

ARTIKEL

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI SELULOLITIK DALAM SALURAN PENCERNAAN RAYAP *Macrotermes gilvus* Hagen DI WILAYAH PESISIR BENGKULU

[*Isolation and Characterization of Cellulolytic Bacteria in the Termite Gut Macrotermes gilvus Hagen From Coastal Area of Bengkulu*]

Dwita Oktiarni^{1,2*}, Lusiana¹, Wina Shasha Regina³, Elva Maidani Supardin³

¹Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Bengkulu. Jalan W.R. Supratman, Kandang Limun, Kota Bengkulu 38122, Bengkulu, Indonesia. Tel.: +62-736-21170, Fax.: +62-736-22105.

²Research Center of Sumatera Natural Products and Functional Materials, Universitas Bengkulu. Jalan W.R. Supratman, Kandang Limun, Kota Bengkulu 38122, Bengkulu, Indonesia.

³Degree Program of Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Bengkulu, Jalan W.R. Supratman, Kandang Limun, Kota Bengkulu 38122, Bengkulu, Indonesia.

ABSTRAK

Rayap, khususnya spesies *Macrotermes gilvus* Hagen, memainkan peran krusial dalam ekosistem berkat kemampuannya menguraikan selulosa, yang didukung oleh bakteri selulolitik yang terdapat dalam saluran pencernaannya. *M. gilvus* juga menunjukkan kelimpahan yang tinggi di wilayah pesisir Bengkulu, yang menarik perhatian untuk memperoleh bakteri selulolitik yang dapat dimanfaatkan dalam proses hidrolisis biomassa selulosa menjadi glukosa. Glukosa merupakan bahan baku utama dalam proses fermentasi sehingga dihasilkan produk berupa bioetanol. Bakteri selulolitik diisolasi dari saluran pencernaan rayap yang diambil dari wilayah pesisir Bengkulu. Tahapan penelitian ini meliputi proses isolasi, karakterisasi, serta analisis secara biomolekular. Hasil skrining menunjukkan bahwa enam isolat bakteri berhasil diperoleh dari media agar *Carboxymethyl cellulose* (CMC). Isolat bakteri diidentifikasi menggunakan pendekatan biomolekular, yang menghasilkan identifikasi empat spesies bakteri. Kemampuan selulolitiknya RYP 1 yaitu 1,34 dengan kategori sedang, sementara itu aktivitas selulolitik terendah RYP 9 yaitu 0,73. Amplifikasi melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan untuk menganalisis segmen gen 16S rRNA. Hasil analisis menunjukkan isolat bakteri memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Bacillus paramycoides*, *Staphylococcus hominis*, *Cellulomonas denverensis*, dan *Acinetobacter nosocomialis*.

Kata Kunci: Bakteri selulolitik, biomassa, *M. Gilvus*, rayap, selulosa

ABSTRACT

Termites, particularly the species *Macrotermes gilvus* Hagen, play a crucial role in the ecosystem due to their ability to break down cellulose, supported by the cellulolytic bacteria found in their digestive tracts. *M. gilvus* also shows high abundance in the coastal region of Bengkulu, attracting interest for the potential isolation of cellulolytic bacteria that can be utilized in the hydrolysis of cellulose biomass into glucose and bioethanol. Cellulolytic bacteria isolated from the digestive tracts of termites collected from the coastal area of Bengkulu, undergoing processes of isolation, characterization, and biomolecular analysis. Screening results indicate that six bacterial isolates were successfully obtained from carboxymethyl cellulose (CMC) agar media. The bacterial isolates were identified using biomolecular approaches, leading to the identification of four bacterial species. The cellulolytic ability of RYP 1 was 1.34, which is classified as moderate, while the lowest cellulolytic activity was 0.73 for RYP 9. Amplification through polymerase chain reaction (PCR) was performed to analyze the 16S rRNA gene segment. The analysis results show that the bacterial isolates had the similarity with *Bacillus paramycooides*, *Staphylococcus hominis*, *Cellulomonas denverensis*, and *Acinetobacter nosocomialis*.

Keywords: Biomass, cellulolytic bacteria, cellulose, *M. gilvus*, termite

PENDAHULUAN

Selulosa merupakan biopolimer yang sangat melimpah di alam. Selulosa merupakan komponen utama dari lignoselulosa. Lignoselulosa terdiri dari polimer selulosa (40-50%), hemiselulosa (25-35%), lignin (15-20%) (Varghese *et al.*, 2017). Selulosa memiliki ikatan β -1,4 glikosidik, dimana ikatan ini sulit untuk dihidrolisis menjadi monomer/monosakarida yang sederhana (Li *et al.*, 2014). Namun, masalah ini dapat diatasi dengan melibatkan bakteri selulolitik yang mampu mendekomposisi selulosa melalui proses biologis (Kurniawan *et al.*, 2019). Bakteri selulolitik berperan dalam menguraikan selulosa menjadi glukosa, yang dapat dimanfaatkan dalam fermentasi untuk menghasilkan bioetanol, sehingga meningkatkan peluang pemanfaatannya dalam berbagai aplikasi seperti produksi energi terbarukan (Santi dan Widyaningrum, 2022).

Peran enzim selulase dan bakteri selulolitik dalam menghidrolisis biomassa lignoselulosa diperlukan. Salah satu organisme yang memiliki kemampuan tersebut yaitu rayap yang akan diperoleh di wilayah pesisir Bengkulu. Umumnya rayap memakan biomassa selulosa, seperti kayu, serasah tanaman, serasah rumput, dan tanah. Sehingga rayap ini dikenal sebagai penghuni tanah yang akan membangun sarang di sekitar bahan organik kaya selulosa, seperti kayu (Oktiarni *et al.*, 2022). Pada saluran pencernaan rayap terdapat bakteri selulolitik yang mempunyai kemampuan menghidrolisis selulosa menjadi glukosa (Ferbianto *et al.*, 2015).

Beberapa organisme mengkonsumsi selulosa sebagai sumber makanannya, salah satunya rayap. Rayap merupakan serangga yang dapat mendegradasi selulosa menjadi monosakarida sederhana, dengan bantuan enzim selulolitik yang ada dalam saluran pencernaannya (Ferbianto *et al.*, 2015; Susilowati *et al.*, 2018). Spesies rayap tanah *Macrotermes gilvus* salah satu spesies dari famili termitidae dengan genus *Macrotermes* dan sangat banyak ditemukan sarangnya di Indonesia (Pratama *et al.*, 2023). Tiga spesies rayap ditemukan di kawasan Universitas Bengkulu yang termasuk ke dalam wilayah pesisir Bengkulu, diantaranya *M. inspiratus*, *M. gilvus*, dan *Coptotermes curvignatus*. Dari ketiga diantaranya *M. gilvus* Hagen memiliki tingkat kelimpahan spesies rayap tertinggi dengan nilai kelimpahan 150.000 individu/m³. *M. gilvus* Hagen juga memiliki nilai intensitas serangan mencapai 25,26%, hal ini dipengaruhi oleh tingginya populasi rayap pada wilayah tersebut. *M. gilvus* Hagen merupakan spesies rayap dengan agresif tinggi dalam menyerang kayu, khususnya pada kayu yang telah mengalami kematian dan terletak di permukaan tanah (Helmiyetti *et al.*, 2021)..

Bakteri dalam saluran pencernaan rayap memiliki enzim yang mampu menghidrolisis selulosa menjadi glukosa (Ferbianto *et al.*, 2015). Proses isolasi bakteri penghasil enzim selulase harus dilakukan dengan media selektif yang tepat sehingga dihasilkan satu koloni tunggal bakteri (Fathollahi *et al.*, 2021; Hidayat, 2021). Melalui penggunaan mikroorganisme selulolitik, yang dapat menguraikan molekul kompleks seperti selulosa menjadi molekul gula sederhana akan membantu proses degradasi selulosa secara enzimatik. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri memiliki kemampuan dalam produksi bioetanol (Oktiarni *et al.*, 2023).

Pada penelitian ini diisolasi dan dikarakterisasi spesies bakteri dalam saluran pencernaan rayap *M. gilvus*. Spesies bakteri selulolitik yang diperoleh dapat memberikan informasi baru tentang biodiversitas bakteri yang ada pada saluran pencernaan rayap di wilayah pesisir Bengkulu. Bakteri selulolitik berpotensi digunakan sebagai biokatalisator, dengan bantuan enzim selulase, menghidrolisis biomassa menjadi glukosa, yang merupakan bahan baku pembuatan bioetanol.

BAHAN DAN METODE

Pemilihan dan identifikasi rayap

Sampel rayap kasta pekerja diambil di wilayah pesisir Bengkulu, Kecamatan Kandang Limun, Kota Bengkulu. Rayap yang diperoleh disimpan dalam wadah plastik yang telah diberi label dan dibawa ke laboratorium. Sampel rayap diidentifikasi dengan mengamati bentuk, warna, ukuran, dan membandingkan dengan literatur yang ada. Selain itu, sampel rayap diidentifikasi oleh ahli taksonomi rayap.

Teknik pengambilan sampel dilakukan secara langsung dan sampel rayap yang diambil yaitu pada pohon yang telah mati berada di atas tanah lembab dan mengalami pelapukan. Sampel yang diambil yaitu rayap prajurit (*soldier*) dan rayap pekerja (*worker*), rayap yang diperoleh kemudian disimpan dalam wadah plastik tertutup dan dibawa ke laboratorium. Sampel rayap dalam wadah plastik tertutup tersebut, kemudian diberi tanah yang lembab dan serpihan kayu untuk menjaga kondisi rayap supaya tetap hidup (Arif *et al.*, 2019; Oktiarni *et al.*, 2021).

Isolasi, pemurnian dan karakterisasi bakteri

Isolasi bakteri

Dua belas sampel rayap pekerja disterilisasi dengan alkohol 70% selama 30 detik. Seluruh bagian saluran pencernaan rayap diambil lalu direndam dalam larutan NaCl fisiologis pada cawan petri. Sampel rayap kemudian dibasuh dengan akuades steril dan dikeringkan selama 1 menit. Bagian perut rayap dibedah dan seluruh bagian saluran pencernaan rayap diambil lalu ditambahkan dengan NaCl fisiologis, digerus sehingga diperoleh suspensinya. Selanjutnya, suspensi diambil 0,1 mL dan disebar pada media CMC pada 37 °C selama 24 jam, dan dilakukan seri pengenceran bertingkat dari 10⁻¹ sampai dengan 10⁻⁵ (Boontanom & Chantarasiri, 2021; Fathollahi *et al.*, 2021; Ferbiyanto *et al.*, 2015; Hidayat, 2021; Oktiarni *et al.*, 2021). Media agar CMC dibuat dengan komposisi sebagai berikut [0,18 g K₂HPO₄; 0,1 g NaNO₃; 0,05 g KCl, 0,09 g MgSO₄.7H₂O; 0,2 g yeast extract; 1 g pepton; 1 g CMC; 2 g agar; pH 5 (w/v)] dilarutkan dalam 100 mL akuades.

Skrining isolat bakteri selulolitik

Suspensi rayap disebar pada media agar CMC, diinkubasi pada 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya koloni bakteri yang diperoleh pada media agar CMC, kemudian digoreskan kembali pada media agar CMC, diinkubasi pada 37 °C selama 24 jam (Arsyad *et al.*, 2018). Setelah diinkubasi, media agar CMC diwarnai dengan 1% (w/v) *Congo red* selama 15 menit untuk mengetahui kemampuannya dalam menghidrolisis selulosa (Oktiarni *et al.*, 2023).

Koloni tunggal bakteri yang diperoleh dipindahkan ke dalam media agar CMC yang baru untuk dikulturkan berdasarkan jumlah koloni tunggal yang diperoleh dan diberi label berupa angka pada setiap koloni tunggal yang diperoleh. Setiap koloni tunggal yang diperoleh diinkubasi pada inkubator suhu 37 °C selama 24 jam. Koloni tunggal bakteri pada media agar CMC selanjutnya disubkulturkan kembali untuk mendapatkan isolat tunggal bakteri. Setelah diperoleh isolat tunggal bakteri, diambil sebanyak 1 koloni tunggal dan digoreskan pada media agar CMC secara aseptis dan diinkubasi pada 37 °C selama 24 jam (Arsyad *et al.*, 2018; Oktiarni *et al.*, 2021). Setelah diinkubasi, media agar CMC diwarnai dengan 1% (w/v) *Congo red* 15 menit pada suhu ruang dan kemudian dihilangkan warnanya dengan larutan 1 M NaCl selama 15 menit (Fathollahi *et al.*, 2021; Oktiarni *et al.*, 2023). Indeks selulolitik dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Oktiarni *et al.* 2021):

$$\text{Indeks Selulolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

Uji morfologi dan biokimia

Uji morfologi dan fisiologi dilakukan dengan uji makroskopis diantaranya, bentuk, tepi, elevasi, warna, dan ukuran koloni, serta uji mikroskopis dengan pewarnaan Gram dan sel koloni. Uji biokimia dilakukan terhadap isolat bakteri yaitu uji indol, uji motilitas, uji Triple Sugar Iron (TSI), uji urease, uji katalase, uji sitrat, uji Methyl Red (MR), dan uji Voges Proskauer (VP), uji hidrolisis pati, dan uji gelatinase (Sharma *et al.*, 2015; Ferbiyanto *et al.*, 2015; Peristiwati *et al.*, 2018; Oktiarni *et al.*, 2021).

Karakterisasi isolat bakteri

Isolat bakteri selulolitik hasil skrining kemudian diidentifikasi dengan cara pendekatan biomolekular. Tahap pertama yaitu isolasi DNA dengan *DNA kit Zymo Research* dan dilakukan berdasarkan instruksi dari kemasan.

Amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer universal dan diperbanyak dengan mesin PCR. Primer universal yang digunakan yaitu *primer 27F* (5'-AGA GTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan *primer 1492R* (5'-TACGGYTACCTTGTT ACGACT T-3). Mesin PCR yang digunakan *Thermocycler GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer). Bufer yang dipakai yaitu *Takara LaTaq GC*. Setiap reaksi (20 mL) mengandung 0.5 mL primer (10 pmol/mL), 0.2 mL 10 x *Long Polymerase Taq* (5 U/mL), 10 mL bufer GC (5 mM), 3.2 mL dNTP (2.5 mM), 2 mL DNA isolat, dan air bebas nuklease sampai volume mencapai 20 mL.

Thermocycling diatur dengan cara: denaturasi awal 94°C selama 4 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus pada 94°C selama 40 detik, *annealing* 55°C selama 1 menit, pemanjangan 72°C selama 1 menit 10 detik, dan pemanjangan rantai final pada 72°C selama 10 menit. Setelah diamplifikasi, 3 mL produk hasil PCR dipindahkan pada 1.5% gel agarosa dan dilihat menggunakan *SyberGreen staining* pada ultraviolet transilluminator. Kemudian *sequencing* dengan *Sequencer 4.10.1 software* dan *ABI PRISM 3730XL Genetic Analyzer* menggunakan *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems, USA*) (Wu *et al.*, 2019).

Produk hasil PCR ditentukan urutannya dengan menggunakan metode *Bi-directional DNA sequencing*. Data pada urutan gen 16S rRNA yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan *database GenBank program BLAST-N* dengan *search program pada National Center Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Gen 16S rRNA yang telah didapatkan kemudian dikonstruksikan pohon filogenetik dengan menggunakan *software MEGA 5.05* dengan *neighbor-joining pada 1000X bootstrap* (Oktiarni *et al.*, 2025; Oktiarni *et al.*, 2022).

HASIL

Pemilihan dan identifikasi rayap

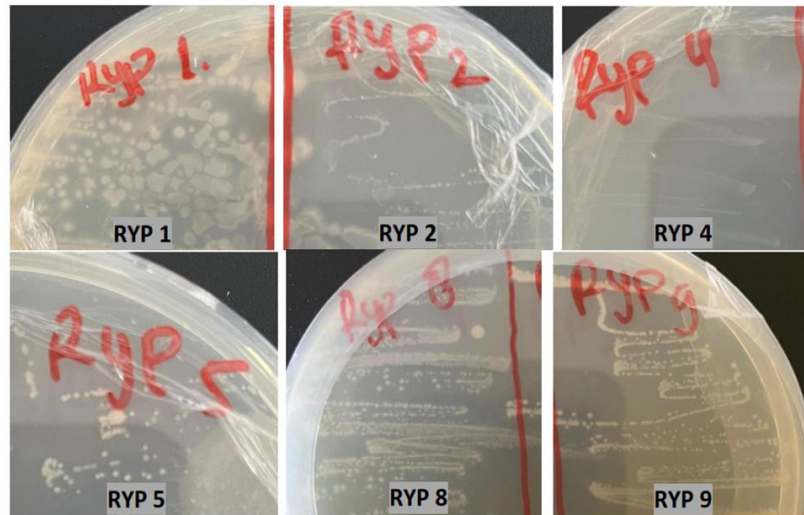
Sampel rayap (Gambar 1) diambil di Danau Ilmu Universitas Bengkulu, Kandang Limun, Kota Bengkulu. Sampel rayap diambil pada bagian batang pohon yang telah lapuk dan diserang oleh koloni rayap (Gambar 1.a). Rayap yang diperoleh merupakan rayap dari spesies *Macrotermes gilvus* Hagen, termasuk ke dalam *higher termite* dengan ukuran panjang 0,8 cm untuk kasta pekerja, memiliki ciri abdomen berwarna coklat kemerahan dan kepala berbentuk oval berwarna coklat tua (Gambar 1.b).



Gambar 1. a. Batang pohon tempat sampel rayap diambil dan b. Rayap *M. gilvus*. (a. the termite sample tree was taken and b. Termite *Macrotermes gilvus*).

Skrining, isolasi, pemurnian dan karakterisasi bakteri yang ada pada saluran pencernaan rayap

Didapatkan sebanyak enam isolat bakteri hasil dari isolasi bakteri selulolitik, dan diberi label sebagai berikut: RYP 1, RYP 2, RYP 4, RYP 5, RYP 8, dan RYP 9. Enam isolat yang terpilih sebagai bentuk perwakilan dari koloni yang tumbuh dengan mengamati bentuk yang memiliki kemiripan. Setiap koloni tunggal isolat bakteri yang diperoleh pada hasil isolasi, ditumbuhkan pada media CMC secara gores kuadran. Hal ini dilakukan supaya diperoleh isolat murni atau berupa koloni tunggal. Kultur murni merupakan kultur yang sel-sel mikrobanya berasal dari pembelahan satu sel tunggal. Koloni tunggal isolat bakteri diberi label berupa angka dan diberi kuadran untuk setiap koloni tunggal pada media agar CMC yang baru. Enam isolat bakteri kemudian diisolasi dan dimurnikan untuk diperoleh isolat tunggal dari masing-masing koloni yang diperoleh (Gambar 2).



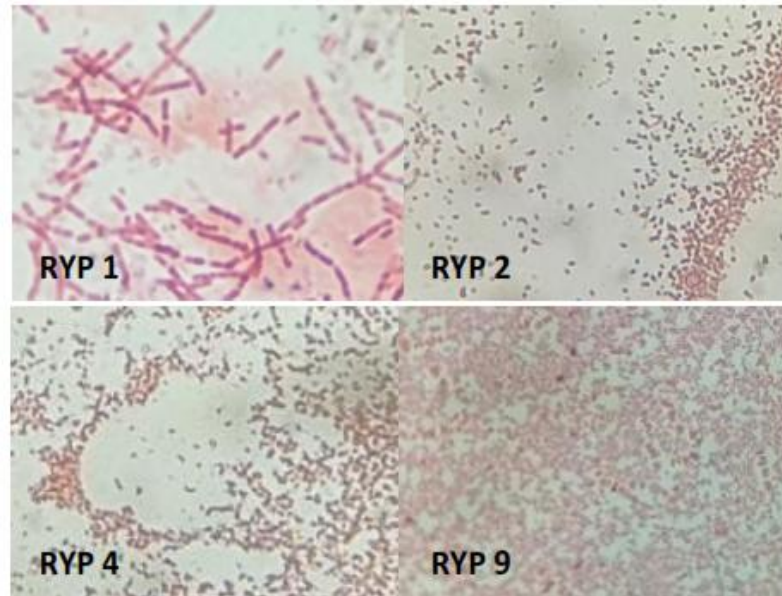
Gambar 2. Subkultur isolat tunggal bakteri pada media agar CMC. (*Subculture isolates of bacteria on CMC agar medium*).

Karakterisasi morfologi dan biokimia bakteri selulolitik

Karakteristik morfologi yang diperoleh dari isolat bakteri menunjukkan variasi yang berbeda. Morfologi isolat didominasi dengan bentuk bulat, tepi bergelombang dan halus, elevasi datar, serta warna putih maupun putih kekuningan. Ukuran diameter koloni berkisar dari 0,7 mm hingga 3,6 mm (Tabel 1).

Tabel 1. Morfologi koloni bakteri selulolitik yang diisolasi dari usus rayap *M. gilvus* (*Colony morphology of cellulolytic bacteria isolated from the gut of termites M. gilvus*).

Kode Isolat (Isolate Code)	Bentuk (Shape)	Tepian (Edge)	Elevasi (Elevation)	Warna (Color)	Diameter Koloni (Colony) (mm)
RYP1	Berkerut (Wrinkled)	Bergelombang (Undulate)	Lonjong (Umbonate)	Putih kekuningan (Yellowish white)	3,6
RYP 2	Lingkaran (Circular)	Halus (Smooth)	Cembung (Convex)	Putih kekuningan (Yellowish white)	1,6
RYP 4	Lingkaran (Circular)	Bergelombang (Undulate)	Datar (Flat)	Putih (White)	1,7
RYP 5	Lingkaran (Circular)	Halus (Smooth)	Timbul (Raised)	Putih (White)	1,2
RYP 8	Lingkaran (Circular)	Bergelombang (Undulate)	Datar (Flat)	Putih kekuningan (Yellowish white)	1,5
RYP 9	Lingkaran (Circular)	Halus (Smooth)	Datar (Flat)	Putih (White)	0,7



Gambar 3. Isolat bakteri setelah perwarnaan Gram dengan mikroskop perbesaran 100x. (*Bacterial isolates after Gram staining with 100x*).

Empat isolat bakteri diperoleh Gram negatif dengan warna sel kemerahan (Gambar 3), serta memperlihatkan bentuk sel berbeda yang disusun pada Tabel 2. Bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan yang lebih tipis sehingga hanya dapat mengikat warna merah safranin dan tidak mampu mempertahankan warna ungu kristal violet.

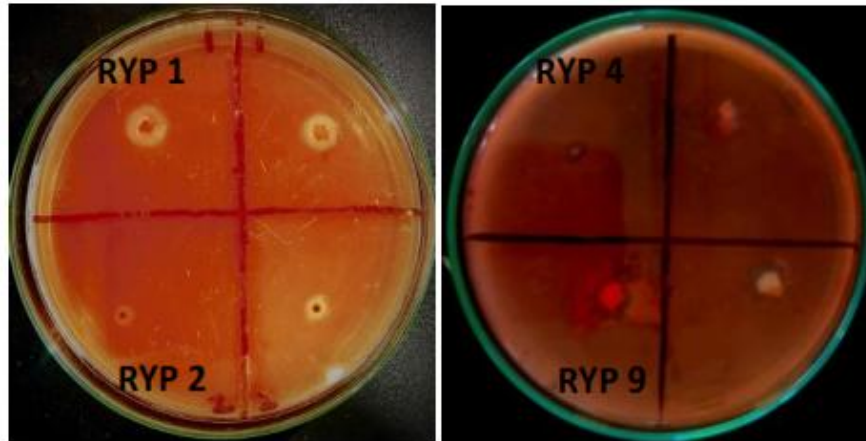
Tabel 2. Uji biokimia bakteri selulolitik yang diisolasi dari usus rayap *M. Gilvus* (*Biochemical test of cellulolytic bacteria isolated from the gut of termites M. gilvus*).

Isolat (Isolate)	Bentuk Sel (Cell Shape)	Selulolitik Indeks	Gram	Katalase	TSIA			Sitat	Motilitas	Indol	Gelatin	Hidrolisis Pati	MR	VP	Urease
					Glukosa	Laktosa	Sukrosa								
RYP 1	Basil	1,34	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
RYP 2	Coco	0,9	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
RYP 4	Basil	1,15	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
RYP 9	Coco Basil	0,73	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-

Hasil identifikasi melalui uji biomolekuler yang didukung oleh data uji biokimia, uji makroskopis dan uji mikroskopis, menunjukkan bahwa terdapat empat spesies bakteri yang berhasil diidentifikasi dari saluran pencernaan rayap *M. gilvus* Hagen yang berasal dari pesisir pantai di Bengkulu. Hasil uji makroskopis dan mikroskopis menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk basil, kokus, dan koko basil, bersifat anaerob fakultatif, tidak berspora, tidak memproduksi H₂S, mampu memfermentasi glukosa, uji katalase positif, uji *Methyl Red* positif, uji *Voges Proskauer* negatif, tidak menggunakan sitrat sebagai sumber energi, tidak mampu menghidrolisis urea, memiliki kemampuan dalam hidrolisis pati, dan mampu menguraikan gelatin mengacu pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Aktivitas selulolitik isolat bakteri

Keempat isolat bakteri menunjukkan adanya zona bening di sekitar isolat bakteri (Gambar 4). Munculnya zona bening menunjukkan kemampuan dalam menghidrolisis selulosa dalam media CMC. Isolat bakteri yang tumbuh pada media CMC menghasilkan enzim selulase yang diproduksi dalam sel bakteri, enzim selulase dikeluarkan supaya dapat memecah makromolekul karbohidrat menjadi oligosakarida.



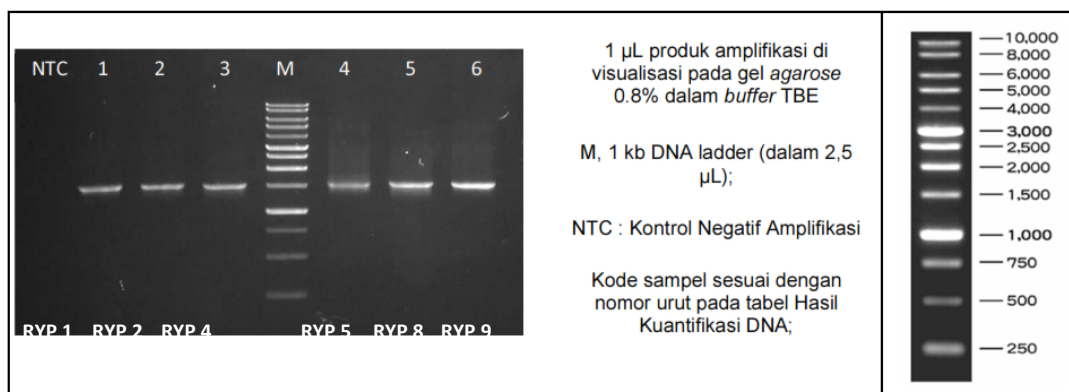
Gambar 4. Aktivitas selulolitik isolat bakteri dengan pewarna Congo red (*Cellulolytic activity of bacterial isolates with Congo red*).

Aktivitas selulolitik tertinggi yang diperoleh yaitu untuk RYP 1 yaitu 1,34 dengan kategori sedang, sementara itu aktivitas selulolitik terendah RYP 9 yaitu 0,73 dengan kategori rendah (Tabel 2). Hal ini terjadi karena terdapat perbedaan kemampuan enzim selulase yang dimiliki oleh isolat bakteri selulolitik.

Uji Biomolekular Isolat Bakteri

Isolasi DNA isolat bakteri dan amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR (Polymerase Chain Reaction)

Amplifikasi gen 16S rRNA ditentukan dengan PCR. Fragmen gen 16S rRNA diamplifikasi dan diuji dengan menggunakan elektroforesis gel untuk mengetahui hasil amplifikasi. Sebanyak enam fragmen gen 16S rRNA isolat bakteri masing-masing memperlihatkan hanya ada satu pita berada pada sekitar 1500 pasang basa (Gambar 5). Kemurnian hasil amplifikasi fragmen gen 16S rRNA ditentukan dengan munculnya hanya satu pita tebal dan tunggal pada gel elektroforesis. Namun pada RYP 5 dan RYP 8 terdapat smear pada pita DNA (Gambar 5), sehingga tidak dilanjutkan ke tahap berikutnya.



Gambar 5. Hasil produk PCR fragmen gen 16S rDNA pada gel agarosa hasil elektroforesis (*Results of PCR products of 16S rDNA gene fragments on gel electrophoresis*).

Selanjutnya fragmen gen 16S rRNA disekuensing dan dianalisis urutan basa nukleotidanya untuk mengetahui spesies dari masing-masing isolat bakteri, sehingga dapat ditentukan pohon filogenetik dari masing-masing isolat bakteri. Data BLAST-N gen 16S rRNA RYP 1, RYP 2, RYP 4, dan RYP 9 disajikan pada Tabel 5 dan pohon filogenetik dari setiap isolat bakteri dapat dilihat pada Gambar 7.

Tabel 3. Data BLAST-N gen 16S rRNA isolat RYP 1, RYP 2, RYP 4, dan RYP 9 (*BLAST-N data of 16S rRNA genes of isolates RYP 1, RYP 2, RYP 4, and RYP 9*).

Kode isolat (<i>Isolate code</i>)	Spesies dengan tingkat kekerabatan terdekat (<i>Species with the closest relative level</i>)	No Akses (<i>Accession Number</i>)	Panjang Sekuens (<i>Sequence Length</i>) (bp)	Persentase Kemiripan (<i>Percentage Similarity</i>) (%)
RYP 1	<i>Bacillus paramycoides strain MRC29424</i>	PP900104.1	1040	97
RYP 2	<i>Staphylococcus hominis stain OsEnb ALM D2: 29</i>	MN889356.1	1432	99
RYP 4	<i>Cellulomonas denverensis strain W6117</i>	AY655727.1	1401	97
RYP 9	<i>Acinetobacter nosocomialis strain ST02 54</i>	MH368653.1	1454	88

Data BLAST-N gen 16S rRNA isolat (Tabel 4) dan pohon filogenetik dari setiap isolat bakteri (Gambar 7), menunjukkan bahwa isolat RYP 1 mempunyai kemiripan dengan *Bacillus paramycoides strain MRC29424* dengan kemiripan 97%. Isolat RYP 2 hampir mirip dengan *Staphylococcus hominis stain OsEnb ALM D2* dengan kemiripan 99%. Sementara, isolat RYP 4 hampir mirip 97% dengan *Cellulomonas denverensis strain W6117* dan isolat RYP 9 hampir sama dengan *Acinetobacter nosocomialis strain ST02* dengan kemiripan 88%.

PEMBAHASAN

Preparasi, skrining, isolasi, pemurnian dan karakterisasi bakteri yang ada pada saluran pencernaan rayap

Rayap yang diperoleh merupakan rayap dari spesies *Macrotermes gilvus* Hagen, termasuk ke dalam *higher termite*. Rayap spesies ini diketahui banyak ditemukan pada pohon/akar yang sudah mati (Arif *et al.*, 2019; Arsyad *et al.*, 2018). Tanah dan pohon mati dengan kondisi yang lembab di sekitaran Danau Ilmu Universitas Bengkulu sangat sesuai untuk rayap *M. gilvus* dapat hidup. Hal ini sejalan dengan penelitian lain yang mengidentifikasi rayap *M. gilvus* yang berasal dari tanah gambut karena memiliki kelembaban yang juga mendukung kelangsungan hidup rayap *M. gilvus* Hagen (Oktiarni *et al.*, 2021).

Pewarnaan Gram isolat bakteri bertujuan untuk mengkarakterisasi morfologi sel bakteri dengan mengelompokkannya ke dalam kelompok bakteri Gram positif, yang ditandai dengan penampakan sel bakteri berwarna ungu, sementara itu bakteri Gram negatif ditandai dengan munculnya sel berwarna merah akibat memudarnya warna ungu kristal violet setelah dialirkan alkohol sehingga mengikat zat warna merah safranin (Irawati *et al.*, 2022). Keempat isolat bakteri yang diperoleh Gram negatif dengan bentuk sel basil untuk RYP1 dan RYP 4, kokus untuk RYP 2 serta koko-basil untuk RYP 9. Hal ini sejalan dengan penelitian Ferbiyanto *et al.* (2015) yang menunjukkan karakteristik bakteri Gram negatif yang berasal dari usus rayap *M. gilvus* di Bogor. Serta penelitian Oktiarni *et al.* (2021) melaporkan isolat bakteri selulolitik dari usus rayap *M. gilvus* Hagen di tanah gambut Indralaya menunjukkan bentuk sel basil, kokus dan koko-basil.

Aktivitas selulolitik digunakan untuk mengetahui kemampuan degradasi selulosa menggunakan metode zona bening (*Congo red*) yang merupakan uji semi kuantitatif karena skala angka dalam perhitungannya menggunakan data kualitatif. Data yang dihasilkan berupa perbandingan diameter zona bening dan diameter zona koloni. Zona bening menunjukkan adanya kelarutan enzim selulase, semakin tinggi kelarutan selulase maka akan semakin besar zona bening yang dihasilkan yang dihitung menggunakan rumus indeks selulolitik (Septiana *et al.*, 2024). Koloni bakteri selulolitik yang tumbuh akan menghasilkan enzim selulase yang bersifat ekstraseluler (Batubara *et al.*, 2021). Sifat ekstraseluler dijumpai pada enzim selulase yang diproduksi di dalam sel bakteri selulolitik, enzim akan dikeluarkan ke luar sel supaya dapat memecah molekul yang lebih besar menjadi molekul yang lebih kecil di luar lingkup sel (Setyati *et al.*, 2016).

Enzim selulase memiliki tiga komponen yaitu endo-1,4- β -D-glukanase, ekso-1,4- β -D-glukanase, dan 1,4- β -D-glukosidase (Robak dan Balcerek, 2018). Endo-1,4- β -D-glukanase akan memecah ikatan 1,4- β -glikosidik pada rantai selulosa dan akan menghasilkan rantai yang lebih pendek, ekso-1,4- β -D-glukanase akan memotong unit glukosa di ujung rantai selulosa maka akan menghasilkan disakarida, dan 1,4- β -D-glukosidase akan dapat menghidrolisis disakarida yang dihasilkan menjadi dua molekul glukosa (Batubara *et al.*, 2021). Penelitian lain yang mengisolasi rayap *M. gilvus* di tanah gambut menghasilkan indeks selulolitik tertinggi yaitu 4 dan indeks selulolitik terendah 0,8 (Oktiarni *et al.*, 2021). Hal ini terjadi karena terdapat perbedaan kemampuan enzim selulase yang dimiliki oleh bakteri selulolitik dalam menghidrolisis selulosa pada media CMC sehingga aktivitas selulolitik yang dihasilkan memiliki indeks yang berbeda.

Uji Biomolekular Isolat Bakteri

Hasil Tabel 4 menunjukkan bahwa isolat RYP 1, RYP 2, RYP 4, dan RYP 9 memiliki sekuens DNA dengan kemiripan yang identikal (similar) dengan DNA sekuens yang ada pada database. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *M. gilvus* di wilayah pesisir Bengkulu terdapat empat spesies bakteri selulolitik, yang memiliki kemiripan dengan spesies *Bacillus paramycoides*, *Staphylococcus hominis*, *Cellulomonas denverensis*, dan *Acnetobacter nosocomialis*. Oktiarni *et al.* (2025) mengisolasi spesies bakteri selulolitik dari usus rayap dari *Coptotermes curvignatus* dan diperoleh dua isolat bakteri, yaitu *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis*. Sementara pada *higher-level M. gilvus* di tanah gambut Indralaya, diperoleh enam spesies diantaranya *Enterobacter*, *Klebsiella pneumonia*, *K. quasipneumonia*, *K. varicella*, *Enterobacter rogenkampii*, dan *E.*

asburiae (Oktiarni *et al.*, 2022) Selain itu, Ferbiyanto *et al.* (2015) juga mengisolasi dua spesies bakteri selulolitik dari usus rayap *M. gilvus* Hagen di Bogor yaitu *Bacillus megaterium* and *Paracoccus yeei*. Penelitian lain Ali *et al.* (2019) mengisolasi lima spesies bakteri selulolitik pada usus rayap *lower-level Psammotermes hypostoma* di Al- Haraga Mesir, isolat yang berhasil diidentifikasi yaitu *Paenibacillus lactis*, *Lysinibacillus macrolides*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Lysinibacillus fusiformis*, and *Bacillus cereus*. Afzal *et al.* (2019) mengisolasi bakteri selulolitik usus rayap (*hindgut*) *Heterotermes indicola* di Islamabad, Pakistan dengan spesies *Bacillus licheniformis*. Bakteri selulolitik dari rayap *M. gilvus* Hagen yang ditemukan di wilayah pesisir Bengkulu memiliki karakteristik unik yang membedakannya dari wilayah lain, seperti adaptasi terhadap lingkungan pesisir dan kemampuan spesifik dalam mendegradasi selulosa. Perbedaan jenis bakteri yang ditemukan dalam penelitian ini dibandingkan dengan jenis bakteri yang ditemukan dalam penelitian sebelumnya dapat disebabkan oleh beberapa faktor kondisi lingkungan hidup rayap seperti suhu, kelembaban, dan jenis makanan. Selain itu, jenis bakteri yang berhasil diisolasi juga dipengaruhi oleh perbedaan dalam media kultur, teknik isolasi, dan teknik identifikasi yang digunakan.

KESIMPULAN

Rayap di wilayah pesisir Bengkulu diperoleh dari Kecamatan Kandang Limun, merupakan spesies *Macrotermes gilvus* Hagen. Enam bakteri selulolitik berhasil diisolasi dari saluran pencernaan rayap *M. gilvus* Hagen yang mampu tumbuh pada media agar CMC. Bakteri selulolitik yang diperoleh diketahui memiliki kekerabatan yang dekat dengan spesies *Bacillus paramycoides*, *Staphylococcus hominis*, *Cellulomonas denverensis*, dan *Acinetobacter nosocomialis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada UPP FMIPA Universitas Bengkulu yang telah memberikan dana penelitian melalui Dana RBA FMIPA Universitas Bengkulu Tahun 2024 dengan Nomor Kontrak 1662/UN.30.12/HK/2024.

KONTRIBUSI PENULIS

DO: Membuat konsep penelitian, mengumpulkan data penelitian, analisis data hasil penelitian, membuat draf artikel, merevisi naskah akhir; L: Analisis data hasil penelitian, merevisi naskah akhir; WSR: Mengumpulkan data penelitian, analisis data hasil penelitian, membuat draf artikel; EMS: Mengumpulkan data penelitian, analisis data hasil penelitian.

REFERENSI

- Afzal, M., Qureshi, M.Z., Khan, S., Khan, M.I., Ikram, H., Ashraf, A., Iqbal, A., and Qureshi, N.A., 2019. Production, purification and optimization of cellulase by *Bacillus licheniformis* HI-08 Isolated from the hindgut of wood-feeding termite. *International Journal of Agriculture Biology* 21, pp.125-134.
- Ali, H. R. K., Hemed, N. F., and Abdelaliem, Y. F. 2019. Symbiotic cellulolytic bacteria from the gut of the subterranean termite *Psammotermes hypostoma* Desneux and their role in cellulose digestion. *AMB Express*, 9(1), pp.1–9.
- Ananda, Z., Suhartono, S., Sirtina, S., Oviana, L., Alfizar, A., Samingan, S., and Syaukani, S. 2020. Identification and Phylogenetic Analysis of Entomopathogenic Fungal Isolates Using Molecular Approach. *Elkawnie: Journal of Islamic Science and Technology* 6, p.359.
- Arif, A., Muin, M., Larekeng, S.H., Lestari, P.I., 2019. Survey and morphological identification of termites (Insecta: Isoptera) in Teaching Forest of Hasanuddin University, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 270(1), p.012001.
- Arsyad, S., Wiyono, S., Herliyana, E.N., 2018. Screening of Cellulolytic Bacteria Originated from Termite Gut for Decomposing Rubber Tree Stump. *Jurnal Silvikultur Tropika*, 09, pp.217–22.

- Batubara, U. M., Mardalisa, M., Suparjo, S., Maritsa, H. U., Pujiyanto, E., & Herlini, M. 2021. Isolation and Characterization of Cellulolytic Bacteria Diversity in Peatland Ecosystem and Their Cellulolytic Activities. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 934(1), p.012028.
- Boontanom, P., and Chantarasiri, A.. 2021. Diversity and Cellulolytic Activity of Culturable Bacteria Isolated from the Gut of Higher Termites (*Odontotermes* Sp.) in Eastern Thailand. *Biodiversitas*, 22, pp.3349-57.
- Fathollahi, Z., Habibpour, B., Imani, S., Hassanzadeh, N., Abdigoudarzi, M., 2021. Identification of Cellulolytic Bacteria from Guts of *Microcerotermes diversus* Silvestri (Isoptera: Termitidae) in Southern Iran. *Current Microbiology*, 78, pp.1305-1316.
- Ferbiyanto, A., Rusmana, I., Rafiudin, R., 2015. Characterization and identification of cellulolytic bacteria from gut of worker *Macrotermes gilvus*. *Hayati Journal of Biosciences*, 22, pp.197-200.
- Helmiyetti, Darmi, and Wesa, R.O., 2021. The Species and Abundance of Subterranean Termites (Insecta: Isoptera) in the Area of University of Bengkulu. *Proceedings of the 3rd KOB*
- Hidayat, M.R., 2021. Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria Symbiont from Various Termites on Different Nest Type in Bukit Baka Bukit Raya National Park, West Kalimantan, Indonesia. *Walailak Journal of Science and Technology*, 18, pp.1-12.
- Irawati W, Ambarita PP, Sihombing DL, Advenita VESR, Marvella EB. 2022. Isolation and characterization of indigenous copper resistant bacteria from Yogyakarta tannery factory waste. *Journal Biologi Tropis*, 22, pp.795-802
- Javaheri-Kermani, M., and Asoodeh, A., 2019. A novel beta-1,4 glucanase produced by symbiotic *Bacillus* sp. CF96 isolated from termite (*Anacanthotermes*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, pp.752-759.
- Kurniawan, A., Sari, S. P., Asriani, E., Kurniawan, A., Sambah, A. B., Triswiyana, I., dan Prihanto, A. A. 2019. Kapasitas Hidrolisis Bakteri Pendegradasi Selulosa Dari Ekosistem Mangrove. *Journal of Tropical Marine Science*, 2, pp.76–82.
- Li, Q., Ng, W.T., Wu, J.C., 2014. Isolation, characterization and application of a cellulose-degrading strain *Neurospora crassa* S1 from oil palm empty fruit bunch. *Microbial Cell Factories*, 13, pp.1-8.
- Oktiarni D, Lusiana, Marsuganda A. 2025. Cellulolytic bacteria from *Coptotermes curvignathus* termite gut isolated from coastal area of Bengkulu, Indonesia. *Biodiversitas* 26, pp.3252-3261.
- Oktiarni D, Hermansyah, Ibrahim E, Marsi, Hasanudin, Miksusanti, Yanto DHY, Rahmani N, Kasmiarti G. 2023. The isolation of *Klebsiella variicola*'s cellulase from *Macrotermes gilvus* gut in Indralaya Peatlands, Indonesia. *Biodiversitas* 24, pp.4218-4222.
- Oktiarni, D., Kasmiarti, G., Nofyan, E., Miksusanti, Hasanudin, Hermansyah. 2022. Diversity of cellulolytic bacteria from *Macrotermes gilvus* gut isolated from Indralaya peatland region, Indonesia. *Biodiversitas* 23, pp.486-495.
- Oktiarni, D., Hermansyah, Hasanudin, Miksusanti, Nofyan, E., Kasmiarti, G., 2021. Isolation and identification cellulolytic bacteria from termite gut obtained from Indralaya peatland area. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 926(1), p.012024
- Pramana, A., Haitami, A., dan Jamalludin, J. 2018. Identifikasi Hama Rayap Kelapa Sawit di Desa Simpang Raya Kabupaten Kuantan Singingi. *Jurnal Agroteknologi Universitas Andalas*, 2, pp.6–9.
- Peristiwati, Natamihardja YS, Herlini H. 2018. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from termite gut (*Cryptotermes* sp.). *Journal of Physics: Conference Series*, 1013, p.012173.
- Robak, K., and Balcerek, M. 2018. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), 174–187.

- Santi, S. N., dan Widyaningrum, T. 2022. Produksi Bioetanol Dari Limbah Batang Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis*) menggunakan *Zymomonas mobilis* dengan Perlakuan Crude Enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. *Jurnal Biolokus*, 5, 18–23.
- Septiana, L., Emma, S., Yuli, H., Zulmai, R., & Robiatun, R. 2024. Penapisan Dan Karakterisasi Bakteri Selulolitik Termofilik. *Forte Journal*, 04(02), pp.472–480.
- Setyati, W. A., Habibi, A. S., Subagiyo, S., Ridlo, A., S, N., & Pramesti, R. 2016. Skrining Dan Seleksi Bakteri Symbion Spons Penghasil Enzim Ekstraseluler Sebagai Agen Bioremediasi Bahan Organik Dan Biokontrol Vibriosis Pada Budidaya Udang. *Jurnal Kelautan Tropis*, 19(1), pp.11.
- Sharma D, Joshi B, Bhatt MR, Joshi J, Malla R, Bhattarai T, Sreerama L. 2015. Isolation of cellulolytic organisms from the gut contents of termites native to Nepal and their utility in saccharification and fermentation of lignocellulosic biomass. *J Biomass Biofuel* 2, pp.11-20.
- Susilowati, D., Subekti, N., Bintari, S.H., 2018. The potential of microbial symbionts *Macrotermes gilvus* Hagen termite gut as degrading agents of cellulose in bioethanol production. *Biosaintifika*, 10, pp.395-400.
- Thermo Scientific. 2016. *Nano drop one user guide*. USA: Thermo Fisher Scientific Inc.
- Varghese, L.M., Agrawal, S., Sharma, D., Mandhan, R.P., Mahajan, R., 2017. Cost-effective screening and isolation of xylano-cellulolytic positive microbes from termite gut and termitarium. *3 Biotech*, 7, pp.1-7.