

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI SELULOSA
DARI TANAH TEMPAT PEMBUANGAN AKHIR (TPA)
TAMANGAPA ANTANG MAKASSAR**



**FATHIMAH AZ-ZAHRA
H041 20 1027**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI SELULOSA
DARI TANAH TEMPAT PEMBUANGAN AKHIR (TPA)
TAMANGAPA ANTANG MAKASSAR**

**FATHIMAH AZ-ZAHRA
H041 20 1027**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI SELULOSA DARI
TANAH TEMPAT PEMBUANGAN AKHIR (TPA)
TAMANGAPA ANTANG MAKASSAR**

**FATHIMAH AZ-ZAHRA
H041 20 1027**

Skripsi,

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Biologi

pada

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI SELULOSA DARI
TANAH TEMPAT PEMBUANGAN AKHIR (TPA)
TAMANGAPA ANTANG MAKASSAR**

FATHIMAH AZ-ZAHRA

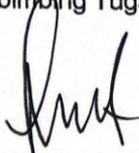
H041 20 1027

Skripsi,

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada tanggal 29
Oktober 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
pada

Program Studi Biologi
Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:
Pembimbing Tugas Akhir,



Prof. Dr. Fahrudin, M.Si
NIP. 196509151991031002

Mengetahui:
Ketua Program Studi



Dr. Magdalena Litaaf, M.Sc
NIP. 196409291989032002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Selulosa dari Tanah Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Tamangapa Antang Makassar" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Prof. Dr. Fahrudin, M.Si). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 19 Agustus 2024



Fathimah Az-Zahra
H041201027

UCAPAN TERIMA KASIH

Assalamu'alaikum Warohmatullahi Wabarokatuh

Segala puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena hanya dengan kasih dan karunia-Nya yang selalu diberikan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Selulosa dari Tanah Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Tamangapa Antang Makassar**". Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan program pendidikan sarjana (S1) di Program Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Makassar.

Tanpa bantuan, motivasi, dan doa dari berbagai pihak penulis tidak dapat menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik-baiknya. Terima kasih tidak terhingga kepada orangtua atas pengorbanannya dalam membimbing dan membesarkan penulis, terima kasih kepada orang tua yang tercinta Bapak Mansyur Maruddin dan Ibu Sudiarti Ishak semoga jerih payahmu dapat penulis teruskan dengan kesuksesan. Terima kasih juga kepada saudari-saudari tercinta penulis Rabiah Al-Adawiyah Mansyur dan Muthmainnah Mansyur yang tidak henti-hentinya mendukung dan menyemangati penulis, doa terbaik untuk kalian.

Terima kasih sedalam-dalamnya kepada Prof. Dr. Fahrudin, M.Si. selaku pembimbing utama atas bimbingan, arahan, waktu, dan kesabaran yang telah diberikan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini, terima kasih atas segala motivasinya sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S-1 Biologi dengan baik dan lancar.

Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. selaku Rektor Universitas Hasanuddin beserta Seluruh Staf.
2. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi.
3. Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin sekaligus merupakan pembimbing akademik dan dosen penguji penulis, terima kasih atas bimbingan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis dari penulis memulai studi hingga penyusunan skripsi saat ini.
4. Ibu Dr. Juhriah, M.Si selaku dosen penguji, terima kasih atas masukan berupa saran maupun kritik yang telah diberikan kepada penulis dalam memenuhi kesempurnaan skripsi ini.
5. Kepada seluruh Dosen Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses perkuliahan. Kepada staf dan Pegawai Departemen Biologi yang telah

banyak membantu penulis baik dalam menyelesaikan administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.

6. Kak Fuad Gani, S.Si, yang telah banyak memberi bantuan terhadap penelitian ini, baik ilmu, bimbingan, kritik dan saran yang sangat berharga bagi penulis.
7. Teman-teman Biotropic (Biologi Angkatan 2020) terkhusus kepada Adiatna Ayu Kamila, Belusyifa Irhamni, Mutmainnah, Eka Purnamasari, Like Ayu Sutrisno, Siti Rofiqoh Atthiyah, terima kasih atas kerja sama dan motivasinya selama ini, semoga kesuksesan menghampiri kita semua.
8. Teman-teman terdekat penulis yaitu Ummu Khairiah M., Inas Huwaida Najdah, Sitti Humaerah Julyaningrum, Siti Ruhama Apriani, dan Nurul Annisa, yang telah setia menemani, memberikan semangat, dan menghibur penulis sehingga penulis bisa menyelesaikan penelitian ini.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah banyak membantu dalam penyusunan skripsi ini hingga selesai.

Pada akhirnya saya berterima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi hingga karya tulis ini terselesaikan. Terima kasih sebesar-besarnya. Semoga Allah memberi rahmat dan melindungi kita semua, Aamiin.

ABSTRAK

Az-Zahra, Fathimah. 2024. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Selulosa dari Tanah Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Tamangapa Antang Makassar (dibimbing oleh Fahrudin).

Sampah organik merupakan jenis limbah yang paling banyak ditemukan di lingkungan sekitar. Namun, masalah pengelolaannya masih belum terselesaikan, sehingga diperlukan solusi yang tepat. Salah satu pendekatan yang ramah lingkungan adalah melalui metode biodegradasi. Di Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Tamangapa Antang Makassar, yang merupakan salah satu TPA terbesar di Sulawesi Selatan, sampah organik mendominasi. Hal ini membuka peluang adanya bakteri yang mampu mendegradasi selulosa. Bakteri tersebut berpotensi menjadi solusi biologis dalam penanganan limbah organik. Oleh karena itu, diperlukan penelitian untuk mengidentifikasi keberadaan serta kemampuan bakteri selulolitik dalam mendegradasi selulosa di tanah TPA Tamangapa Antang. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh dan mengetahui karakteristik isolat bakteri selulolitik yang berada pada tanah TPA Tamangapa Antang. Sampel tanah diambil dari empat titik berbeda di TPA dan diisolasi menggunakan metode kultur agar dengan medium carboxymethyl cellulose (CMC). Bakteri yang diisolasi kemudian diuji kemampuan degradasi selulosa, kemampuan tumbuh dalam medium CMC broth, serta dilakukan karakterisasi morfologi dan biokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 5 isolat yang diperoleh, isolat bakteri dengan kode TS4B memiliki daya degradasi tertinggi sebesar 4,2 mm. Sebaliknya, isolat dengan daya degradasi terendah adalah TS2A dan TS4A, yang memiliki indeks selulolitik sebesar 0,2 mm.

Kata kunci: selulosa, bakteri selulolitik, TPA Tamangapa Antang, degradasi selulosa, *carboxymethyl cellulose* (CMC), isolasi, karakterisasi.

ABSTRACT

Az-Zahra, Fathimah. 2024. Isolation and Characterization of Cellulose Degrading Bacteria from Landfill Soil of Tamangapa Antang Makassar (supervised by Fahrudin).

Organic waste is the most common type of waste found in the surrounding environment. However, the management problem is still unresolved, so an appropriate solution is needed. One of the environmentally friendly approaches is through biodegradation methods. In the Tamangapa Antang Makassar Landfill (TPA), which is one of the largest landfills in South Sulawesi, organic waste dominates. This opens up opportunities for bacteria that are capable of degrading cellulose. These bacteria have the potential to be a biological solution in handling organic waste. Therefore, research is needed to identify the presence and ability of cellulolytic bacteria in degrading cellulose in Tamangapa Antang landfill soil. This study aims to obtain and determine the characteristics of cellulolytic bacterial isolates in Tamangapa Antang landfill soil. Soil samples were taken from four different points in the landfill and isolated using agar culture method with carboxymethyl cellulose (CMC) medium. The isolated bacteria were then tested for cellulose degradation ability, ability to grow in CMC broth medium, and morphological and biochemical characterization. The results showed that of the 5 isolates obtained, the bacterial isolate with the code TS4B had the highest degradation capacity of 4.2 mm. In contrast, the isolates with the lowest degradation power were TS2A and TS4A, which had a cellulolytic index of 0.2 mm.

Keywords: cellulose, cellulolytic bacteria, Tamangapa Antang landfill, cellulose degradation, carboxymethyl cellulose (CMC), isolation, characterization.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGANTAR.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Teori.....	2
1.2.1 Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Tamangapa Antang Makassar	2
1.2.2 Selulosa.....	4
1.2.3 Bakteri Pendegradasi Selulosa	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB II METODE PENELITIAN	7
2.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	7
2.2 Alat.....	7
2.3 Bahan.....	7
2.4 Prosedur Penelitian.....	7
2.4.1 Pengambilan Sampel	7
2.4.2 Analisis Tanah	8
2.4.3 Sterilisasi Alat Dan Bahan	9
2.4.4 Pembuatan Medium	9
2.4.5 Isolasi Bakteri	10
2.4.6 Pemurnian Isolat Bakteri	11
2.4.7 Pembuatan Stok Bakteri.....	11

2.4.8 Uji Kemampuan Degradasi Selulosa.....	11
2.4.9 Uji Kemampuan Tumbuh Bakteri pada Medium CMC	11
2.4.10 Karakterisasi Isolat Bakteri.....	12
2.5 Analisis Data	13
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	14
3.1 Kondisi Tanah TPA Tamangapa Antang Makassar	14
3.2 Isolasi Bakteri Dari Tanah TPA Antang Makassar	17
3.3 Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri metode <i>Spread Plate Count</i> (SPC).....	18
3.4 Pemurnian Isolat Bakteri Pendegradasi Selulosa	19
3.5 Peremajaan Isolat Bakteri Selulolitik	20
3.6 Uji Kemampuan Degradasi Selulosa	20
3.7 Kemampuan Tumbuh Isolat Bakteri pada Medium CMC	22
3.8 Uji Karakteristik Morfologi Dan Biokimia Isolat Bakteri.....	24
3.8.1 Uji Morfologi Koloni Isolat Bakteri	24
3.8.2 Uji Morfologi Sel Isolat Bakteri	25
3.8.3 Uji Biokimia Isolat Bakteri.....	27
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	33
4.1 Kesimpulan	33
4.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34
LAMPIRAN.....	39

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kualitas Sifat Kimia Tanah TPA Tamangapa Antang	15
2. Perhitungan Jumlah Koloni dengan Metode SPC	17
3. Indeks Selulolitik Isolat Bakteri TPA Tamangapa	21
4. Karakteristik Morfologi Koloni Isolat Bakteri Selulolitik TPA Tamangapa	24
5. Karakteristik Morfologi Sel Isolat Bakteri Selulolitik TPA Tamangapa.	26
6. Karakteristik fisiologi Isolat Bakteri Selulolitik TPA Tamangapa.....	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. TPA Tamangapa Antang	3
2. Struktur Kimia Selulosa.....	4
3. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di TPA Tamangapa Antang	8
4. Lokasi Pengambilan Sampel	14
5. Isolasi Bakteri pada Medium CMC Agar	17
6. Pemurnian Isolat Bakteri Selulolitik.....	19
7. Peremajaan Isolat Bakteri Selulolitik pada Medium CMC Agar tanpa Penambahan <i>Congo Red</i>	20
8. Uji Kemampuan Degradasi Selulosa Isolat Bakteri pada Medium CMC Agar	21
9. Pertumbuhan Isolat Bakteri pada Medium CMC	23
10. Morfologi Koloni Isolat Bakteri Selulolitik	25
11. Morfologi Sel Isolat Bakteri Selulolitik	26
12. Pengamatan Uji TSIA Isolat Bakteri Selulolitik	27
13. Pengamatan Uji SCA Isolat Bakteri Selulolitik.....	28
14. Pengamatan Uji SIM Isolat Bakteri Selulolitik.....	29
15. Pengamatan Uji <i>Methyl Red</i> (MR) Isolat Bakteri Selulolitik.....	31
16. Pengamatan Uji <i>Voges Prokauer</i> (VP) Isolat Bakteri Selulolitik	31
17. Pengamatan Uji Katalase Isolat Bakteri Selulolitik	32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Alur Penelitian.....	39
2. Hasil Isolasi Bakteri pada Medium CMC.....	40
3. Hasil Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri pada medium PCA	41
4. Stok Isolat Bakteri Selulolitik.....	42
5. Kultur Isolat Bakteri dalam Medium CMC <i>Broth</i>	42
6. Surat Keterangan Hasil Uji Analisis Kandungan Hara Sampel Tanah	44
7. Dokumentasi Penelitian	45

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sampah merupakan masalah yang tidak bisa lepas dari masyarakat sekitar dan tidak kunjung terselesaikan. Beberapa permasalahan yang timbul diakibatkan oleh keberadaan sampah diantaranya masalah estetika serta kenyamanan, tempat vektor penyakit, mencemari sekitar lingkungan. Hal ini disebabkan karena semakin padatnya penduduk suatu wilayah dan semakin meningkat pula aktivitas para penduduk yang berakibat produktivitas sampah semakin banyak dan menumpuk (Widyanti & Fatmawati, 2022).

Kota Makassar merupakan salah satu kota besar yang memiliki tempat pembuangan akhir (TPA) terbesar di Sulawesi Selatan, namun juga memiliki masalah persoalan sampah yang kompleks, terutama pada hal perluasan lahan tempat pembuangan akhir (TPA). TPA sampah yang ada di Makassar berlokasi di kelurahan Tamangapa, kecamatan Manggala yang memiliki luas lahan sebesar 16,80 Ha. Dengan jumlah penduduk lokal mencapai sekitar 1.470.261 jiwa, Makassar menghasilkan sampah dalam jumlah yang besar yaitu mencapai 905 ton setiap harinya maka biaya untuk pengelolaan sampah pun semakin meningkat. Sebagian besar sampah berasal dari aktivitas penduduk seperti sampah rumah tangga, sampah industri, sampah pasar, sampah rumah sakit, sampah pertanian, sampah perkebunan, sampah peternakan, sampah institusi, dan sebagainya (Widyanti & Fatmawati, 2022).

Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Antang di kota Makassar didominasi oleh sampah yang sebagian besar terdiri dari bahan organik. Bahan organik adalah material yang berasal dari makhluk hidup, seperti hewan dan tumbuhan, yang secara alami mengalami proses dekomposisi di alam. Tumbuhan mengandung berbagai komponen organik seperti selulosa, lignin, protein, asam nukleat, dan mineral. Proses dekomposisi bahan organik ini berlangsung di dalam tanah dan menghasilkan humus sebagai produk akhir. Namun, selulosa, sebagai komponen utama tumbuhan, sulit terurai secara alami, yang seringkali menimbulkan masalah lingkungan seperti penumpukan limbah pertanian dan limbah rumah tangga.

Selulosa merupakan polimer linier D-glukosa yang memiliki mikrofibril dengan struktur kaku dan teratur serta membentuk kristal bersama hemiselulosa dan lignin yang tidak mudah larut di dalam air sehingga sulit untuk terurai secara alami karena memiliki kekuatan dan ketahanan terhadap degradasi hingga memerlukan waktu 4-5 bulan untuk terurai. Meskipun sulit diurai, selulosa dapat dipecah menjadi glukosa oleh enzim yang dihasilkan oleh berbagai organisme atau mikroorganisme tertentu. Mikroorganisme tertentu tersebut adalah bakteri selulolitik (Adiningrum, 2024; Arifin *et al.*, 2019).

Bakteri selulolitik adalah bakteri yang mampu menghidrolisis selulosa kompleks menjadi oligosakarida yang lebih kecil, yang kemudian dipecah menjadi glukosa. Glukosa ini dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi dan karbon untuk

pertumbuhan bakteri. Bakteri selulolitik memiliki laju pertumbuhan yang cepat, sehingga produksi enzimnya juga berlangsung lebih cepat. Dengan kemampuannya dalam mendegradasi selulosa, bakteri ini berperan dalam mengembalikan nutrisi ke dalam tanah serta menjaga keseimbangan ekosistem. Oleh karena itu, bakteri selulolitik sering dijumpai di tanah (Mulyasari *et al.*, 2015). Menurut Murtiyaningsih dan Hazmi (2017), adanya daun yang gugur di permukaan tanah atau pembusukan daun di tempat pembuangan sampah meningkatkan kadar selulosa dalam tanah, sehingga adanya peluang untuk menemukan bakteri pendegradasi selulosa di tanah yang tertimbun sampah.

Pemecahan selulosa melalui proses enzimatik dengan bantuan mikroorganisme dikenal sebagai degradasi selulosa. Enzim yang berperan dalam proses ini disebut enzim selulase, yang mampu memecah ikatan β 1-4 glukosidik pada selulosa. Enzim ini memegang peran kunci dalam mengubah limbah organik yang mengandung selulosa menjadi glukosa, protein, pakan ternak, etanol, dan sebagainya (Fahrudin *et al.*, 2020).

Enzim selulase dari bakteri dapat memberikan solusi terhadap masalah pencemaran dengan mengurangi jumlah limbah selulosa, seperti tumpukan daun di tempat pembuangan sampah, limbah pertanian, rumput laut di tepi pantai, serta meningkatkan nilai limbah dengan mengubahnya menjadi pupuk organik. Hal ini penting karena limbah organik dapat menjadi sumber pencemar lingkungan jika tidak dikelola dengan baik. Berbagai bahan limbah tersebut dapat dimodifikasi menggunakan enzim selulase untuk menghasilkan produk yang bermanfaat bagi pertanian dan produksi biogas. Beberapa contoh aplikasi produk organik yang bermanfaat untuk pertanian meliputi MOL (Mikroorganisme Lokal), POC (Pupuk Organik Cair), pupuk organik padat, kompos, dan pestisida organik (Murtiyaningsih & Hazmi, 2017).

Mengingat pentingnya keberadaan mikroba perombak bahan organik tersebut, maka dilakukan penelitian tentang isolasi dan karakterisasi bakteri pendegradasi selulosa dari tanah TPA Tamangapa Antang Makassar dengan bertujuan untuk memperoleh serta mengetahui karakteristik isolat bakteri selulolitik yang ada di tanah TPA Tamangapa Antang.

1.2 Teori

1.2.1 Tinjauan Umum TPA Tamangapa Antang

Secara administratif, TPA ini berada di wilayah Tamangapa dan Kecamatan Manggala. Lahan TPA berlokasi sangat dekat dengan daerah perumahan sehingga sering timbul keluhan dari penduduk setempat terkait dengan bau tak sedap yang berasal dari TPA, terutama pada saat musim hujan. Terdapat beberapa pusat aktivitas dan perumahan seperti tempat ibadah dan sekolah, serta perkantoran yang berlokasi di sekitar 1 km dari lokasi penelitian. Semenjak tahun 2000, berbagai perumahan telah didirikan, seperti Perumahan Antang, Perumahan TNI Angkatan Laut, Perumahan Griya Tamangapa, dan Perumahan Taman Asri Indah yang berlokasi berdekatan dengan TPA Tamangapa (Mun'im *et al.*, 2021).

Sesuai rencana awal, TPA Tamangapa ini dirancang untuk memenuhi kebutuhan selama 10 tahun. Namun pada kenyataannya, TPA tersebut masih tetap beroperasi hingga saat ini. Ini berarti usia TPA tersebut sudah 29 tahun dan tidak bisa lagi menampung volume sampah yang ada di Kota Makassar yang mencapai 800 ton atau sekitar 4.000 meter kubik per hari dan menyebabkan masalah di sekitar penduduk setempat terutama yang bertempat tinggal di sekitar TPA. TPA Antang bertempat di wilayah Bangkala, Kecamatan Manggala, kurang lebih 14 km dari pusat Kota Makassar. TPA memiliki luas lahan sekitar 14,3 Ha dari tahun 1993-2014 namun karena meningkatnya volume sampah di Kota Makassar maka ada penambahan beberapa zona sehingga tahun 2015 lahan TPA Antang bertambah menjadi 16.8 Ha. Sekitar 87% sampah di Kota Makassar merupakan sampah organik dan sekitar 13% adalah sampah anorganik, seperti plastik dan kertas (Mun'im *et al.*, 2021; Artiningsih *et al.*, 2018). Penampakan TPA Tamangapa Antang dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. TPA Tamangapa Antang

Dalam operasionalnya, TPA Antang menggunakan metode *sanitary landfill*. Berdasarkan data dari Dinas Tata Ruang dan Dinas Pengelolaan Lingkungan Hidup Kota Makassar tahun 2006, sejak TPA Antang dibuka hingga 2018, diperkirakan sudah ada 1.240.000 ton sampah organik yang tertimbun (Artiningsih *et al.*, 2018). Terdapat anggapan bahwa TPA Antang Makassar telah mencemari lingkungan di dalamnya bentuk pencemaran tanah dan air tanah kemungkinan besar benar. Pencemaran tersebut tentu berdampak pada sanitasi, udara polusi, dan bau yang tidak sedap. Pencemaran itu sendiri sudah menyebar ke arah Barat Laut – Tenggara dengan jarak mencapai sekitar 300 meter-450 meter dari TPA Tamangapa (Artiningsih *et al.*, 2019).

Kota Makassar sebagai kota pemerintahan, perdagangan, pelayanan jasa dan kota pendidikan sangat sulit untuk menanggulangi sampah, volume sampah di kota Makassar tahun 2020 mencapai +800 ton/hari dan disaat kondisi tertentu

volume sampah bisa mencapai +1200 ton/hari yang ditampung di Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Tamangapa Antang Makassar. Sampah paling banyak di sumbangkan oleh daerah penduduk terbanyak yakni Kecamatan Rappocini, Tallo, Bontoala, dan Tamalanrea. Memperhatikan fakta tersebut membawa konsekuensi logis berupa meningkatnya jumlah sampah (Halim & Idrus, 2022).

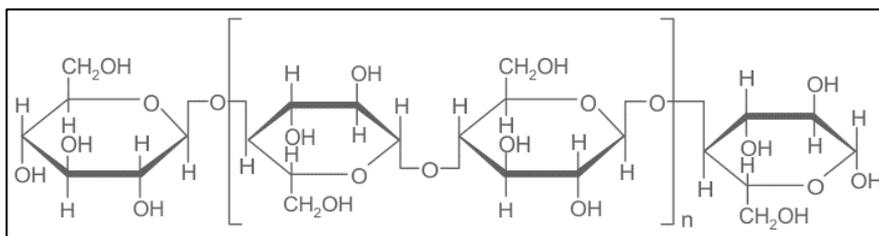
Meningkatnya timbulan sampah ditiap tahunnya di TPA Tamangapa, diharapkan pengelolaannya dapat ditingkatkan. Seperti adanya kerja sama pemerintah dengan masyarakat atau instansi tertentu yang mau mengelola sampah. Peran pemerintah sangatlah penting untuk dapat memberikan penyuluhan dan pengawasan agar masyarakat dapat ikut serta dalam pengelolaan sampah (Zubair & Haeruddin, 2012).

Berhasil atau tidak suatu sistem pengelolaan sampah sangat tergantung pada tepat tidaknya sistem pengelolaan yang diterapkan dikaitkan dengan karakteristik sampah yang akan dikelola. Sistem baru yang harus dikembangkan dalam menangani permasalahan sampah adalah bagaimana memanfaatkan dan mengolah sampah bukan bagaimana menyingkirkan dan membuang sampah. Dengan sistem ini akan dapat mengatasi permasalahan tentang sulitnya memperoleh lahan pembuangan akhir (Zubair & Haeruddin, 2012).

1.6.2 Selulosa

Sampah organik mempunyai komponen primer lignoselulosa yang terdiri atas tiga polimer yaitu, selulosa, hemiselulosa dan lignin. Selulosa adalah suatu polimer glukosa berantai sangat panjang yang penting sebagai pendukung struktur tanaman. Bersamaan dengan lignin, hemiselulosa, dan pektin, selulosa adalah suatu komponen dinding sel tanaman. Di dalam tanaman, selulosa merupakan cadangan karbon primer hasil fotosintesis. Selulosa sering kali mengandung lebih banyak daripada 50% total karbon tanaman. Proporsi selulosa paling banyak terdapat dalam bagian vegetatif atau kayu tanaman dan paling sedikit dalam bagian bijian (Shiddieq *et al.*, 2018).

Selulosa (gambar 2), dengan rumus molekul $(C_6H_{10}O_5)_n$, merupakan polimer glukosa dengan ikatan β -1,4 glukosida dalam rantai lurus. Bangun dasar selulosa berupa suatu selobiosa yaitu dimer dari glukosa. Rantai panjang selulosa terhubung secara bersama melalui ikatan hidrogen dan gaya van der waals (Sutini *et al.*, 2019). Karena merupakan senyawa organik penyusun dasar jaringan tanaman, umumnya selulosa tersusun dalam bentuk fibril yang berhubungan dengan ikatan glikosidik sehingga selulosa sulit diuraikan (Raharjo & Isnawati, 2022)



Gambar 2. Struktur Kimia Selulosa

Namun, ada mikroorganisme tertentu yang mampu memecah ikatan glikosidik ini dan memungkinkan terjadinya degradasi selulosa, yaitu melalui proses enzimatik, dimana mikroorganisme tersebut akan memanfaatkan selulosa sebagai makanan dan memproduksi enzim selulase. Potensi enzim selulase dalam pengelolaan limbah organik sangat besar. Limbah seperti daun kering dan sisa tanaman dapat diubah menjadi pupuk organik melalui proses biodegradasi yang dikatalisis oleh enzim selulase, sehingga mengurangi volume sampah dan memberikan manfaat bagi lingkungan. Isolat bakteri penghasil enzim selulase dengan aktivitas tinggi dapat menjadi sumber enzim atau gen yang dapat dimanfaatkan dalam bioteknologi untuk meningkatkan efisiensi proses biodegradasi (Murtiyaningsih & Hazmi, 2017).

1.6.4 Bakteri Pendegradasi Selulosa

Bakteri adalah mikroorganisme yang memiliki peran penting sebagai pengurai dalam ekosistem. Bakteri memiliki kemampuan untuk beradaptasi dengan lingkungannya karena dapat mensintesis enzim yang mendukung pertumbuhannya. Eksoenzim yang dihasilkan oleh bakteri dapat memecah molekul kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana (Turista, 2017).

Pemecahan senyawa selulosa ini dapat dilakukan dengan bantuan bakteri pendegradasi selulosa. Bakteri pendegradasi selulosa merupakan salah satu mikroorganisme pendegradasi bahan organik dan memiliki peranan penting dalam biosfir dengan mendaur-ulang selulosa. Bakteri pendegradasi selulosa pada tanah dapat menjadi degradator bahan organik dan membantu tersedianya unsur hara dalam tanah (Khairiah *et al.*, 2013). Bakteri pendegradasi selulosa atau disebut juga bakteri selulolitik merupakan salah satu mikroba pendegradasi selulosa potensial karena memiliki tingkat pertumbuhan yang lebih cepat dibanding kelompok mikroba lainnya, sehingga waktu yang dibutuhkan untuk produksi enzim selulase lebih singkat (Yusnia *et al.*, 2019).

Bakteri selulolitik mampu menghidrolisis kompleks selulosa menjadi oligosakarida yang lebih kecil dan akhirnya menjadi glukosa. Glukosa tersebut dimanfaatkan sebagai sumber karbon dan sumber nutrisi bagi kehidupan bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik mensintesis enzim selulase selama tumbuh dalam media selulosa. Enzim selulase dihasilkan sebagai respon dari sel bakteri dengan permukaan selulosa. Beberapa genus bakteri yang memiliki kemampuan selulolitik adalah *Achromobacter*, *Angiococcus*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Clostridium*, *Cellivibrio*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Poliangium*, *Sorangium*, *Sporocytophaga*, *Vibrio*, *Cellfalcicula*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* dan *Aeromonas* (Murtiyaningsih & Hazmi, 2017).

Sistem pemecahan selulosa menjadi glukosa terdiri atas tiga jenis enzim selulase yaitu endo- β -1.4-glukanase, ekso- β -1.4-glukanase, dan β -glukosidase. endo- β -1.4-glukanase yang menghidrolisis ikatan glikosidik β -1.4 secara acak dan bekerja terutama pada daerah amorf dari serat selulosa yang menghasilkan oligosakarida dan polimer yang panjangnya tereduksi, Ekso- β -1.4-glukanase yang menyerang atau memoting residu selubiosil dari rantai selulosa yang ujung rantai

selulosanya tidak tereduksi dan menghasilkan selobiosa, dan β -glukosidase (selobiase) yang mengurai selobiosa untuk menghasilkan dua unit glukosa (Sholihati *et al.*, 2015).

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan isolat bakteri pendegradasi selulosa dari tanah TPA Tamangapa Antang.
2. Mengetahui kemampuan isolat bakteri selulolitik yang diisolasi dari tanah TPA Tamangapa Antang dalam mendegradasi selulosa.
3. Mengetahui karakteristik isolat bakteri pendegradasi selulosa yang berasal dari tanah TPA Tamangapa Antang.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai bakteri selulolitik yang ada di TPA Tamangapa Antang dan dapat menjadi bahan acuan dalam penelitian yang berhubungan dengan bakteri selulolitik.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Juli 2024. Pengambilan sampel tanah dilakukan di TPA Antang, Kec. Manggala, kota Makassar. Pengerjaan sampel di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Kimia dan Kesuburan Tanah, Departemen Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin.

2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, erlenmeyer, wadah kaca, tabung reaksi, gelas kimia, gelas ukur, ose bulat, ose lurus, bunsen, pipet tetes, sendok tanduk, rak tabung, penjepit tabung, sekop, spoit, botol sampel, *cool box*, pH meter, timbangan analitik, *laminar air flow*, inkubator, *shaker*, *hot plate*, otoklaf, buret, mikroskop, oven, sentrifuse, neraca analitik, *flame photometer*, dan spektrofotometer UV-VIS.

2.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah TPA Antang, medium *Plate Count Agar* (PCA), medium *Nutrient Broth* (NB), medium *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), medium *Sulfite Indol Motility* (SIM), medium *Simmon Citrate Agar* (SCA), medium *Methyl Red* dan *Voges-Prokauer* (MR-VP), bubuk *carboxymethyl cellulose* (CMC), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , K_2HPO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, yeast extract, bacteriological agar, *congo red* 0,1%, KCL, H_2O , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot \text{N}$, H_2SO_4 pekat, campuran selen, asam sulfat pekat, pengekstrak Olsen, pereaksi pewarna fosfat, HCl 25%, spritus, akuades, kapas, alkohol, kain kasa, karet gelang, tisu, *clingwrap*, sarung tangan steril, label dan aluminium foil.

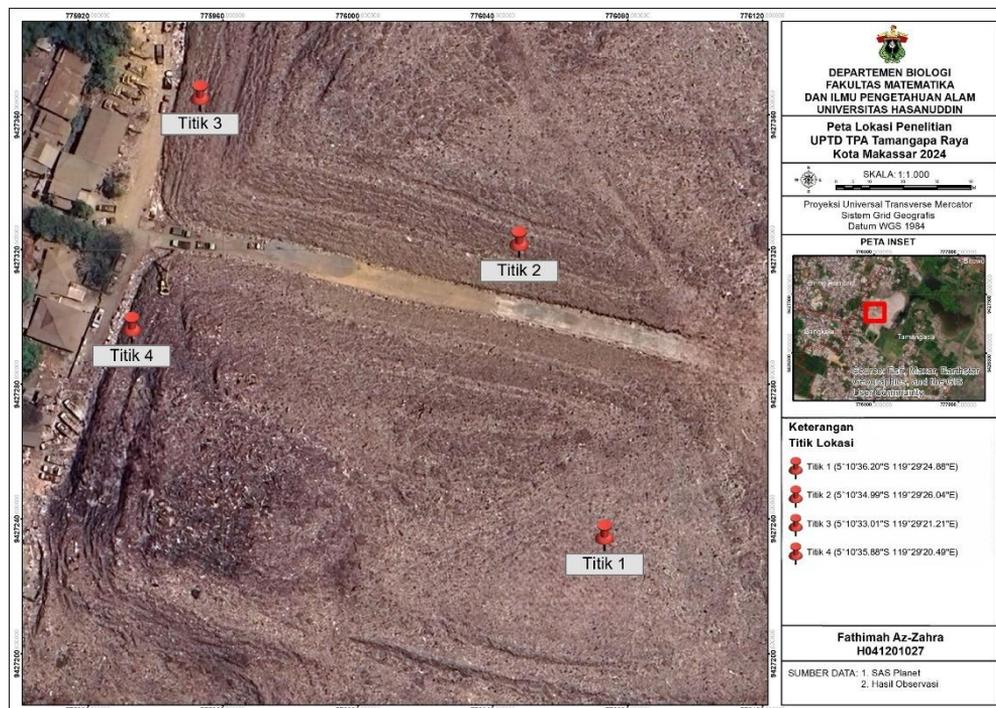
2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel tanah di TPA Tamangapa Antang menggunakan metode *purposive sampling* atau menentukan langsung titik lokasi pengambilan sampel yang ditentukan pada 4 (empat) titik di TPA Antang, dimana pada titik 1 dan 2 terletak di bagian lokasi pembuangan sampah, sedangkan titik 3 dan 4 terletak di dekat pintu masuk dan pemukiman warga. Peta lokasi dapat dilihat jelas pada gambar 3.

Penentuan titik lokasi pengambilan sampel ditentukan secara acak. Sampel tanah diambil pada kedalaman 5-10 cm. Sampel tanah yang telah dikumpulkan kemudian ditempatkan dalam wadah sampel yang telah diberi label. Seluruh sampel tanah yang telah dikumpulkan selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan

analisis lebih lanjut. Analisis tanah akan mencakup berbagai parameter fisik dan kimia, seperti pH dan kandungan bahan organik dan isolasi bakteri.



Gambar 3. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di TPA Tamangapa Antang

2.4.2 Analisis Tanah

Karakterisasi secara kimia meliputi pengukuran pH, karbon (C), kandungan nitrogen (N), penentuan fosfor (P) dan kalium (K).

1. Pengukuran pH tanah

Sampel tanah ditimbang 10,00 g sebanyak dua kali, masing-masing dimasukkan ke dalam botol kocok, ditambah 50 ml air bebas ion ke botol yang satu (pH H₂O) dan 50 ml KCl 1 M ke dalam botol lainnya (pH KCl). Kocok dengan mesin pengocok selama 30 menit. Suspensi tanah diukur dengan pH meter yang telah dikalibrasi menggunakan larutan buffer pH 7,0 dan pH 4,0. Laporkan nilai pH dalam 1 desimal.

2. Pengukuran Karbon (C) dengan metode *Walkey and Black*

Sampel tanah dikeringkan kemudian di ayak setelah itu ditimbang 0,500 g ukuran < 0,5 mm, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan 5 ml K₂Cr₂O₇ 1N, lalu dikocok. Ditambah 7,5 ml H₂SO₄ pekat, dikocok lalu dibiarkan selama 30 menit. Diencerkan dengan air bebas ion, dibiarkan dingin dan diimpitkan. Keesokan harinya diukur absorbansi larutan jernih dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 561 nm. Sebagai pembanding dibuat standar 0 dan 250 ppm, dengan memipet 0 dan 5 ml larutan standar 5.000 ppm ke dalam labu ukur 100 ml dengan perlakuan yang sama dengan pengerjaan contoh.

3. Pengukuran Nitrogen (N) dengan metode *Kjeldahl*

Analisis ini dilaksanakan dengan menggunakan metode *Kjeldahl*. Sampel tanah dikeringkan kemudian digerus dan di ayak kemudian ditimbang 0,5 g dengan ukuran < 0,5 mm, lalu dimasukkan ke dalam tabung digest. Ditambahkan 1 g campuran selen dan 3 ml asam sulfat pekat, didestruksi hingga suhu 350°C (3-4 jam). Destruksi selesai bila keluar uap putih dan didapat ekstrak jernih (sekitar 4 jam). Tabung diangkat, didinginkan dan kemudian ekstrak diencerkan dengan air bebas ion hingga tepat 50 ml. dikocok sampai homogen, dibiarkan semalam agar partikel mengendap. Ekstrak digunakan untuk pengukuran N dengan cara destilasi atau cara kolorimetri.

4. Pengukuran Fosfor (P) dengan metode Olsen

Analisis ini dilaksanakan dengan menggunakan metode Olsen. Sampel tanah dikeringkan kemudian digerus dan di ayak setelah sampel tanah < 2 mm ditimbang sebanyak 1,0 g, dimasukkan ke dalam botol kocok, ditambah 20 ml pengestrak Olsen, kemudian dikocok selama 30 menit. Saring dan bila larutan keruh dikembalikan lagi ke atas saringan semula. Ekstrak dipipet 2 ml ke dalam tabung reaksi dan selanjutnya bersama deret standar ditambahkan 10 ml pereaksi pewarna fosfat, kocok hingga homogen dan biarkan 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 693 nm.

5. Pengukuran Kalium (K)

Sampel tanah dikeringkan kemudian di ayak setelah itu ditimbang 2,000 g ukuran < 2 mm lalu dimasukkan ke dalam botol lalu dikocok dan ditambahkan 10 ml HCl 25% lalu dikocok dengan mesin kocok selama 5 jam lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dibiarkan semalam atau disentrifuse. Ekstrak jernih contoh dipipet 0,5 ml ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 9,5 ml air bebas ion (pengenceran 20 x) dan dikocok. Kemudian ekstrak contoh encer dan deret standar K diukur langsung dengan alat flamefotometer.

2.4.3 Sterilisasi Alat Dan Bahan

Peralatan yang terbuat dari bahan kaca atau gelas disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Sedangkan peralatan lainnya yang tidak tahan panas beserta medium pertumbuhan disterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.4.4 Pembuatan Medium

1. Pembuatan Medium PCA (*Plate Count Agar*)

Sebanyak 4,7 g medium PCA dilarutkan kedalam 200 mL akuades. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Selanjutnya mulut erlenmeyer ditutup dengan menggunakan aluminium foil lalu disterilkan dengan otoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

2. Medium TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Medium TSIA ditimbang sebanyak 3,25 g kemudian dilarutkan kedalam 50 mL akuades di dalam gelas kimia, setelah itu dipanaskan diatas hot plate dan di homogenkan menggunakan magnetic stirer, kemudian dimasukkan kedalam tabung

reaksi sebanyak 7 mL. sebelum disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3. Medium SIM (*Sulfid Indol Motility*)

Medium SIM ditimbang sebanyak 1,5 g kemudian dilarutkan kedalam 50 ml. aquades didalam gelas kimia dan dipanaskan di atas hot plate, kemudian dipindahkan ketabung reaksi kecil masing-masing sebanyak 5 mL sebelum disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

4. Medium SCA (*Simmons Citrate Agar*)

Medium SCA ditimbang sebanyak 1,21 g kemudian dilarutkan kedalam 50 mL. aquades didalam gelas kimia dan dipanaskan diatas hot plate, lalu di homogenkan menggunakan magnetic stirer, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 5 mL. sebelum disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah disterilkan medium di miringkan hingga memadat.

5. Medium MR-VP (*Methyl Red-Voges Prokauer*)

Medium MR-VP ditimbang sebanyak 1,7 g kemudian dilarutkan kedalam 100 mL aquades didalam gelas kimia dan dipanaskan diatas hot plate, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL sebelum disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

6. Medium CMC (*Carboxymethyl Cellulose*)

Medium pertumbuhan yang akan digunakan pada isolat bakteri selulolitik adalah medium CMC dengan konsentrasi 1%. Medium CMC agar ditimbang sebanyak 1 gram CMC; 0,04 g MgSO₄.7H₂O; 0,15 g KNO₃; 0,1 g K₂HPO₄; 0,004 g CaCl₂. 2H₂O; 0,4 g yeast extract dan 1 g agar. Kemudian, semua bahan dimasukkan kedalam gelas ukur, lalu ditambahkan 100 mL aquades dan dimasukkan di tabung erlenmeyer, lalu di hot plate. Selanjutnya, disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.5 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pour plate menggunakan sampel tanah, lalu ditimbang masing-masing dari 4 titik sebanyak 1 gram. Selanjutnya diambil 1 g tanah titik pertama dan dimasukkan ke dalam 9 mL aquadest steril dalam tabung reaksi sehingga diperoleh faktor pengenceran yakni 10⁻¹. Setelah itu dibuat pengenceran 10⁻² sampai 10⁻⁷. Kemudian, masing-masing pengenceran 10⁻⁵, 10⁻⁶, dan 10⁻⁷ dimasukkan ke dalam cawan petri aseptik, ditambahkan medium CMC dan dibiarkan sampai memadat, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam sampai tumbuh koloni pada medium. Dilakukan pengenceran yang sama pada tanah titik kedua, ketiga, dan keempat. Adapun untuk analisis total koloni bakteri digunakan medium *plate count agar* (PCA) dan hasilnya dihitung dengan metode *plate count* menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total Plate Count} = \text{jumlah koloni bakteri} \times 1/\text{faktor pengenceran}$$

2.4.6 Pemurnian Bakteri

Selanjutnya pemurnian bakteri dilakukan dengan inokulasi koloni bakteri yang tumbuh menggunakan jarum ose dan digoreskan pada medium dengan metode goresan kuadran. Pemilihan koloni bakteri yang tumbuh berbeda ditentukan jenisnya berdasarkan karakteristik morfologi secara makroskopis seperti warna koloni, bentuk koloni, elevasi koloni dan tepian koloni. Koloni bakteri yang akan dimurnikan ditentukan dari perwakilan tiap kelompok bakteri yang memiliki ciri khas yang berbeda.

2.4.7 Pembuatan Stok Bakteri

Bakteri yang telah dimurnikan selanjutnya di stok dengan cara digores di medium CMC miring pada tabung reaksi. Lalu, diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C.

2.4.8 Uji Kemampuan Degradasi Selulosa

Setiap jenis isolat yang diperoleh dari masing-masing titik pengambilan sampel diuji kemampuan degradasi selulosa yaitu dengan menggunakan metode uji Indeks Selulolitik untuk mengetahui kemampuan dari isolat bakteri dalam mendegradasi selulosa dalam tanah. Isolat bakteri murni diinokulasikan pada cawan petri yang berisi medium CMC dengan metode titik. Biakan dari isolat murni diambil dengan menggunakan jarum ose kemudian disentuh bagian ujung jarum yang mengandung biakan pada bagian tengah medium CMC. Selanjutnya, biakan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam dan diukur indeks selulolitiknya. Indeks selulolitik adalah nilai antara diameter zona bening dengan diameter koloni yang menghasilkan zona bening yang diukur menggunakan penggaris. Indeks selulolitik dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{indeks selulolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

2.4.9 Uji Kemampuan Tumbuh Isolat Bakteri pada Medium CMC

Proses pengujian ini menggunakan medium CMC seperti sebelumnya namun tanpa penambahan agar. Medium CMC *broth* dituang ke dalam 5 tabung erlenmeyer masing-masing sebanyak 50 mL. Kemudian disterilkan ke dalam autoklaf, lalu diinokulasikan suspensi isolat bakteri ke masing-masing erlenmeyer sebanyak 1-2 lup. Semua erlenmeyer diinkubasi pada *shaker rotary* 150 rpm pada suhu ruang selama 4x24 jam. Lalu dihitung jumlah biomassa sel menggunakan metode Turbidimetri menggunakan spektrofotometer. Proses pengujian ini dilakukan selama 4 hari dengan pengamatan tiap interval 24 jam.

2.4.10 Karakterisasi Isolat Bakteri

Karakterisasi isolat bakteri dilakukan melalui pengamatan mikroskopis dengan mengamati bentuk, ukuran, dan warna sel melalui pewarnaan gram dan juga

pengamatan morfologi mikroskopis karakter dan uji karakter fisiologis menggunakan uji biokimia.

1. Pewarnaan Gram

Disiapkan preparat olesan bakteri lalu difiksasi diatas api bunsen. Lalu ditetaskan larutan gram A (*Cristal violet*) sebanyak 2-3 tetes pada olesan bakteri. Biarkan selama 1 menit. Dicuci dengan aquades yang mengalir, keringkan. Teteskan larutan gram B (lugol/JKJ) biarkan selama 1 menit. Dicuci dengan akuades dan keringkan. Lalu tetesi dengan larutan gram C (alkohol) biarkan selama 30 detik. Dicuci dengan aquades dan keringkan. Selanjutnya, ditetesi dengan larutan gram D (Safranin) biarkan selama 30 detik dan cuci dengan aquades serta keringkan. Kemudian, diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dan ditetesi minyak emersi untuk mengumpulkan cahaya yang hasilnya tidak terbayang pada mikroskop binokuler yang digunakan. Lalu, dilakukan pengamatan bakteri jika hasil pewarnaan isolat bakteri merah maka termasuk kedalam bakteri gram negatif sedangkan jika hasil pewarnaan biru keunguan (violet) maka termasuk kedalam bakteri gram positif.

2. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Uji TSIA dilakukan dengan menggoreskan biakan dengan ose steril pada medium TSIA dengan metode tusuk sampai sepertiga dasar tabung. Kemudian diangkat dan digores secara zig-zag pada permukaannya setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Hasil positif gas H₂S adalah terbentuknya warna hitam.

3. Uji SIM (*Sulfid Indole Motility*)

Isolasi bakteri diinokulasikan secara tusukan pada medium SIM agar tegak. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 3x24 jam. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya rambatan di sekitar tusukan. Kemudian ditambahkan reagen kovacs pada masing-masing tabung reaksi. Hasil positif menunjukkan terbentuknya cincin berwarna merah lembayung pada permukaan medium.

4. Uji SCA (*Simmons Citrate Agar*)

Diambil masing-masing isolat yang diinokulasikan pada medium SCA lalu diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Reaksi positif jika medium berubah dari hijau menjadi biru.

5. Uji MR (*Methyl Red*)

Dilakukan dengan cara menginokulasikan masing-masing isolat bakteri ke dalam MR-VP *broth* lalu diinkubasi selama 5x24 jam. Setelah diinkubasi kemudian ditambahkan 3-5 tetes *methyl red* pada masing-masing tabung reaksi lalu dihomogenkan. Hasil positif menunjukkan warna merah muda pada *broth*. Hasil negatif menunjukkan warna kuning.

6. Uji VP (*Voges Prokauer*)

Dilakukan dengan cara menginokulasikan masing-masing isolat bakteri ke dalam MR-VP *broth* lalu diinkubasi selama 3x24 jam. Setelah diinkubasi kemudian ditambahkan 0,6 mL reagen VP A (yang mengandung *naphtol*) dan ditambahkan pula 0,2 mL reagen VP B (yang mengandung KOH), kemudian dikocok hingga homogen. Sebelum memastikan hasilnya, dibiarkan dahulu 15-20 menit agar

bereaksi. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi pink atau merah yang mengindikasikan adanya kehadiran aseton. Sedangkan reaksi negatif pada *broth* adalah tidak berubahnya warna medium atau menjadi warna tembaga.

7. Uji Katalase

Isolat bakteri dari kultur murni diambil 1 ose kemudian dioleskan di atas gelas benda steril yang telah ditetaskan dengan larutan H₂O₂ 5%. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara.

2.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengamatan berupa data kualitatif sehingga analisis data dilakukan secara deskriptif yang disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Analisis deskriptif antara lain dengan melihat hasil dari isolasi dan karakterisasi bakteri selulolitik dalam mendegradasi selulosa. Sedangkan analisis datanya yaitu diambil dari hasil pengukuran diameter uji indeks selulolitik isolat bakteri.