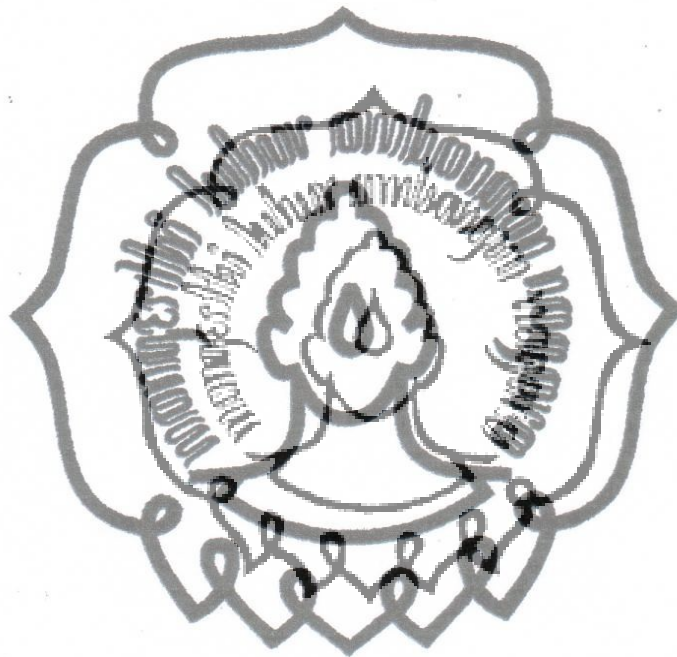


**ISOLASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER GEN PENYANDI  
16S rRNA BAKTERI SELULOLITIK DARI KOTORAN SAPI BALI  
(*Bos sondaicus*) DI TIMOR TENGAH SELATAN**

**TESIS**

*Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan guna memperoleh gelar  
Magister Sains Program Studi Biosain*



**Oleh**

**HILDEGARDIS MISSA**

**S901408004**


**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS SEBELAS MARET  
SURAKARTA**

*comm* 2016 *user*

**LEMBARAN PENGESAHAN****ISOLASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER GEN PENYANDI  
16S rRNA BAKTERI SELULOLITIK DARI KOTORAN SAPI BALI  
(*Bos sondaicus*) DI TIMOR TENGAH SELATAN**

Disusun Oleh

**HILDEGARDIS MISSA**  
**S901408004**

Komisi Pembimbing	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Pembimbing I	Dr. Ari Susilowati, M.Si. NIP. 19690428 199702 2 006		18/04 2016
Pembimbing II	Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si. NIP. 19660714 199903 2 001		20/04 2016

Telah diseminarkan dan dinyatakan telah memenuhi syarat  
Pada tanggal 29/04 2016Mengetahui  
Kepala Program Studi Biosain  
Program Pascasarjana**Dr. Ari Susilowati, M.Si.**  
NIP. 19690428 199702 2 006

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER GEN PENYANDI  
16S rRNA BAKTERI SELULOLITIK DARI KOTORAN SAPI BALI  
(*Bos sondaicus*) DI TIMOR TENGAH SELATAN**

**TESIS**

**Oleh**

**HILDEGARDIS MISSA**





**NIM S901408004**

Telah disetujui oleh tim penguji

Telah dipertahankan didepan tim penguji

Dinyatakan telah memenuhi syarat

Pada tanggal 04 Mei 2016

Jabatan	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Ketua	Prof. Dr. Sugiyarto, M.Si NIP. 196704301992031002		<u>11/5/2016</u>
Sekretaris	Prof. Drs. Suranto, M.Sc., Ph.D NIP. 195708201985031004		<u>11/5/2016</u>
Anggota Penguji	Dr. Ari Susilowati, M.Si. NIP. 196904281997022006		<u>10/5/2016</u>
	Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si. NIP. 196607141999032001		<u>10/5/16</u>

**Mengesahkan**

Direktur Program Pascasarjana

Kepala Program Studi Biosain



**Prof. Dr. Moh. Furqon Hidayatullah, M.Pd.**  
NIP. 196607271987021001

**Dr. Ari Susilowati, M.Si.**  
NIP. 196904281997022006

**PERNYATAAN ORISINALITAS DAN PUBLIKASI TESIS**

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa :

1. Tesis yang berjudul "ISOLASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER GEN PENYANDI 16S rRNA BAKTERI SELULOLITIK DARI KOTORAN SAPI BALI (*Bos sondaicus*) DI TIMOR TENGAH SELATAN" adalah karya penelitian saya sendiri dan tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila ternyata didalam tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia tesis beserta gelar MAGISTER serta diperoleh sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).
2. Tesis ini merupakan hak milik prodi Biosain PPs UNS. Publikasi sebagian atau keseluruhan isi tesis pada jurnal atau forum ilmiah lain harus seijin Ketua Prodi Biosain dan minimal satu kali publikasi menyertakan tim pembimbing serta *author*. Apabila dalam waktu sekurang-kurangnya satu semester (6 bulan sejak pengesahan tesis) saya tidak melakukan publikasi dari sebagian atau seluruh isi tesis, maka prodi Biosain berhak mempublikasikannya pada jurnal ilmiah yang diterbitkan oleh prodi Biosain PPs-UNS. Apabila saya melakukan pelanggaran publikasi ini maka saya bersedia mendapat sanksi akademik yang berlaku.

Surakarta, Januari 2016

wa  
715ADF877681958  
Rudegadis Missa  
S901408004

**Hildegardis Missa. NIM S901408004. ISOLASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER GEN PENYANDI 16S rRNA BAKTERI SELULOLITIK DARI KOTORAN SAPI BALI (*Bos sondaicus*) DI TIMOR TENGAH SELATAN** Komisi Pembimbing I Dr. Ari Susilowati, M.Si. Pembimbing II Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si. Tesis: Program Studi Biosain, Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta.

### ABSTRAK

Bakteri selulolitik memiliki kemampuan menguraikan selulosa menjadi monomer glukosa dan menjadikannya sebagai sumber karbon dan sumber energi. Pemanfaatan bakteri selulolitik yaitu sebagai penghasil enzim selulase yang dapat digunakan untuk menghidrolisis selulosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi, dan mengidentifikasi atau menentukan hubungan kekerabatan bakteri selulolitik dari kotoran Sapi Bali (*Bos sondaicus*) di Timor Tengah Selatan

Isolasi bakteri selulolitik dari kotoran Sapi Bali di Timor Tengan Selatan pada tiga tempat pemeliharaan sapi yaitu di sekitar Danau Supul, di lokasi karantina sapi, dan sistem pemeliharaan secara liar dilakukan dengan metode *spread plate* pada media *Carboximetil celulosa* (CMC). Aktivitas selulolitik dilihat adanya zona bening menggunakan indikator *Congo red* 0.1%. Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan identifikasi menggunakan perangkat BLAST pada NCBI untuk mengetahui similaritas bakteri selulolitik. Hubungan kekerabatan bakteri selulolitik dianalisis menggunakan *software* MEGA 7.0

Hasil penelitian diperoleh 48 isolat bakteri menunjukkan aktivitas selulase dan terdapat 12 isolat mempunyai aktivitas selulase tinggi dalam mengdegradasi selulosa yaitu isolat K1H6, K2H3, L2H7, S1H6, S2H5, K2H4, K1H2, S2H7, K3H2, S3H1, L1H4, dan L1H5 masing-masing dengan aktivitas selulase sebesar 7,08, 5,88, 5,82, 5,22, 5,07, 4,53, 3,36, 2,91, 2,67, 1,89, 1,55, 1,47. Berdasarkan analisis gen penyandi 16S rRNA 12 isolat bakteri selulolitik aktivitas tinggi mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas sp*, *Acinotobacter sp*, *Bacillus Cereus*, *Stenotrophomonas*, dan *Brachybacterium sp*. Terdapat tujuh isolat bakteri yang mempunyai potensi untuk dinyatakan sebagai spesies bakteri baru dengan presentasi similaritas < 97% yaitu isolat SIH6, S2H5, K2H3, K2H4, LIH4, LIH5, L2H7. Pada presentasi similaritas 97-99% yang menunjukkan kesamaan genus yaitu isolat S2H7, S3H1, K1H2, K1H6, dan K3H2. Berdasarkan pohon filogenetik bakteri selulolitik menunjukkan hubungan kekerabatan terdekat 0,0% yaitu isolat S2H7 dengan K2H4, Isolat S1H6 dengan K2H4, dan Isolat S2H7 dengan S1H6 dan isolat yang menunjukkan jarak genetik terjauh 19,3% adalah isolat L2H7 dengan *Brachybacterium sp*. S21F1.

Kata kunci: Bakteri selulolitik, isolasi, karakterisasi, hubungan kekerabatan, kotoran Sapi Bali (*Bos sondaicus*).



**Hildegardis Missa. NIM S901408004. ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION 16S rRNA ENCODING GENES OF CELLULOLYTIC BACTERIA FROM COW DUNG OF BALI CATTLE (*Bos sondaicus*) IN TIMOR TENGAH SELATAN. The supervisor I. Dr. Ari Susilowati, M.Si. II. Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si. Thesis. Program Study of Bioscience, Post Graduate Program. Sebelas Maret University.**

### ABSTRACT

Cellulolytic bacteria have the ability to decipher the cellulose into monomers glucose and transform it into a source of carbon and energy. Utilization of cellulolytic bacteria i.e., as a producer of cellulase enzyme that is used to hydrolyze cellulose. This research aims to isolate, characterize, and identify the relationship of cellulolytic bacteria from cow dung of Bali cattle (*Bos sondaicus*) in Timor Tengah Selatan.

The isolation of cellulolytic bacteria cow dung of Bali cattle in Timor Tengah Selatan in three cattle-raising places which are around Lake Supul, cattle quarantine location, and wild care system done by using *spread plate* method on *Carboximetil cellulose* (CMC) media. From the cellulolytic activities the clear zone is visible using 0.1% *Congo red* indicator. 16S rRNA gene amplification is conducted using *Polymerase Chain Reaction* (PCR) using 63F and 1387r Primers. The relationship of cellulolytic bacteria were analyzed using MEGA 7.0 software.

The results were obtained that 48 isolates showed cellulase activity and there were 12 isolates which have high cellulase activity in degrading cellulose that are K1H6, K2H3, L2H7, S1H6, S2H5, K2H4, K1H2, S2H7, K3H2, S3H1, L1H4 and L1H5 isolates each with cellulase activity amounted to 7,08, 5,88, 5,82, 5,22, 5,07, 4,53, 3,36, 2,91, 2,67, 1,89, 1,55, 1,47. Based on the analysis of 16S rRNA coding genes cellulolytic activity of 12 isolates possessed high similarity with *Pseudomonas sp* 96%, *Acinetobacter sp* 95%, *Bacillus Cereus* 97%, *Stenotrophomonas* 88%, and *Brachybacterium sp* 97%. There are seven bacterial isolates that have the potential to be declared as new bacterial species with <97% similarity percentage that are S1H6, S2H5, K2H3, K2H4, L1H4, L1H5, L2H7 isolates. At 97-99% similarity percentage that showed genus similarity are S2H7, S3H1, K1H2, K1H6, and K3H2 isolates. Based on the Phylogenetic tree cellulolytic bacteria showed closest relationship of 0,0% that is isolate S2H7 with K2H4, Isolate S1H6 with K2H4, and isolate S2H7 with S1H6 and isolate showed genetic distance farthest 19,3% that is isolate L2H7 with *Brachybacterium sp*. S21F1.

**Keywords :** Cellulolytic bacteria, isolation, characterization, relationship, cow dung of Bali cattle (*Bos sondaicus*)

## MOTTO

“Tuhan memberikan segala yang Ku minta dan Ia menghapus air mataku dengan  
suka cita yang besar “

“Hidup tentu harus terus melangkah tak peduli apa yang akan dijumpai, entah  
merah, biru bahkan putih sekalipun hanya saya yang tau karena diri saya adalah  
hidup saya, bukan hidup orang lain”



*commit to user*

## PERSEMBAHAN

Karya ini ku persembahkan kepada;

Bapak Landelinus Y. Missa dan Mama Lusiana Nell yang ku hormati dan ku cintai,  
Kakak dan adik (K Irna, K Renci, Adik Alako, Adik Benri) yang ku sayangi, dan  
keponakanku (Icha, Grace, dan Francesko) yang ku sayang dan ku rindukan.

Kakak Yahya Jackson Palinata Terima kasih atas doa dan dukungannya.



*commit to user*



## KATA PENGANTAR

Puji syukur bagi Tuhan yang Maha Pengasih dan Penyayang atas rahmat dan kehendak-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “ **ISOLASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER GEN PENYANDI 16S rRNA BAKTERI SELULOLITIK DARI KOTORAN SAPI BALI (*Bos sondaicus*) DI TIMOR TENGAH SELATAN**”. Tesis ini disusun untuk memenuhi persyaratan dalam mendapatkan gelar Magister Sain pada Program Biosain Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Bakteri selulolitik merupakan salah satu mikroba pendegradasi selulosa karena memiliki tingkat pertumbuhan yang lebih cepat dibanding kelompok mikroba lainnya. Bakteri selulolitik memiliki kemampuan menguraikan selulosa menjadi monomer glukosa dan menjadikannya sebagai sumber karbon dan sumber energi. Pemanfaatan bakteri selulolitik yaitu sebagai penghasil enzim selulase yang digunakan untuk menghidrolisis selulosa.

Penulis sadari bahwa dalam penulisan ini masih banyak kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki oleh penulis, walaupun telah berupaya dengan segala kemampuan untuk lebih teliti. Berbagai saran yang membangun penulis harapkan agar tulisan ini lebih bermanfaat.

Surakarta, 04 Mei 2016

Penulis

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur bagi Tuhan yang Maha Pengasih dan Penyayang atas rahmat dan kehendak-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “ **ISOLASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER GEN PENYANDI 16S rRNA BAKTERI SELULOLITIK DARI KOTORAN SAPI BALI (*Bos sondaicus*) DI TIMOR TENGAH SELATAN**”. Penulis menyadari bahwa terwujudnya tesis ini tidak lepas dari banyak pihak, karena itu penulis menyampaikan terimakasih kepada yan terhormat:

1. Prof. Dr. Mohammad Furqon Hidayatullah M.Pd selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta, yang telah memberikan kesempatan yang seluas-luasnya mengikuti pendidikan pascasarjana ini
2. Dr Ari Susilowati, M.Si selaku Ketua Program Studi BIOSAIN dan pembimbing pertama yang telah memberi motivasi, bantuan bimbingan serta dukungan sehingga penyelesaian program pembelajaran serta penulisan tesis dapat terselesaikan
3. Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si. selaku pembimbing kedua yang telah memberi motivasi dan bimbingan dalam menyelesaikan penelitian
4. Prof. Dr. Sugiyarto, M.si selaku pembimbing akademik yang telah memberi motivasi dan bimbingan dalam menyelesaikan pendidikan Pascasarjana ini
5. Lembaga Pengelola Dana Pendidikan yang telah mensupport dana untuk rangkaian penelitian ini.
6. Staf dan teknisi Laboratorium Fakultas Biologi MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah berkenan mengijinkan dan membantu penulis dalam melakukan penelitian
7. Bapak Landelinus Y. Missa, Mama Lusiana Nell, yang selalu memberikan restu, dan doa-doa disetiap langkah penulis, Kakak Irna Missa, K Renci Missa, Adek Alako Missa, Adek Bendri, Icha, Grace, Francesco yang semakin membuat penulis bersyukur berada di tengah-tengah keluarga ini.
8. Kakak Yahya Jacson Palinata yang telah memberikan dorongan secara moril dan spiritual sehingga penulisan Tesis ini dapat terselesaikan.

*commit to user*

9. Teman-teman Biosain Angkatan 2014 yang telah memberi bantuan dukungan dan kerjasamanya.

10. Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu dalam penyusunan tesis

Semoga segala kebaikan dibalas dengan kebaikan yang lebih baik dari Tuhan Yang maha Kuasa.

Surakarta, 04 Mei 2016

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSETUJUAN .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS .....	iv
ABSTRAK .....	v
ABSTRACT .....	vi
MOTTO .....	vii
PERSEMBAHAN .....	viii
KATA PENGANTAR .....	ix
UCAPAN TERIMA KASIH .....	xi
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	4
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Manfaat Penelitian .....	5
BAB II. LANDASAN TEORI .....	6
A. Tinjauan Pustaka .....	6
1. Bakteri selulolitik .....	7
2. Selulosa .....	7
3. Enzim selulase .....	9
4. Peran bakteri selulolitik .....	10
5. Karakteristik Sapi Bali ( <i>Bos sondaicus</i> ) .....	11
6. Gen penyandi 16S rRNA bakteri selulolitik .....	14
B. Kerangka berpikir .....	18
C. Hipotesis .....	20
BAB III. METODE PENELITIAN .....	21
A. Waktu dan Tempat Penelitian .....	21
B. Alat dan Bahan .....	21
1. Alat .....	21
2. Bahan .....	21
C. Rancangan Penelitian .....	22
1. Pengambilan sampel kotoran Sapi Bali .....	22
2. Sterilisasi alat dan bahan .....	22
3. Pembuatan media CMC dan indikator congo red .....	23
4. Isolasi bakteri selulolitik dari kotoran Sapi Bali di Timor Tengah Selatan .....	24
5. Populasi bakteri selulolitik .....	24
6. Koleksi kultur murni bakteri selulolitik .....	24
7. Seleksi dan uji aktivitas selulase bakteri selulolitik .....	24
8. Isolasi DNA genom bakteri selulolitik .....	25
9. Analisis kemurnian dan konsentrasi DNA dengan biofotometer ..	25

10. Amplifikasi gen penyandi 16S rRNA dengan PCR .....	26
11. Analisis hubungan kekerabatan.....	26
D. Teknik dan Analisis Data .....	26
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	28
A. Sapi bali ( <i>Bos sondaicus</i> ) Timor Tengah Selatan .....	28
B. Populasi bakteri selulolitik dari Kotoran Sapi Bali di Timor Tengah Selatan .....	30
C. Isolat bakteri selulolitik dari kotoran Sapi Bali di Timor Tengah Selatan .....	32
D. Isolat bakteri yang memiliki aktivitas selulase .....	34
1. Isolat Bakteri dari kotoran Sapi Bali di sekitar Danau Supul .....	34
2. Isolat Bakteri dari kotoran Sapi Bali di karantina sapi.....	35
3. Isolat Bakteri dari kotoran Sapi Bali yang dipelihara secara ekstensif.....	36
E. Identifikasi molekuler bakteri selulolitik aktivitas tinggi.....	38
F. Amplifikasi gen penyandi 16S rRNA dari isolat bakteri selulolitik kotoran Sapi Bali di Timor Tengah Selatan .....	39
G. Sekuens gen penyandi 16S rRNA .....	42
H. Hubungan kekerabatan bakteri selulolitik aktivitas tinggi .....	45
BAB V. PENUTUP .....	49
A. KESIMPULAN .....	49
B. SARAN .....	50
DAFTAR PUSTAKA .....	49



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Jumlah populasi bakteri pada kotoran Sapi Bali berdasarkan metode hitung cawan.....	31
Tabel 2. Jumlah isolat bakteri yang diperoleh dari hasil isolasi bakteri pada kotoran Sapi Bali di Timor Tengah Selatan .....	32
Tabel 3. Jumlah isolat bakteri selulolitik dari kotoran Sapi Bali ( <i>Bos sondaicus</i> ) di sekitar danau Supul.....	34
Tabel 4. Isolat bakteri selulolitik dari kotoran Sapi Bali di karantina sapi .....	35
Tabel 5. Isolat bakteri selulolitik dari kotoran Sapi Bali yang dipelihara secara ekstensif (liar).....	36
Tabel 6. Konsentrasi dan Kemurnian DNA Bakteri.....	39
Tabel 7. Kemiripan bakteri selulolitik berdasarkan gen penyandi 16S rRNA menggunakan program BLAST .....	43
Tabel 8. Analisis jarak genetik antar spesies dari gen penyandi 16S rRNA.....	48



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur selulosa pada tanaman hijau .....	10
Gambar 2. Degradase selulosa oleh selulase .....	12
Gambar 3. Kerangka berpikir .....	20
Gambar 4. Tempat pemeliharaan Sapi Bali di sekitar danau Supul .....	28
Gambar 5. Tempat pemeliharaan Sapi Bali di karantina sapi .....	29
Gambar 6. Pemeliharaan Sapi Bali secara ekstensif (liar) .....	29
Gambar 7. Zona bening menunjukkan aktivitas selulase isolat bakteri dari kotoran Sapi Bali di Timor Tengah Selatan .....	33
Gambar 8. Hasil produk PCR gen penyandi 16S rRNA bakteri selulolitik; M. Marker DNA. a) S1H6 b) S2H5 c) S2H7 d) S3H1 e) K1H2 f) K1H6 g) K2H3 h) K2H4 i) K3H2 j) L1H4 k) L1H5 l) L2H9 .....	41
Gambar 9. Pohon filogenetik bakteri selulolitik pada kotoran sapi <i>Sapi Bali</i> di Timor Tengah Selatan dan beberapa bakteri selulolitik yang ditemukan sebelumnya serta bakteri E.Coli yang sudah banyak diisolasi .....	46

