEC *Bioshaker* BR-23FP, *Freezer*, *spektrofotometer*, *conter plant*, *laminar air flow* dan set alat *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Bahan yang digunakan: sumber isolat adalah sampel mikroba yang diambil dari saluran pencernaan rayap, NA (Nutrent Agar), alkohol 70%, CMC (Carboxy Methyl Cellulose 1%, pepton 0.075%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 14%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, $\text{CO}(\text{NH}_4)_2$ 0.03%, CaCl 0.03%, FeSO 4.7 H_2O 0.0005%, $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.00016%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.00014, CoCl_2 0.0002%, aquades, pewarna Gram (Gentian violet, Lugol, Etil Alkohol 96% dan Safrarin), oil imersi, spirtus, plastik sampel, dedak, bungkil inti sawit (BIS), daun jagung, kulit kopi, dan onggok.

Metode Penelitian

Penelitian Tahap Pertama

Isolasi Bakteri Selulolitik

Rayap yang digunakan dalam penelitian ini merupakan rayap pekerja (*Macrotermes sp*) yang diambil dari batang sawit yang telah mengalami pelapukan pada lahan

gambut. Isolasi dilakukan melalui dua cara yaitu tusuk dan gerus. Isolasi dengan cara tusuk dilakukan dengan cara menusuk bagian abdomen rayap menggunakan jarum inokulasi kemudian digores secara kuadran pada media agar spesifik mengandung CMC 1%. Selanjutnya Isolasi dan seleksi bakteri dengan melakukan purifikasi (seri pengenceran). Isolasi dilakukan dengan mensuspensikan 1 gram sampel ke dalam 9 ml larutan pepton steril lalu dikocok dan diperoleh pengenceran 10^{-1} . Pengenceran dibuat hingga seri ke- 10^{-10}

Tabung reaksi pada pengenceran 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 dan 10^{10} diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasi ke dalam tiga cawan petri berbeda yang berisi 9 ml media NA (Nutrient Agar) kemudian diinkubasikan selama 24-48 jam pada suhu 37°C . Cawan yang digunakan untuk menghitung kerapatan koloni bakteri, hanya cawan petri yang ditumbuhi 30-300 koloni bakteri. Cawan dengan jumlah koloni bakteri kurang dari 30 ataupun yang melebihi 300 koloni akan diabaikan (Agustini dkk., 2016). Koloni bakteri yang tumbuh kemudian diseleksi dan diisolasi ke media baru. Isolat tersebut ditumbuhkan pada media NA (Nutrient Agar) selama 2×24 jam pada suhu 37°C dengan metode goresan, untuk memperoleh koloni murni (Isdaryanti., 2015).

Isolasi Bakteri selulolitik secara Kualitatif.

Zona transparan (cleared zone) ini terbentuk akibat hidrolisis selulosa menjadi glukosa dalam media padat CMC. Koloni bakteri yang tumbuh disiram dengan Merah Congo 0.1% selama 15-30 menit dan dibilas

menggunakan larutan NaCl 5 M. Hasil positif (+) ditunjukkan dengan adanya zona bening akibat adanya degradasi selulosa oleh enzim selulase. Isolat yang memiliki zona bening terbesar merupakan isolat potensial penghasil selulase. Selanjutnya, isolat tersebut dimurnikan dengan metode kuadran dan diremajakan pada media agar miring Carboxy Methyl Cellulose (CMC). Indeks Selulolitik (IS) dihitung dengan mengukur diameter koloni dan diameter zona jernih yang terbentuk (Downie dkk., 1994).

$$IS = \frac{\text{Diameter Zona Jernih} - \text{Diameter Koloni Bakteri}}{\text{Diameter Koloni Bakteri}}$$

Identifikasi secara sederhana terhadap bakteri selulolitik yang menghasilkan zona bening tertinggi dilakukan dengan Pewarnaan Gram. Pewarnaan gram dilakukan dengan membuat lekapan kering pada kaca objek. Lekapan kering bakteri ditetaskan dengan pewarna ungu kristal dan genangi selama 1 menit, lalu dibilas dengan akuades. Selanjutnya genangi iodine gram selama 2 menit, lalu dibilas kembali. Kemudian dipucatkan dengan meneteskan alkohol 95% keatas lekapan bakteri tersebut hingga sisa pewarna ungu kristal larut. Berikutnya, tetaskan dengan pewarna safranin selama 30 detik lalu dibilas. Lekapan yang telah diwarnai tersebut diamati pada mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Isolasi Bakteri Selulolitik secara Kuantitatif.

Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan diperoleh berdasarkan bobot kering biomassa sel. Satu koloni isolat terpilih ditumbuhkan pada media substrat

Carboxy methyl cellulose 1 % selama 4 hari. Erlenmeyer yang berisi 20 mL substrat *Carboxy methyl cellulose* 1%. Prekultur digoyangkan dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 30°C selama satu malam. Prekultur diambil sebanyak 30 µL dan dimasukkan ke setiap Erlenmeyer berisi media 30 mL mewakili jam 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, dan 144. Kultur dikocok pada kecepatan 200 rpm suhu 30°C selama 6 hari. Pemanenan sel dilakukan berdasarkan waktu yang telah ditentukan. Pengukuran pertumbuhan bakteri selulolitik dapat dilakukan dengan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm.

Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase

Sebanyak 5 ml substrat CMC dan avicel ditambahkan 5 ml enzim ekstrak kasar. Untuk substrat kertas saring, sebanyak 2,5 potong kertas saring 1 x 6 cm² ditambahkan 2,5 ml buffer dan 5 ml enzim ekstrak kasar. Sebanyak 0,05 g substrat yang terpilih ditambahkan 5 ml bufer dan 5 ml enzim ekstrak kasar. Setelah itu reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 µl NaOH 0,2 M atau dengan menginkubasinya pada suhu 100°C selama 15 menit. Untuk substrat CMC campuran substrat-enzim dipindahkan sebanyak 2 ml ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 ml DNS dan segera diinkubasi pada suhu 100°C selama 15 menit. Sebanyak 1 lembar kertas saring 1 x 6 cm² dan 3 ml larutannya (enzim ekstrak kasar dan bufer) dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml DNS kemudian segera diinkubasi pada suhu 100°C selama 15 menit. Setelah selesai waktu inkubasi campuran substrat segera ditambahkan 50 µl NaOH 0.2 M.

Seluruh sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Konsentrasi substrat tiap Erlenmeyer adalah 1% (b/v) kecuali avicel 2% (b/v). Perhitungan aktivitas enzim selulase adalah sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas Enzim selulase} = \frac{(c \times 2 \times p \times 1000)}{(t \times BM)}$$

Keterangan :

C = konsentrasi enzim

P = faktor pengenceran

T = waktu

BM = berat molekul

Penelitian Tahap 2 Menentukan Jenis Substrat Terbaik untuk Pengemban Isolat Terpilih

Setelah didapatkan isolat terpilih maka tahapan selanjutnya adalah menumbuhkan isolat tersebut pada dedak, onggok, bungkil inti sawit (BIS), daun Jagung, dan kulit kopi. Peubah yang diamati pada penelitian ini antara lain adalah pH dengan menggunakan pH meter, dan total mikroba menggunakan colony counter.

Penelitian tahap 3 Menentukan Jenis Substrat Terbaik untuk Pengemban Isolat Terpilih Dilihat dari Daya Simpan

Penelitian tahap ketigapenentuan daya tahan isolat tersebut pada media terbaik dari hasil penelitian pada tahap kedua. Penelitian tahap ketiga menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 2 x 5 dengan 3 ulangan. Faktor I adalah 2 level suhu yaitu 4°C (suhu lemari es) dan 27°C (suhu kamar). Faktor II adalah lama penyimpanan yaitu 0, 2, 4, 6 dan 8 minggu. Data dianalisis dengan menggunakan analisis ragam dari RAL pola faktorial (Steel dan Torrie, 1993). Perbedaan antar

perlakuan diuji dengan uji jarak berganda Duncan (DMRT).

**Hasil Dan Pembahasan
Penelitian Tahap Pertama
Isolasi Bakteri Selulolitik.
Morfologi Sel**

Isolasi bakteri selulolitik menggunakan substrak CMC telah berhasil didapatkan 12 isolat. Berdasarkan hasil dari pengamatan morfologi koloni bakteri secara rinci dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Isolasi Bakteri Selulolitik Berdasarkan Morfologi

No	Kode Sampel	Morfologi	
		Tepian	Elevasi
1	VR51	Seperti ikal rambut	Berbukit-bukit
2	VR52	Seperti ikal rambut	Seperti tombol
3	VR53	Seperti wol	Seperti kawah
4	VR61	Siliat	Seperti tetesan
5	VR62	Seperti ikal rambut	Seperti tombol
6	VR63	Seperti wol	Berbukit-bukit
7	VR71	Tidak beraturan	Berbukit-bukit
8	VR72	Tidak Beraturan	Berbukit-bukit
9	VR73	Seperti wol	Seperti kawah
10	VR81	Seperti ikal rambut	Seperti tombol
11	VR82	Seperti ikal rambut	Seperti tetesan
12	VR83	Siliat	Seperti kawah

Berdasarkan hasil dari pengamatan morfologi koloni bakteri pada media CMC memiliki bentuk morfologi yang berbeda-beda. Bentuk tepian seperti ikal rambut lebih dominan berbentuk

tombol. Perbedaan ini disebut dengan karakteristik kultur yang dapat digunakan sebagai dasar untuk memisahkan bakteri dalam kelompok taksonomik. Menurut Aninditia dkk., (2013) bahwa Isolat bakteri yang diamati secara morfologi koloni dapat dilihat dari bentuk koloni, warna, tepian dan elevasi. Selanjutnya Menurut Breed dkk., (1957) Koloni bakteri *Bacillus* bersifat aerobik sampai fakultatif anaerobik, berbentuk koloni kasar, tidak dapat ditembus cahaya, pertumbuhan tidak merata, terjadi

dibandingkan dengan bentuk tepian tidak beraturan, seperti wol, seperti benang, siliat dan tidak beraturan. Sedangkan bentuk morfologi elevasi lebih dominan berbentuk berbukit-bukit dibandingkan dengan

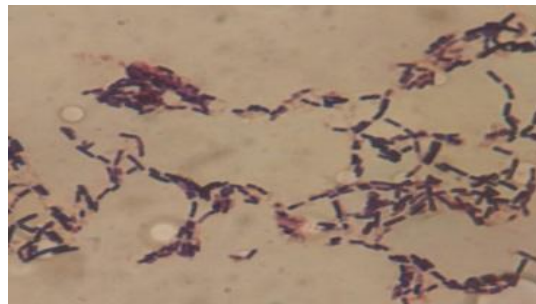
kekeruhan, permukaan halus, lembut dan tipis, opaque, berwarna kuning sampai jingga coklat.

Uji Pewarnaan Gram

Penentuan karakterisasi isolat bakteri meliputi uji selulolitik (*screening*) dan pewarnaan gram. Uji selulolitik dilakukan dengan mengkarakterisasi isolat menggunakan media tumbuh differensial yakni CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*). Isolat bakteri dikatakan sebagai pendegradasi selulosa apabila dapat membentuk zona bening pada media CMC

tersebut. Isolat positif terhadap selulosa selanjutnya dikarakterisasi dengan pewarnaan Gram. Identifikasi pewarnaan Gram adalah salah satu prosedur yang paling banyak digunakan untuk membedakan dua kelompok besar bakteri, yaitu Gram positif dan Gram negatif. Pada saat pewarnaan Gram, bakteri yang tetap berwarna ungu digolongkan ke dalam Gram positif,

sedangkan bakteriberwarna merah digolongkan ke dalam Gram negatif (Pratiwi, 2008). Selanjutnya menurut Safika dkk., (2017) Bakteri gram positif akan menunjukkan warna biru keunguan (violet), sedangkan bakteri gram negatif akan menunjukkan warna merah muda ketika diamati melalui mikroskop. Hasil penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Pengamatan Uji Pewarnaan Gram

Hasil pengamatan untuk semua isolat menunjukkan bahwa bakteri selulolitik asal saluran pencernaan rayap bersifat gram positif (+). Hal ini sesuai dengan pendapat Wenzel dkk., (2002) bahwa saluran pencernaan rayap (*Zootermopsis angusticollis*) mengandung bakteri Gram-positif. Kelompok *Actinomycetes* ordo *Actinomycetales* yang meliputi genus *Cellulomonas/Orskovia*, *Microbacterium* dan *Kocuria*, serta bakteri Gram-positif dari ordo *Bacillales* yang meliputi genus *Bacillus*, *Brevibacillus* dan *Paenibacillus*.

Perbedaan warna antara bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif disebabkan perbedaan pada struktur, komposisi dinding sel bakteri, dan perbedaan permeabilitas diantara kedua kelompok dinding sel bakteri.

Kompleks ungu kristal-iodium, yang telah memasuki dinding sel selama langkah awal dalam proses pewarnaan, dapat diekstraksi, oleh sebab itu organisme Gram negatif kehilangan warna tersebut maka terbentuk warna merah pada media. Kandungan lipid yang lebih rendah sehingga dinding sel bakteri Gram positif menjadi terdehidrasi selama perlakuan dengan etanol. Ukuran pori-pori mengecil, permeabilitasnya berkurang, dan kompleks ungu kristal-iodium tidak dapat terekstraksi (Pelczar dan Chan, 2006).

Identifikasi Bakteri Selulolitik secara Kualitatif

Hasil penelitian indeks selulolitik (zona bening) dari isolat bakteriselulolitik asal saluran pencernaan rayap dapat dilihat pada Tabel 2.

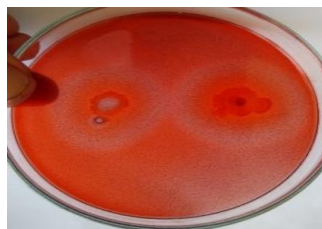
Tabel 2. Indeks Selulolitik (IS) dari Isolat Bakteri Asal Saluran Pencernaan Rayap

No	Kode Isolat	IS (CMCase) (mm)
1	VR51	1,08
2	VR52	2,53
3	VR53	1,57
4	VR61	3,50
5	VR62	1,43
6	VR63	0,68
7	VR71	0,60
8	VR72	0,75
9	VR73	1,86
10	VR81	2,50
11	VR82	2,41
12	VR83	1,86

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa indeks selulolitik tertinggi pada isolate VR61 yaitu 3,50 mm selanjutnya secara berurutan pada isolate VR52 yaitu (2,53 mm), VR81 yaitu (2,50), VR82 yaitu (2,41 mm), VR73 yaitu (1,86 mm), VR83 yaitu (1,86 mm), VR53 yaitu (1,57 mm), VR62 yaitu (1,43 mm), VR51 yaitu (1,08 mm), VR72 yaitu (0,75 mm), VR63 yaitu (0,68 mm) dan VR71 yaitu (0,60 mm). Dari ke-12 isolat dipilih tiga isolat dengan indeks selulolitik tertinggi. Tiga Isolat bakteri selulolitik diantaranya VR61, VR52 dan VR81 menunjukkan aktivitas bakteri selulolitik yang baik dibandingkan isolat lainnya.

Menurut Ochoa-Solano dan Olmos-soto (2006), menyatakan bahwa isolat yang menghasilkan

diameter zona bening dua kali diameter koloni merupakan produksi enzim potensial. Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil akhir yang diperoleh pada proses degradasi diantaranya yaitu pH, akses terhadap karbon (kecocokan konformasi enzim dengan substrat), reaksi redoks yang terjadi dan konsentrasi produk (Ambriyanto, 2010). Potensi selulolitik juga dapat diketahui dalam mensekresikan enzim selulase melalui pengujian indeks selulolitik berdasarkan zona bening yang terlihat disekitar koloni bakteri yang tumbuh pada medium (*Carboxy methyl cellulose*) CMC, (Zahidah dan Shovitri, 2013). Hasil pengamatan indeks zona bening tersaji pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Pengamatan Zona Bening pada Isolat Terpilih

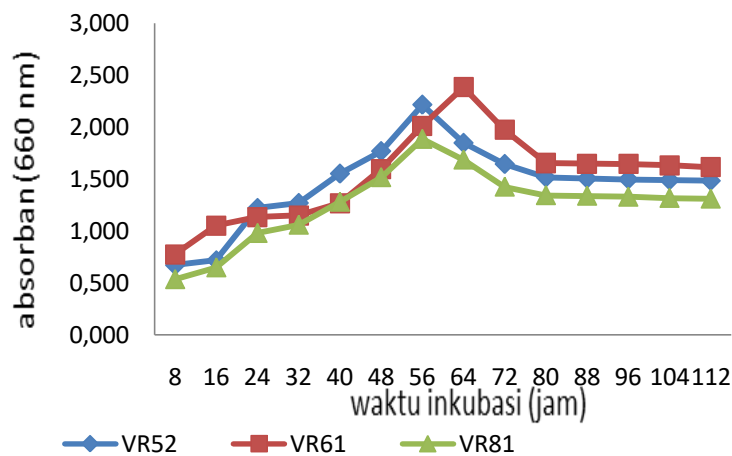
Indeks zona bening yang terbentuk pada penelitian ini lebih kecil dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Budi, dkk., (2016) yang mengisolasi bakteri selulolitik dari tanah menghasilkan zona bening tertinggi yaitu 45,59 mm. Sedangkan Menurut Dar, dkk., (2015) bahwa zona bening yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik yang memiliki diameter di atas 4 cm dapat dikategorikan tingkat degradasi yang dihasilkan tinggi sedangkan degradasi yang rendah berada di kisaran 0,5-1,9 cm dan sedang 2,0-3,9 cm. Menurut Zverlova dkk. (2003) menyebutkan bahwa zona bening yang terbentuk terkait dengan kelarutan dari enzim selulase. Semakin tinggi tingkat kelarutan suatu enzim maka

akan semakin besar zona bening yang terbentuk.

Identifikasi Bakteri Selulolitik secara Kuantitatif.

Kurva Pertumbuhan Bakteri

Dari 12 isolat yang terpilih dilihat dari zona bening tertinggi diperoleh 3 isolat dengan zona bening yang tertinggi yaitu VR52, VR61 dan VR 81 untuk diuji lebih lanjut pada tingkat pertumbuhan dan aktivitas enzimnya. Dari hasil ini juga dapat ditentukan suatu bakteri dapat digunakan sebagai bibit (*inokulum*) karena memiliki pertumbuhan yang optimal. Hasil penelitian pertumbuhan bakteri selulolitik asal saluran pencernaan rayap dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar3 . Kurva Pertumbuhan Bakteri Selulolitik

Dari kurva pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa tingkat pertumbuhan bakteri yang maksimum pada isolate VR61 selanjutnya isolate VR52 dan VR81. Pertumbuhan bakteri dengan memanfaatkan ketersediaan nutrisi sebagai sumber karbon dalam media akan menentukan

perubahan dan kecepatan pertumbuhan pada suatu isolate. Apabila sumber karbon yang berbeda dalam media maka pertumbuhan bakteri juga akan berbeda.

Fase adaptasi pada ketiga isolate berlangsung hingga ke 8 jam

selanjutnya fase eksponensial pada isolate VR52 dan VR81 berlangsung dari ke 8 jam hinggake 56 jam sedangkan pada isolate VR61 berlangsung dari ke 8jam hinggake 64jam. Fase statis pada isolate VR52 dan VR81 berlangsung padake 56 jam sedangkan pada isolate VR61 berlangsung pada ke 64 jam. Fase kematian pada isolate VR52 dan VR81 berlangsung darike 56 jam hinggake 80 jamedangkan isolate VR61 berlangsung darike 64jam hinggake 80 jam.

Fase eksponensial ketiga isolat tersebut pertumbuhan bakteri selulolitik (*Bacillus sp*) berlangsung dengan penyesuaian diri dengan media tumbuhnya sehingga secara bertahap mulai memanfaatkan glukosa sebagai sumber karbon yang lebih sederhana. Menurut Kosim (2010), fase logaritma merupakan fase dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan eksponensial, sehingga kebutuhan energi bakteri *Bacillus subtilis* pada fase ini lebih tinggi dibandingkan fase lainnya.

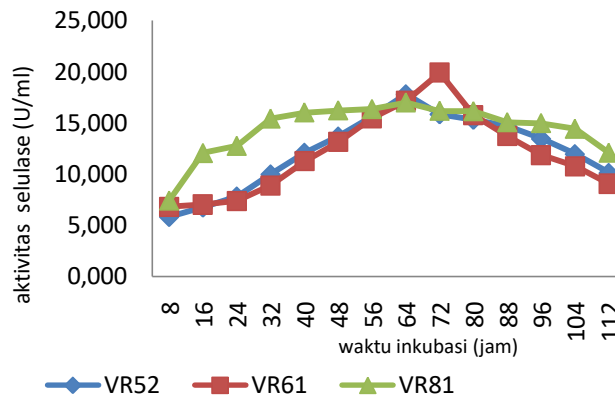
Pada penelitian ini fase stasioner berada pada ke 56jam hinggake 64jam. Pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Ukuran sel pada fase ini

lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat nutrisi sudah habis. Karena kekurangan zat nutrisi, maka kemungkinan sel tersebut mempunyai komposisi berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritma .Pada fase ini sel-sel menjadi lebih tahan terhadap keadaan media tumbuhnya secara perlahan bakteri mulai masuk pada fase kematian.

Fase kematian jumlah populasi bakteri semakin berkurang karena persaingan zat makanan antar bakteri. Menurut Baker dkk., (2004) Pertumbuhan bakteri dengan memanfaatkan ketersediaan nutrisi sebagai sumber karbon dalam media akan menentukan perubahan dan kecepatan pertumbuhan pada suatu isolat. Apabila sumber karbon yang berbeda dalam media maka pertumbuhan bakteri juga akan berbeda.

Aktivitas Enzim Selulase dari Isolat Terpilih

Degradasi selulosa merupakan hasil kerja tiga komponen enzim secara sinergis, yaitu *endoglukanase*, *eksoglukanase*, dan *β-glukosidase* (Lynd dkk., 2002). Hasil pengukuran aktivitas enzim selulase yang dihasilkan dari bakteri selulolitik menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540μ/mL dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4 . Kurva Aktivitas Enzim Selulase

Dari kurva pada Gambar 4 dapat dilihat bahwa aktivitas enzim selulase dari ketiga isolat menunjukkan bahwa aktivitas enzim maksimum pada isolate VR61 (*Bacillus sp*) dengan aktivitas enzimnya (19,91 μ /mL) yang terjadi pada pengukuran ke 9 yaitu ke 72 jam. Selanjutnya diikuti isolate VR52 (*Bacillus sp*) dengan aktivitas enzimnya (17,81 μ /mL) dan isolate VR81 (*Bacillus sp*) dengan aktivitas enzimnya (17,04 μ /mL). Hal tersebut menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri selulolitik (*Bacillus sp*) dan kemampuannya untuk menghasilkan enzim selulase tertinggi pada pengukuran ke 8 hingga pengukuran ke 9 yaitu pada ke 64 jam hingga ke 72 jam. Aktivitas enzim hingga ke 16 jam pada isolate VR52 dan VR61 belum mengalami peningkatan secara drastis namun pada isolate VR81 mulai meningkat pada titik awal. Peningkatan aktivitas enzim selulase ketiga isolat mulai terlihat pada ke 16 jam hingga ke 64 jam sampai ke 72 jam. Aktivitas enzim sejalan dengan laju pertumbuhan bakteri, pada fase logaritma laju pertumbuhan bakteri sangat cepat sehingga jumlah enzim yang dihasilkan ikut meningkat. Menurut

Sulistyaningtyas dkk., (2013) bahwa ketika pertumbuhan bakteri mengalami peningkatan dan sangat efektif dalam mensintesis enzim secara maksimal. Selain itu menurut Ward (1983) menyatakan bahwa pembentukan enzim mulai meningkat memasuki fase eksponensial dan meningkat lebih cepat ketika akan memasuki fase stasioner.

Hasil pengukuran aktivitas enzim selulase sejalan dengan kurva pertumbuhan bakteri selulolitik. Sesuai dengan pendapat Fardiaz (1988) bahwa produksi enzim dalam suatu bioproses memerlukan beberapa faktor, antara lain jenis mikroba, kurva pertumbuhan, dan kondisi optimum untuk meningkatkan aktivitas enzim. Selanjutnya menurut Wang (2004) bahwa suhu optimal konformasi enzim berada dalam keadaan paling sesuai berikatan dengan substrat sehingga enzim lebih aktif dalam mengkatalisis reaksi. Berdasarkan hasil penelitian Tahap pertama dapat diambil kesimpulan bahwa isolate dengan kode VR61 merupakan isolate terpilih yang akan digunakan untuk sumber bakteri selulolitik (*Bacillus sp*).

Penelitian tahap ke 2
Menentukan Jenis Substrat Terbaik
untuk
Pengemban Isolat Terpilih

terpilih dari limbah pertanian dan perkebunan yang dilihat dari total mikroba dan nilai pH dapat dilihat pada Tabel 3:

Hasil penelitian jenis substrat terbaik untuk pengemban isolat Tabel 3. Pengaruh Jenis Substrat terhadap Total Bakteri selulolitik dan pH pada Substrat

Perlakuan	Peubah yang Diamati	
	Total Mikroba (10^9 CFU/mL)	Ph
Dedak	202 ^a	6,59 ^a
BIS	105 ^b	6,59 ^a
Daun Jagung	79 ^b	6,62 ^a
Kulit Kopi	89 ^b	6,05 ^b
Onggok	86 ^b	6,30 ^{ab}

Ket : Superskrip huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0.05$)

Berdasarkan analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan substrat menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap total bakteri. Uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa substrak dedak berbeda nyata ($P < 0.05$) terhadap substrak BIS, daun jagung, kulit kopi dan onggok yang diberi isolate terpilih (VR61), sedangkan substrak BIS, daun jagung, kulit kopi dan onggok tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Pada Tabel 4 juga dapat dilihat bahwa jumlah mikroba yang tumbuh pada substrak dedak lebih tinggi ($2,02 \times 10^{11}$ CFU/gr) dibandingkan dengan substrak BIS ($1,05 \times 10^{11}$ CFU/gr), daun jagung ($7,9 \times 10^{11}$ CFU/gr), kulit kopi ($8,9 \times 10^{10}$ CFU/gr) dan onggok ($8,6 \times 10^{10}$ CFU/gr). Hal ini diduga karena jumlah kandungan nutrisi yang tersedia untuk media tumbuh bakteri selulolitik pada dedak padi lebih tinggi jika dibandingkan dengan BIS, daun jagung, kulit kopi dan onggok. Menurut Wznadkk., (2009) bahwa dalam dedak padi

sebagai pengemban probiotik terdapat 40×10^{22} CFU/gram *Bacillus amyloliquefaciens* dalam bentuk spora.

Pertumbuhan bakteri membutuhkan air, nitrogen, karbon, vitamin dan mineral yang ada pada suatu bahan sebagai media tumbuhnya. Nutrisi yang diperlukan antara lain adalah karbon yang ditemukan dalam bentuk CO, metana, karbohidrat kompleks maupun karbohidrat sederhana (Rahayu dan Nurwitri, 2012). Menurut Lu dan Luh (1991) Karbohidrat utama di dalam dedak padi adalah hemiselulosa 8,7-11,4%, selulosa 9-12,8%, Protein 11-12%, pati 5-15% dan β -glucan 1 persen. Sedangkan menurut Lubis dkk., (2002) bahwa komposisi kimia bededak padi cukup tinggi: protein 11,3-14,4%, lemak 15,0-19,7%, serat kasar 7,0-11,4%, karbohidrat 34,1-52,3% dan abu 6,6-9,9%. Kandungan nutrisi bungkil inti sawit protein kasar 11,03%, serat kasar 14,76%, lemak kasar 13,67%, dan kandungan abu

3,48% (Yana dkk., 2013). Kulit buah kopi mengandung selulosa sebesar 41,26% (Luluk dkk., 2014). Sedangkan menurut sumihati dkk., (2011) kulit kopi mengandung serat kasar 18,69%; tanin 2,47%; kafein 1,36%; lignin 52,59%; lemak 1,07%; abu 9,45%. Kandungan selulosa onggok sekitar 39,37% (Wicaksono dkk, 2013). Menurut Samsul Bahri (2015) kandungan selulosa daun jagung berkisar antara 38,66 - 45,33% dan kandungan lignin berkisar antara 2 -8%.

Degradasi selulosa akan melibatkan kompleks enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroba selulolitik (Wainwright, 2002), yaitu *endo-beta-glucanase* dan *beta glucosidase*. Menurut Sudirman (2011) bahwa disamping sumber mikroba yang menentukan aktifitas pencernaan serat, juga sangat ditentukan oleh media tumbuh bakteri, dosis inokulum, keseragaman jenis, dan populasi bakteri yang digunakan. Pardede (1994) menyatakan bahwa dedak padi memberikan prioritas bagi medium fermentasi, karena mengandung protein orizenin (protein dengan nilai gizi tinggi karena banyak mengandung asam amino esensial) dan mengandung asam lemak tak jenuh yang relatif tinggi (asam lemak oleat, linoleat dan palmitat).

Selanjutnya menurut Pardede (1994) bahwa dedak padi dapat digunakan sebagai substrat dalam fermentasi medium karena dedak merupakan sumber vitamin B dan E, serta berbagai mineral seperti K, Ca, P, Mg, dan Fe. Selanjutnya dikatakan bahwa dedak padi mengandung protein 13,30%, lemak 15,80%, abu

10,40%, dan karbohidrat 50,80% serta mengandung beberapa mineral dan vitamin seperti Ca, P, Na, tiamin, riboflavin, dan niasin.

Pada Tabel 3 memperlihatkan bahwa nilai pH pada penggunaan isolate terpilih pada substrak dedak tidak berbeda nyata ($P>0.05$) terhadap isolate pada substrak bungkil inti sawit, daun jagung dan onggok, tetapi berbeda nyata ($P<0.05$) terhadap isolat kulit kopi. Sedangkan nilai pH pada substrak BIS, kulit kopi dan onggok tidak berbeda nyata. Nilai pH substrak terendah pada kulit kopi (6,05) selanjutnya secara berurutan BIS (6,23), onggok (6,30), dedak (6,59) dan daun jagung (6,62).

Nilai pH pada penelitian ini berkisar antara 6,05 - 6,62. Hal ini sejalan dengan penelitian Howard dkk., (2003) bahwa bakteri *Bacillus sp* dapat tumbuh pada media yang mempunyai pH pada kisaran 5 sampai 7. Hasil penelitian Wizna., dkk (2012) nilai pH pada pengemban bekatul yang ditumbuhkan oleh bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* sebagai probiotik yaitu 6,34. Nilai pH pada hasil penelitian ini masih dalam kisaran normal sehingga bakteri selulolitik dapat tumbuh dengan baik meskipun jumlahnya berbeda antara masing-masing substrak. Pada penelitian tahap kedua ini disimpulkan bahwa substrak dedak lebih baik untuk dijadikan pengemban dibandingkan dengan daun jagung, bungkil inti sawit, onggok dan kulit kopi sehingga dedak padi ini akan dijadikan sebagai pengemban dan akan diukur viabilitasnya pada tahap ketiga.

Penelitian Tahap Ketiga
Pengembangan Isolat Terpilih Dilihat dari Daya Simpan

Beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan aktivitas enzim yang dihasilkan oleh suatu bakteri pada penyimpanan suatu substrak. salah satunya adalah

suhu dan pH. pada penelitian ini telah diperoleh hasil daya simpan pengembangan isolat terpilih pada substrak (dedak padi) yang di uji dengan pengukuran pH dan total plate count (TPC) yang dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 5.

Tabel 5. Total Plate Count pada Substrak Dedak Padi dengan Penyimpanan Suhu 27°C dan 4°C.

Faktor A	Faktor B					Total	Rataan
	B0	B1	B2	B3	B4		
A0	266,88 ^a	76,63 ^d	65,85 ^d	63,70 ^{de}	35,38 ^e	508,43	101,7 ^a
A1	266,88 ^a	197,80 ^{ab}	167,85 ^b	141,83 ^{bc}	120,25 ^c	894,60	178,92 ^b
Total	533,75	274,43	233,70	205,53	155,63		
Rataan	266,88 ^a	137,21 ^{de}	116,85 ^{cd}	102,76 ^c	77,81 ^b		

Ket: A0: Suhu Penyimpanan 27°C, A1: Suhu Penyimpanan 4°C, B0 : Lama Penyimpanan 1 Minggu, B1 : Lama Penyimpanan 2 Minggu, B2 : Lama Penyimpanan 4 Minggu, B3 : Lama Penyimpanan 6 Minggu, B4 : Lama Penyimpanan 8 Minggu

Tabel 5. pH pada Substrak Dedak Padi dengan Penyimpanan Suhu 27°C dan 4°C.

Faktor A	Faktor B					Total	Rataan
	B0	B1	B2	B3	B4		
A0	6,63 ^a	6,24 ^e	6,05 ^e	5,90 ^f	5,81 ^g	30,62	6,12 ^a
A1	6,63 ^a	6,46 ^b	6,39 ^c	6,25 ^d	6,22 ^e	31,95	6,39 ^b
Total	13,26	12,70	12,44	12,15	12,03		
Rataan	6,63 ^a	6,35 ^b	6,22 ^c	6,07 ^d	6,01 ^e		

Ket: A0: Suhu Penyimpanan 27°C, A1: Suhu Penyimpanan 4°C, B0 : Lama Penyimpanan 1 Minggu, B1 : Lama Penyimpanan 2 Minggu, B2 : Lama Penyimpanan 4 Minggu, B3 : Lama Penyimpanan 6 Minggu, B4 : Lama Penyimpanan 8 Minggu.

Berdasarkan analisis ragam pada Tabel 4 dapat dilihat bahwa isolat terpilih dengan bahan pengembangan dedak padi serta lama penyimpanan dan suhu yang berbeda menunjukkan pengaruh nyata pada total mikroba. Pada tabel dapat dilihat bahwa pada suhu 27°C rata-rata mikroba yang teridentifikasi lebih sedikit (101,7 x 10⁹CFU/gr) dibandingkan dengan pada suhu 4°C (178,92 x 10⁹CFU/gr). Hal ini dikarenakan pada suhu 4°C isolat mikroba masih dalam keadaan

dorman artinya aktivitas metabolik bakteri melambat sehingga jumlah mikroba yang teridentifikasi lebih tinggi dibandingkan dengan pada suhu 27°C. Sesuai dengan pendapat Bilang dkk., (2018) tekanan osmotik selama masa penyimpanan, membuat bakteri dalam keadaan dorman atau tidur yang menyebabkan bakteri tidak mampu melakukan aktifitas metabolisme selama proses penyimpanan pada suhu 4°C.

Pada Tabel 4 dapat dilihat bahwa daya simpan substrak dedak padi sebagai pengemban pada suhu 27°C hasil tertinggi pada lama penyimpanan 0 hari diperoleh jumlah bakteri 266,88 x 10⁹CFU/gr; selanjutnya di ikuti pada lama penyimpanan 2 minggu 14 hari diperoleh jumlah baktri 76,63 x 10⁹CFU/gr; lama penyimpanan 4 minggu (28 hari) diperoleh jumlah bakteri 65,85 x 10⁹CFU/gr; lama penyimpanan 6 minggu (42 hari) diperoleh jumlah bakteri 63,70 x 10⁹CFU/gr dan lama penyimpanan 8 minggu (56 hari) diperoleh jumlah bakteri 35,38 x 10⁹CFU/gr. Substrak dedak padi dapat disimpan sampai dengan minggu ke 8. Selama penyimpanan dikarenakan tidak semua bakteri dapat bertahan hidup pada kondisi suhu tersebut, beberapa bakteri mempunyai tingkat viabilitas yang berbeda dimana bakteri yang viabilitas rendah akan lebih cepat mengalami kematian dan beberapa yang lain akan tetap bertahan hidup. Menurut Akalin dkk. (2004) menyatakan bahwa tidak semua bakteri mempunyai daya tahan yang sama selama penyimpanan. Pada lama penyimpanan minggu ke 6 dan minggu ke 8 pada suhu 27°C pengemban isolat pada sustrak dedak padi telah memasuki fase stasioner dan menuju fase kematian sehingga jumlah bakteri yang terkandung pada isolate lebih sedikit dari sebelumnya.

Rata-rata jumlah bakteri pada substrak pada penelitian yang disimpan pada suhu 27°C dari 0 hari sampai dengan minggu ke 8 (56 hari) diperoleh hasil 101,7x

10⁹CFU/gr. Menurut Rahayu, (2013) suhu yang tinggi akan meningkatkan energi kinetik dari enzim, sehingga gerakan vibrasi, rotasi, dan substrat akan meningkat. Pada keadaan tersebut tumbukan yang terjadi antara enzim dengan substrat juga tinggi, sehingga produk yang dihasilkan pun tinggi. Menurut Wang dkk., (2010) pada suhu optimal konformasi enzim berada dalam keadaan yang berikatan dengan substrat sehingga enzim lebih aktif dalam mengkatalisis reaksi.

Daya simpan substrak dedak padi sebagai pengemban pada suhu 4°C hasil tertinggi pada lama penyimpanan 0 hari diperoleh jumlah bakteri 266,88 x 10⁹CFU/gr; selanjutnya sampai dengan lama penyimpanan ke 8 minggu (56 hari) diperoleh jumlah bakteri 120,25 x 10⁹CFU/gr. Semakin lama penyimpanan jumlah bakteri selulolitik pada sustrak akan semakin berkurang.

Substrak dedak padi dapat disimpan sampai dengan minggu ke 8 pada suhu 4°C, namun pada lama penyimpanan samapai minggu ke 8 terjadi penurunan jumlah bakteri sebesar 146,63 x 10⁹CFU/gr. Rata-rata jumlah bakteri pada substrak pada penelitian yang disimpan pada suhu 4°C dari 0 hari sampai dengan minggu ke-8 (56 hari) diperoleh hasil 178,92 x 10⁹ CFU/gr lebih besar dibandingkan dengan penyimpanan pada suhu 37°C sebesar 101,7 x 10⁹CFU/gr. Meskipun jumlah bakteri mengalami penurunan selama penyimpnan namun jumlah tersebut masih dalam keadaan standar minimal jumlah bakteri.

Hasil *Total Plate Count* (TPC) pada penelitian ini berkisar antara $35,38 \times 10^9$ CFU/gr sampai dengan $266,88 \times 10^9$ CFU/gr. Menurut Svensson (1999) dan Vinderolla, dkk (2000) menyatakan bahwa suatu medium pembawa probiotik minimal mengandung mikroba probiotik sebanyak 10^6 - 10^8 CFU/gr atau 10^8 - 10^{10} CFU/gr pada preparat kering.

Berdasarkan analisis ragam pada Tabel 5 dapat dilihat bahwa isolat terpilih dengan bahan pengemban dedak padi serta lama penyimpanan dan suhu yang berbeda menunjukkan pengaruh nyata pada nilai pH. Pada Tabel 5 dapat dilihat bahwa pada suhu 27°C rata-rata pH yang teridentifikasi lebih rendah (6,12) dibandingkan dengan pada suhu 4°C (6,39). Hal ini dikarenakan pada suhu 4°C isolat mikroba masih dalam keadaan dorman artinya aktivitas metabolik bakteri melambat sehingga pH pada substrak dedak sebagai inokulan yang teridentifikasi lebih tinggi dibandingkan dengan pada suhu 27°C . Nilai pH sejalan dengan jumlah bakteri selulolitik pada penyimpanan suhu 4°C dan 27°C selama masa penyimpanan.

Pada Tabel 5 dapat dilihat bahwa pH terendah substrak dedak padi sebagai pengemban pada suhu 27°C pada lama penyimpanan 8 minggu (56 hari) pH yaitu 5,81; selanjutnya di ikuti pada lama penyimpanan 6 minggu (42 hari) nilai pH 5,90; lama penyimpanan 4 minggu (28 hari) nilai pH yaitu 6,05; lama penyimpanan 2 minggu (14 hari) nilai pH yaitu 6,24 dan lama penyimpanan 0 hari pH yaitu 6,63. Substrak dedak padi dapat

disimpan sampai dengan minggu ke 8, namun pada lama penyimpanan minggu ke 2 mulai terjadi penurunan pH hingga minggu ke 8. Hal ini sejalan dengan jumlah bakteri pada substrak pada penyimpanan minggu ke 6, semakin banyak sedikit jumlah bakteri selulolitik asal saluran pencernaan rayap pada substrak dedak padi maka pH pada substrak juga akan semakin rendah. Hal ini dikarenakan bakteri yang telah mengalami kematian bersifat asam sehingga dapat menurunkan nilai pH pada substrak. Rata-rata pH substrak pada penelitian yang disimpan pada suhu 27°C dari 0 hari sampai dengan minggu ke 8 (56 hari) diperoleh hasil 6,12. Menurut Rahayu dkk., (2012) menyatakan bahwa setiap jenis mikroba mampu tumbuh dalam kisaran pH 4,0 hingga 10,5 dan pH optimum yang berbeda. Sedangkan menurut pendapat Suriani dkk., (2013) menyatakan bahwa kisaran optimum untuk pertumbuhan bakteri adalah antara 4 hingga 9.

Substrak dedak padi dapat disimpan sampai dengan minggu ke 8 pada suhu 4°C , namun pada lama penyimpanan sampai minggu ke 8 terjadi penurunan pH. Hal ini ditandai bahwa bakteri selulolitik telah berkurang jumlah dan aktivitasnya pada substrak sehingga banyak bakteri selulolitik yang mengalami kematian. Rata-rata nilai pH pada substrak pada penelitian yang disimpan pada suhu 4°C dari 0 hari sampai dengan minggu ke 8 (56 hari) diperoleh hasil 6,39 lebih tinggi dibandingkan dengan penyimpanan pada suhu 27°C yaitu 6,12. Hal ini diduga karena pada suhu 4°C aktivitas bakteri selulolitik pada

substrak tidak berlangsung dengan baik dibandingkan dengan aktivitas bakteri pada suhu ruang (27°C). sehingga nilai pH pada suhu 27°C lebih rendah dibandingkan dengan suhu 4°C, hal ini sejalan dengan jumlah bakteri selulolitik asal saluran pencernaan rayap pada substrak dedak yang disimpan pada suhu 27°C dan 4°C selama 8 minggu.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diatas, dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat VR61 merupakan isolate bakteri selulolitik terpilih yang diisolasi dari saluran pencernaan rayap yang memiliki aktivitas enzim selulase yang tertinggi yaitu 19,92 µ/mL.
2. Substrat terbaik sebagai bahan pengemban bakteri selulolitik isolate VR61 adalah dedak padi.
3. Interaksi terbaik pada substrak dedak padi sebagai pengemban yaitu pada penyimpanan suhu 4°C pada minggu kedua dengan jumlah bakteri $197,8 \times 10^9$ CFU/gr nilai pH 6,46 dan minggu keempat dengan jumlah bakteri $167,85 \times 10^9$ CFU/gr dengan nilai pH 6,39.

Saran

Perlu dilakukan uji lanjutan untuk aplikasi bakteri selulolitik dengan bahan pengemban dedak padi untuk teknologi pakan ternak seperti untuk fermentasi bahan pakan mengandung serat kasar yang tinggi terutama mengandung selulosa yang tinggi.

Daftar Pustaka

Agustini dan Luciasih. 2016. Isolat dan karakterisasi enzimatik mikroba *lignoselulolitik* di tiga

tipe ekosistem taman nasional. Jurnal penelitian hutan dan konservasi alam: 197-210. 2016.

- Akalin A.S, F. Serap and A. Necati. 2004. Viability and activity of *bifidobacteria* in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. International Journal of Food Science and Technology, 39(6):613-621(9).
- Aninditia S., Anto B., Endang K. 2013. Isolasi dan karakterisasi morfologi koloni bakteri asosiasi alga merah (*rhodophyta*) dari perairan kutuh Bali. Jurnal Biologi, Volume 2 No 2, April 2013. Hal.11-17.
- Budi, P.S., Gunam, I.B.W dan Anggraeni, A.A.M.D. 2016. Uji potensi bakteri selulolitik dari lahan pertanian yang tercemar pestisida. Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri. 4(1): 31- 35.
- Dar, M.A., Pawar, K.D., Jadhav J.P., dan Pandit R.S. 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the gastrointestinal tract of *achatina fulica* (*gastropoda: pulmonata*) and their evaluation for cellulose biodegradation. International Biodeterioration and Biodegradation. 98: 73-80.
- Downie B. Hilhorst HWM. Bewley JD. 1994. A New assay for quantifying endo-β-D-Mannanase activity using congo red dye. Phytochemistry 36: 829- 835.
- Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS. 2002. Microbial

- cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 506-577.
- Lubis, S., R. Rachmat, Sudaryono., S. Nugraha. 2002. Pengawetan Dedak Dengan Metode Inkubasi. Balitpa Sukamandi, Kerawang.
- Lu, S dan B.S. Luh. 1991. Properties of the rice caryopsis. In *Rice Production*. 2nd ed. Vol. 1. Luh, B.S. (ed). AVI Publishing Co., Westport, CT. pp 389-314.
- Luluk, E., Dyah, S.P., dan Nana, D.S. 2014. Penurunan lignin kulit buah kopi dengan metode organosolve. *Eksergi*, Vol XI, No. 02. 2014 ISSN: 1410-394X.
- Mulyasari., Widanarni, M., Agus Suprayudi., M. Zairin Junior., dan M. Tri Djoko Sunarno. 2015. Selection and identification of cellulolytic bacteria degrading cassava leaf crude fiber (*Manihot esculenta*) isolated from gouramy fish (*Osphronemus gouramy*) digesting tract. *JPB Kelautan dan Perikanan* Vol. 10 No. 2 Tahun 2015: 111-121.
- Ochoa-Salano, J. And Olmos-Soto, J. 2006. The Functional Property Of *Bacillus* For Shrimp Feeds. *Food Microbiology*
- Pelczar, M.J. and E.C.S. Chan. 2006. *Dasar- Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Pardede, HT & Fardiaz, S. 1994. Pemanfaatan Ampas Tapioka, Ampas Tahu dan Dedak Padi untuk Produksi Pigmen Karotenoid dari *Neurospora sp.* dengan Sistem Fermentasi Padat. *Prosiding Pertemuan Ilmiah Tahunan Peranan Mikrobiologi dalam Industri Pangan*. Bogor, Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia. p. 354 - 363.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga, Jakarta.
- Rahayu WP, C.C. Nurwitri. 2012. *Mikrobiologi Pangan*. IPB Press. Bogor
- Rahayu WP. 2013. *Isolasi dan Pencirian Bakteri Mananolitik Pendegradasi Bungkil Inti Sawit*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie, 1991. *Principles and Procedures of Statistic*. Diterjemahkan oleh Bambang Sumatri (1989) dengan judul "Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik". PT. Gramedia, Jakarta.
- Sumihati, M., Widiyanto dan Isroli. 2011. Utilitas Protein Pada Sapi Perah Friesian Holstein Yang Mendapat Ransum Kulit Kopi Sebagai Sumber Serat Yang Diolah Dengan Teknologi Amoniasi Fermentasi (Amofer). *Sintesis* 15:1, 1-7.
- Sulistyaningtyas, A.S., Prasetyawan, S., dan Sutrisno. 2013. Pengaruh penambahan ion Fe^{3+} terhadap aktivitas xilanase dari *Trichoderma viride*. *Kimia Student Journal*. 2 (2) : 470-476.
- Svensson, U. 1999. *Industrial Prespective*. In : G.W. Tannock (Ed.). *Probiotics, a Critical Review*. Horizon Scientific Publisher, England.

- Trakulnaleamsai, S., Yuichi, H., Deevong, P., Noparatnaraporn, N. 2004. Phylogenetic diversity of bacterial symbionts in the guts of wood-feeding termites. *Kasetsart J (Nat Sci)*. 38: 45 – 51.
- Vinderola, C.G., N. Bailo and J.A. Reinheimer. 2000. Survival of probiotic microflora in *Argentinian* yoghurt during refrigerated storage. *Food Res Int* ; 33: 453-457.
- Wainwright, M. 2002. An Introduction to Fungal Biotechnology. John Wiley and Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England.
- Wang NS. 2004. Cellulose Degradation. Biochemical Engineering Laboratory (ENCH 485). University of Maryland. <http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab4.htm> Download: May 3, 2021.
- Wang, H., Yang, S., Wang, Z and Nie, Y. 2010. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste cocomposting system. *Journal Gen Appl Microbial*. 51: 353-360.
- Ward, O.P 1983. Proteinase di Microbial Enzyme And Biotechnology. W.M. Fogart. Applied Science Publisher. New York.
- Wenzel M, I. Schonig, M. Berchtold, P. Kampf and H. Konig, 2002. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Journal of Applied Microbiology* 92: 32–40.
- Wicaksono, Rumpoko, Syamsu, Khaswar, Indah, Y. 2013. Cellulose nanofibers from cassava bagasse characterization, chemistry and material research, 2013, 13(1), 79-88.
- Wizna dan H. Muis. 2012. Pemberian dedak padi yang difermentasi dengan *bacillus amyloliquefaciens* sebagai pengganti ransum komersil ayam ras petelur. *Jurnal Peternakan Indonesia*, Juni 2012 Vol. 14 (2) ISSN 1907-1760. 398.
- Yana, S., Nurhayati dan Chandra, U.W. 2013. Optimalisasi pemanfaatan bungkil inti sawit, gapek dan onggok melalui teknologi fermentasi dengan kapang berbeda sebagai bahan pakan ayam pedaging. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan* Vol. 13 (2): 70-77 ISSN 1410-5020.
- Zahidah, D. dan Shovitri, M . 2013. Isolasi, karakterisasi dan potensi bakteri aerob sebagai pendegradasi limbah organik. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*.
- Zverlova, V V., Holl, W., and Schwarz, H. 2003. Enzymes For Digestion Of Cellulose and Other Polysaccharides in the Gut of Longhorn Beetle Larvae, *Rhagium Inquisitor* L. (Col., Cerambycidae). *International Biodeterioration and Biodegradation*.