



ISOLASI DAN IDENTIFIKASI *Bacillus* PENGHASIL ENZIM HIDROLITIK DARI SAMPAH PADAT

IKA SETIANINGSIH



PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Isolasi dan Identifikasi *Bacillus* Penghasil Enzim Hidrolitik dari Sampah Padat” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2024

Ika Setianingsih
G3501211006

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



RINGKASAN

IKA SETIANINGSIH. Isolasi dan Identifikasi *Bacillus* Penghasil Enzim Hidrolitik dari Sampah Padat. Dibimbing oleh NISA RACHMANIA MUBARIK dan IMAN RUSMANA.

Berbagai upaya untuk mengatasi persoalan sampah telah dilakukan di antaranya melalui pengomposan, biodigester, *biodrying*, hingga pembuatan pelet atau pakan ternak. Namun demikian, sejumlah upaya tersebut seringkali masih menemui kendala di antaranya waktu yang diperlukan cukup lama, biaya operasional yang tinggi, dan kualitas produk yang dirasa masih rendah. Bioaugmentasi dan biostimulasi mikroba potensial dekomposer menjadi alternatif solusi yang efisien dan efektif, serta aman bagi lingkungan jika diaplikasikan. Oleh karenanya pencarian mikroba potensial dekomposer hingga kini masih terus dilakukan salah satunya dari kelompok *Bacillus*. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengidentifikasi *Bacillus* yang mampu menghasilkan enzim hidrolitik (selulolitik, amilolitik, dan proteolitik) dari sampah padat.

Penelitian diawali oleh tahapan isolasi *Bacillus* yang dilakukan dengan memberi perlakuan *heat-shock* (dipanaskan selama 80 °C selama 10 menit lalu didinginkan) pada sampel, kemudian dibuat pengenceran serial, dilanjutkan dengan pemurnian, dan diuji potensi hemolisisnya pada media agar-agar darah, sedangkan uji potensi selulolitik, amilolitik, dan proteolitik dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media agar-agar *carboxyl methyl cellulose* (CMC), pati, dan skim. Isolat dengan ketiga kemampuan yang baik berdasarkan indeks hidrolisis diuji antagonis. Isolat yang tidak saling antagonis diidentifikasi berdasarkan fenotipe (morfologi koloni dan pewarnaan Gram) dan genotipe (gen 16S *rRNA*). Karakterisasi isolat berdasarkan aktivitas ketiga enzim hidrolitik (amilase, protease, dan selulase) yang dimiliki dilakukan terhadap salah satu isolat terpilih secara kuantitatif.

Hasil seleksi menunjukkan empat belas isolat diduga *Bacillus* sp. yang diketahui memiliki kemampuan selulolitik, amilolitik dan proteolitik. Empat isolat terpilih berdasarkan indeks hidrolitik terbaik, di antaranya yakni isolat 2.5 dan 2.7 memiliki kemiripan dengan *Bacillus stercoris*, sedangkan dua isolat lainnya yakni 5,5 dan 5,9R masing-masing memiliki kemiripan dengan *Calidifontibacillus erzurumensis* dan *Bacillus amyloliquefaciens*. Aktivitas spesifik enzim amilase dari isolat 2.7 sebagai isolat terpilih lebih tinggi, dibandingkan protease dan selulase yakni 3,522 Unit/mg pada jam ke-27. Karakterisasi enzim diperlukan untuk optimasi dengan tujuan produksi dan pemanfaatan enzim secara berkelanjutan. Pengujian isolat dalam mendegradasi sampah tetap perlu dilakukan begitupula analisis *whole genome sequencing* (WGS) untuk memastikan hasil identifikasi yang lebih akurat dan deteksi gen hidrolitik yang dimiliki.

Kata kunci: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stercoris*, *Calidifontibacillus erzurumensis*, enzim hidrolitik.



SUMMARY

IKA SETIANINGSIH Isolation and Identification of Hydrolytic Enzyme-Producing *Bacillus* from Solid Waste. Supervised by NISA RACHMANIA MUBARIK and IMAN RUSMANA.

Various efforts have been made to overcome the waste problem, including composting, biodigesters, biodrying, and making pellets or animal feed. However, some of these efforts still need help, including the time required, which is quite long, high operational costs, and the product quality still needs to be considered high. Bioaugmentation and biostimulation of potential decomposer microbes are alternative solutions that are efficient, effective, and safe for the environment. Therefore, searching for potential decomposer microbes, one of which is from the *Bacillus* group, is ongoing. This study aims to isolate and identify *Bacillus* that can produce hydrolytic enzymes (cellulolytic, amylolytic, and proteolytic) from solid waste.

The study began with the *Bacillus* isolation stage, which was carried out by giving heat-shock treatment (heated at 80 °C for 10 minutes, then cooled) to the sample. Serial dilutions were made, continued with purification, and tested for hemolysis potential on blood agar media, while cellulolytic, amylolytic, and proteolytic potential tests were carried out by growing the isolate on carboxyl methyl cellulose (CMC), starch, and skim agar media. Isolates with all three good abilities based on the hydrolysis index were tested antagonistic. Isolates that were not antagonistic to each other were identified based on phenotype (colony morphology and Gram staining) and genotype (16S rRNA gene). Isolate characterization based on the activity of the three hydrolytic enzymes (amylase, protease, and cellulase) they had was carried out on one of the selected isolates quantitatively.

The selection results showed fourteen isolates suspected of being *Bacillus* sp. known to have cellulolytic, amylolytic, and proteolytic abilities. Four isolates were selected based on the best hydrolytic index, including isolates 2.5 and 2.7, similar to *Bacillus stercoris*. In comparison, the other two isolates, namely 5.5 and 5.9R, are similar to *Calidifontibacillus erzurumensis* and *Bacillus amyloliquefaciens*, respectively. The specific activity of the amylase enzyme from isolate 2.7 as the selected isolate was higher, compared to protease and cellulase, namely 3.522 Units/mg at the 27th hour. Enzyme characterization is needed for optimization for sustainable enzyme production and utilization. Testing of isolates in degrading waste still needs to be done, as well as whole genome sequencing (WGS) analysis to ensure more accurate identification results and detection of the hydrolytic genes they have.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stercoris*, *Calidifontibacillus erzurumensis*, hydrolytic enzyme.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI *Bacillus* PENGHASIL ENZIM HIDROLITIK DARI SAMPAH PADAT

IKA SETIANINGSIH

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains pada
Program Studi Mikrobiologi

**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik IPB University

**Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tesis:
Dr. Ir. Happy Widiastuti, M.Si.**

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Judul Tesis : Isolasi dan Identifikasi *Bacillus* Penghasil Enzim Hidrolitik dari Sampah padat
Nama : Ika Setianingsih
NIM : G3501211006

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Dr. Dra. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si.



Pembimbing 2:
Dr. Ir. Iman Rusmana, M.Si.



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini, M.S.
NIP. 196203271987032001



Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam:
Dr. Berry Juliandi S.Si., M.Si.
NIP. 197807232007011001



Tanggal Ujian: 19 Juli 2024

Tanggal Lulus:



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah *subhanaahu wa ta'ala* atas segala karunia-Nya, sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Agustus 2023 sampai bulan Januari 2024 ini ialah *Bacillus* hidrolitik, dengan judul “Isolasi dan Identifikasi *Bacillus* Penghasil Enzim Hidrolitik dari Sampah Padat”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Direktorat Jenderal Tenaga Kesehatan yang sebelumnya Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan (BPPSDMK) melalui program beasiswanya dan bantuan dana riset yang diberikan. Penyusunan dan penulisan karya tulis ilmiah ini tidak terlepas pula dari arahan dan bantuan banyak pihak. Oleh karenanya penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Dra. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si. sebagai ketua komisi pembimbing dan Dr. Ir. Iman Rusmana, M.Si. selaku anggota komisi pembimbing yang dengan penuh kesabaran membimbing dan banyak memberi saran baik selama proses penelitian maupun penyusunan tesis.
2. Dr. Ir. Happy Widyastuti, M.Si. selaku dosen penguji atas segala saran dan masukannya demi perbaikan tesis yang lebih baik.
3. Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini, MS. selaku ketua Program Studi Mikrobiologi beserta seluruh staf pengajar (dosen) atas bimbingannya selama perkuliahan hingga penyusunan akhir tesis.
4. Staf Laboratorium Mikrobiologi dan staf Laboratorium Institut Pertanian Bogor *Culture Collection* (IPBCC).
5. Keluarga tercinta khususnya (Alm.) Bapak Sutimin dan Ibu Sri Utami yang selalu mendukung putri-putrinya menempuh pendidikan setinggi-tingginya baik secara material maupun do'a, begitupula ketiga adik tersayang Ufi Susilo Wardani, Waris Saputri Handayani, dan Fika Cahyaning Putri atas doa dan motivasinya.
6. Suami tercinta Dwi Suharyanto beserta keluarga yang dengan sabar mendampingi dan mendukung setiap tahap yang dilalui, kedua anak tersayang Mukhammad Irzan Kalandra dan Maiza Adzkia Munifah semoga kalian tumbuh menjadi anak-anak yang sholeh-sholehah, berguna bagi nusa dan bangsa nantinya.
7. Seluruh sahabat, rekan seperjuangan di Program Studi Mikrobiologi 2021/2022 yang telah kebersamai dan mendukung penulis dari masa perkuliahan hingga terselesaikannya tesis ini.

Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan semua pihak yang telah mendukung dan membantu selama perkuliahan hingga penyusunan tesis ini, dan karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan serta bagi kemajuan ilmu pengetahuan khususnya di bidang mikrobiologi.

Bogor, Agustus 2024

Ika Setianingsih



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xi
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Kelompok <i>Bacillus</i>	3
2.2 Enzim hidrolitik <i>Bacillus</i>	4
2.2.1 Jenis enzim hidrolisis <i>Bacillus</i>	4
2.2.2 Mekanisme dan regulasi produksi enzim hidrolitik <i>Bacillus</i>	6
2.2.3 Mekanisme dekomposisi sampah organik oleh <i>Bacillus</i>	6
2.3 Seleksi dan Identifikasi <i>Bacillus</i> Potensial Hidrolitik	7
2.3.1 Metode seleksi <i>Bacillus</i> potensial hidrolitik	7
2.3.2 Metode identifikasi <i>Bacillus</i> hidrolitik	7
III METODE	9
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	9
3.2 Alat dan Bahan	9
3.3 Prosedur Kerja	9
3.3.1 Isolasi <i>Bacillus</i> dari sampah padat	9
3.3.2 Seleksi <i>Bacillus</i> sp. pada media uji	10
3.3.3 Identifikasi 16S rRNA isolat terpilih	10
3.3.4 Pengujian aktivitas enzim salah satu isolat terpilih	11
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Hasil	15
4.1.1 Aktivitas hidrolitik isolat <i>Bacillus</i> sp.	15
4.1.2 Karakteristik dan hasil identifikasi <i>Bacillus</i> sp.	16
4.1.3 Aktivitas enzim isolat terpilih	18
4.2 Pembahasan	20
V SIMPULAN DAN SARAN	24
5.1 Simpulan	24
5.2 Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	30
RIWAYAT HIDUP	38

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR TABEL

1	Hasil isolasi dan potensi hidrolitik <i>Bacillus</i> yang diisolasi dari sampah	15
2	serasah pada berbagai perlakuan pengomposan	
2	Hasil uji antagonis isolat terpilih	16
3	Hasil <i>BLAST-n</i> sekuens 16S <i>rRNA</i> isolat terpilih	18

DAFTAR GAMBAR

1	Hasil uji hidrolitik (selulolitik, amilolitik, dan proteolitik) 14 isolat	16
	berdasarkan indeks zona hidrolitiknya	
2	Karakter morfologi koloni keempat isolat terpilih pada media NA	17
	setelah inkubasi 1x24 jam pada suhu ruang	
3	Morfologi sel keempat isolat terpilih berdasarkan pewarnaan Gram	17
4	Pohon filogenetik dari keempat isolat terpilih	18
5	Kurva pertumbuhan bakteri dan aktivitas unit enzim (amilase,	19
	protease, dan selulase) isolat terpilih	
6	Kurva pertumbuhan dan aktivitas spesifik enzim (amilase, protease,	19
	dan selulase) isolat terpilih	
7	Kurva pertumbuhan bakteri dan kadar protein	20

DAFTAR LAMPIRAN

1	Hasil uji hidrolisis isolat pada masing-masing media uji	31
2	Hasil uji antagonis isolat <i>Bacillus</i> sp.	31
3	Kurva standar pertumbuhan isolat terpilih (isolat 2.7)	32
4	Laju pertumbuhan isolat 2.7	32
5	Komposisi reagen <i>Bradford</i>	33
6	Pengukuran kadar protein	33
7	Kurva standar protein	33
8	Komposisi reagen <i>Dinitrosalicylic acid</i> (DNS)	34
9	Pengukuran aktivitas maltosa	34
10	Kurva standar maltosa	34
11	Laju pertumbuhan dan produksi enzim amilase	35
12	Kurva standar glukosa	35
13	Pengukuran aktivitas enzim selulase	36
14	Laju pertumbuhan dan produksi enzim selulase	36
15	Pengukuran aktivitas enzim proteinase	36
16	Laju pertumbuhan dan produksi enzim protease	37