

**SKRINING DAN ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM
SELULASE DARI LIMBAH TEBU**



**FANDY SUSANTO
2443008044**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA**

2012

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/
karya ilmiah saya, dengan judul: **Skrining dan Isolasi Bakteri Penghasil
Enzim Selulase dari Limbah Tebu** untuk dipublikasikan atau ditampilkan
di internet atau media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Unika Widya
Mandala Surabaya untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan
Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya
buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 20 Februari 2012



Fandy Susanto
2443008044

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir ini adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Surabaya, 20 Februari 2012



Fandy Susanto
2443008044

**SKRINING DAN ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM
SELULASE DARI LIMBAH TEBU**


SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan
memperoleh gelar Sarjana Farmasi
di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

OLEH:
FANDY SUSANTO
2443008044

Telah disetujui pada tanggal 4 Februari 2012 dan dinyatakan LULUS

Pembimbing I,



Lanny Hartanti S.Si., M.Si.
NIK. 241.00.0437

Pembimbing II,



Lisa Soegianto S.Si., Apt.
NIK. 241.07.0609

ABSTRAK

SKRINING DAN ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM SELULASE DARI LIMBAH TEBU

Fandy Susanto
(2443008044)

Ampas tebu, atau sering disebut sebagai bagasse, memiliki kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin yang tinggi. Bagasse sering dimanfaatkan sebagai media untuk pertumbuhan berbagai mikroorganisme untuk proses sakarifikasi atau produksi enzim, khususnya selulase. Tingginya kandungan selulosa dalam bagasse membuatnya menjadi bahan yang potensial sebagai substrat bakteri selulolitik, penghasil enzim selulase. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi dan skrining bakteri dari limbah tebu tersebut. Pada isolasi bakteri yang dilakukan dengan metode penuangan, digunakan media selektif yang mengandung *carboxyl methyl cellulose* (CMC-Na). Setelah ditemukan koloni yang positif dilanjutkan dengan tahapan pemurnian isolat dan skrining bakteri. Isolat bakteri murni diidentifikasi melalui karakterisasi visual secara makroskopis, mikroskopis, dengan dan tanpa pewarnaan, karakterisasi biokimia. Uji biokimia yang dilakukan secara konvensional adalah uji motilitas, sitrat, glukosa, katalase, oksidase, hidrolase kasein, pembentukan gas, pembentukan H₂S, uji indol, laktosa, sukrosa, dan hidrolisis pati. Hasil uji biokimia konvensional diperkuat dan didukung oleh uji Kit menggunakan *Microbact: Gram-negative identification system*. Berdasarkan hasil perhitungan persentase indeks kesamaan menggunakan koefisien sebanding dapat disimpulkan bakteri selulolitik tersebut memiliki kedekatan karakter dengan spesies *Bacillus pumilus* sebesar 78%. Produksi enzim dilakukan dengan mengkultivasi bakteri dalam media cair yang mengandung CMC-Na pada suhu 37°C selama 24 dan 48 jam, dengan pengocokan 150 rpm. Supernatan hasil sentrifugasi kultur bakteri yang mengandung enzim selulase diuji aktivitas seluloliticnya secara spektrofotometri menggunakan pereaksi asam 3,5-dinitrosalisilat. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas selulolitik enzim yang diperoleh pada waktu produksi 24 jam adalah $0,027 \pm 0,007$ U/ml, sedangkan aktivitas enzim pada waktu produksi 48 jam

sebesar $0,029 \pm 0,009$ U/ml. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan produk berupa 1 mg glukosa per menit pada suhu 37°C dan pH 7,0.

Kata-kata kunci: bagasse, isolasi bakteri, selulolitik, karakterisasi biokimia.

ABSTRACT

SCREENING AND ISOLATION OF CELLULASE PRODUCING BACTERIA FROM SUGARCANE WASTE

Fandy Susanto
2443008044

Sugarcane waste, or often known as bagasse, contains high amount of cellulose, hemicellulose and lignin. It is often used as a medium for the growth of various microorganisms in saccharification process or production of enzymes, especially cellulases. The high content of cellulose in bagasse makes it a potential material as a cellulolytic bacteria substrate, the cellulase producer. Therefore, isolation and screening of bacteria from the sugarcane waste was conducted in this research. Selective media containing *carboxyl methyl cellulose* (CMC-Na) was used in screening and isolation process by pour plate method. The positive colonies were then purified and screened. Pure isolate of bacteria was identified through visual characterization, either macroscopically or microscopically, with and without staining, and several biochemical characterizations. Conventional biochemical assays performed were motility test, citrate, glucose, catalase, oxidase, casein hydrolase, gas formation, the formation of H₂S, indole test, lactose, sucrose, and starch hydrolysis. This result were supported by the results of the Kit *Microbact: Gram-negative identification system*. Based on the calculation result of the percentage of similarity index using coefficient of proportional similarity index, it could be concluded that the cellulolytic bacteria has 78% similarity character to *Bacillus pumilus*. Production of enzyme was conducted by cultivating bacteria in liquid media containing CMC-Na at 37°C for 24 and 48 hours, with 150 rpm shaking. The supernatants containing cellulase from centrifugation of bacteria were then determined their cellulolytic activities by spectrophotometry using 3,5-dinitrosalicylic acid as colorimetric reagent. The results showed that the cellulolytic activity of enzymes from 24 and 48 hours of production time were 0.027 ± 0.007 U/ml and 0.029 ± 0.009 U/ml, respectively. One unit activity is defined as the amount of enzyme that will catalyze the production of 1 mg of glucose per minute at 37°C and pH 7.0.

Keywords: bagasse, bacteria isolation, cellulolytic, biochemical characterization

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur atas segala anugerah dan berkat yang diberikan Tuhan YME kepada penyusun sehingga dapat menyelesaikan laporan berjudul SKRINING DAN ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM SELULASE DARI LIMBAH TEBU sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Dengan terselesaikannya skripsi dan masa studi selama 3,5 tahun tak lepas dari bantuan dan doa dari semuanya. Untuk itu pada kesempatan kali ini penyusun ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Papa, mama, Ko Finly, dan Meme Melly yang telah memberikan dukungan doa, moral, material, dan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik-baiknya.
2. Ibu Lanny Hartanti, M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah menyediakan waktu dan tenaga dalam memberikan bimbingan dan saran yang sangat berguna sampai terselesaikannya skripsi ini.
3. Ibu Lisa Soegianto, S.Si., Apt. selaku Dosen Pembimbing II yang telah menyediakan waktu dan tenaga dalam memberikan bimbingan dan saran yang berguna sampai terselesaikannya skripsi ini.
4. Yonathan Meiky Septian dan Sinta Lingewati sebagai rekan skripsi yang kooperatif sampai terselesaikannya penelitian ini.
5. Ama, Ik Yek, Gracia, Ikcang Ham, Kume, Kuhung, Engku We, Kudi, Ovi, yang sudah memberikan doa dan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.

6. dr. Pikanto Wibowo selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak saran dan masukan-masukan positif yang berguna untuk skripsi ini.
7. Ibu Martha Ervina, S.Si., M.Si., Apt. selaku penguji dan selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala yang telah memberikan banyak saran dan masukan-masukan positif yang berguna untuk skripsi ini.
8. Ibu Catherina Caroline, S.Si, M.Si., Apt. selaku Sekretaris Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala, yang telah menyediakan fasilitas dan pelayanan yang baik selama pengerjaan skripsi ini.
9. Dra. Dien Ariani Limyati yang telah memberikan saran yang berguna untuk skripsi ini.
10. Bapak Henry Kurniawan, S.Si.,M.Si., Apt. selaku wali studi yang telah memberikan semangat, saran dan pengarahan selama penyusunan skripsi ini.
11. Seluruh dosen Fakultas Farmasi yang telah mendampingi selama proses perkuliahan mulai dari semester awal sampai akhir.
12. Seluruh staf di Laboratorium Proteomik *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya yang memberikan banyak bantuan dalam penelitian ini.
13. Pak Anto, laboran Laboratorium Mikrobiologi yang telah menyediakan fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung.
14. Pak Didik, laboran Laboratorium Likuid yang telah menyediakan fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung.
15. Pak Samsul, laboran Laboratorium Solid yang dengan ikhlas membantu dan meminjamkan beberapa peralatan praktikum.
16. Mbak Mega, laboran Laboratorium Instrumen yang telah menyediakan fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung.

17. Bapak penjual tebu di Jalan Ngagel yang dengan baik hati memperbolehkan saya untuk mengambil ampas tebu untuk menjadi sampel dalam penelitian ini dan juga memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.
18. Edwin “Debetu”, Jeni “Debetu”, Cynthia “Debetu”, Messi “Debetu”, Talissa “Debetu”, Lenny “Debetu”, Roy “Debetu”, Risky “Debetu”, yang memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.
19. Ibu Ni’matuzaroh yang sudah membantu untuk menguji sampel bakteri dengan menggunakan Kit dan telah mendoakan skripsi ini agar berjalan lancar.
20. Teman-teman lainnya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang sudah memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.

Penyusun menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Untuk itu penyusun mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari para pembaca untuk penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan siapa saja yang membacanya.

Surabaya, 20 Februari 2012

Fandy Susanto

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
BAB	
1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Tinjauan tentang Tanaman Tebu	5
2.2. Tinjauan tentang Enzim	6
2.3. Tinjauan tentang Selulosa	13
2.4. Tinjauan tentang Enzim Selulase	14
2.5. Tinjauan tentang Pembenuhan Mikroba Selulolitik ..	16
2.6. Tinjauan tentang Morfologi Bakteri	16
2.7. Tinjauan tentang Pewarnaan Bakteri	17
2.8. Uji Biokimia Mikroba	19
2.9. Klasifikasi Bakteri.....	22

BAB	Halaman
3	METODE PENELITIAN 24
	3.1. Sampel, Bahan, dan Alat Penelitian 24
	3.2. Metode Penelitian..... 25
	3.3. Diagram Alir 33
4	HASIL PERCOBAAN DAN BAHASAN 34
	4.1. Hasil Percobaan..... 34
	4.2. Pembahasan 46
5	SIMPULAN 61
	5.1. Simpulan 61
	5.2 Alur Penelitian Selanjutnya..... 61
	DAFTAR PUSTAKA 62
	LAMPIRAN 66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. PEMBUATAN REAGEN	66
B. PEMBUATAN KURVA STANDAR GLUKOSA	67
C. PENENTUAN PANJANG GELOMBANG TERPILIH.....	68
D. HASILPENGUKURAN BLANKO ENZIM	69
E. PENENTUAN AKTIVITAS ENZIM SELULASE DENGAN METODE DNS	70
F. DATA AKTIVITAS ENZIM SELULASE	71
G. KARAKTERISTIK FISILOGIS SPESIES <i>BACILLUS</i>	72
H. PENGELOMPOKAN SPESIES <i>BACILLUS</i>	73
I. PEMBACAAN MICROBACT KIT 12A DAN 12 B	74
J. HASIL UJI FISILOGIS ISOLAT	79
K. PERHITUNGAN ANGKA KOEFISIEN SEBANDING <i>BACILLUS</i>	80

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Perbedaan antara Bakteri Gram Positif dan Bakteri Gram Negatif	19
4.1. Ciri Makroskopis Keenam Koloni Terpilih	35
4.2. Hasil Pengamatan Keenam Koloni Pada Media CMC-Na dengan Penyiraman Larutan <i>Congo-Red</i> 0,1%	36
4.3. Data Hasil Uji Biokimia Secara Konvensional.....	42
4.4. Data Hasil Uji Kit.....	43
4.5. Data Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase pada 24 Jam.....	46
4.6. Data Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase pada 48 Jam.....	46
4.7. Perbandingan Hasil Uji Konvensional dan Uji Kit.....	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Interaksi substrat dan enzim model <i>induced fit</i>	9
2.2. Pengaruh konsentrasi enzim terhadap laju reaksi	10
2.3. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap laju reaksi	11
2.4. Pengaruh suhu terhadap laju reaksi	12
2.5. Pengaruh pH terhadap laju reaksi	13
2.6. Struktur selulosa	14
2.7. Diagram klasifikasi bakteri Gram negatif.....	22
2.8. Diagram klasifikasi bakteri Gram positif.....	23
3.1. Cara uji pada media TSIA	29
3.2. Diagram alir kerja.....	33
4.1. Sampel ampas tebu	34
4.2. Isolat bakteri pada media NA pengenceran 10^{-8} , 10^{-9} , dan 10^{-10}	35
4.3. <i>Clear zone</i> yang terlihat pada isolat.....	36
4.4. Kultur murni bakteri isolat b dalam media padat CMC-Na.	37
4.5. Foto mikroskopis isolat b yang telah murni.....	38
4.6. Hasil beberapa uji biokimia bakteri	39
4.7. Hasil uji katalase	39
4.8. Hasil uji oksidase.....	40
4.9. Hasil uji bakteri selulolitik pada media hidrolisis kasein	40
4.10. Hasil uji bakteri selulolitik pada media hidrolisis pati	41
4.11. Hasil uji bakteri menggunakan Kit Microbact TM : <i>Gram negative identification system</i>	41
4.12. Kultur hasil kultivasi bakteri selulolitik dalam media produksi	44

4.13. Alat sentrifugasi untuk ekstraksi enzim.....	44
4.14. Hasil pemisahan antara enzim selulase dan <i>pellet</i> sel.....	45