

**ANALISIS AKTIVITAS SELULASE DAN IDENTIFIKASI
MOLEKULER BAKTERI SELULOLITIK ASAL
LIMBAH TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT
MENGUNAKAN MARKA GEN 16S rRNA**

**Oleh :
EDO AGAM PAMUNGKAS
202114021**



**PROGRAM STUDI DIPLOMA IV
TEKNOLOGI PRODUKSI TANAMAN PERKEBUNAN
POLITEKNIK KELAPA SAWIT CITRA WIDYA EDUKASI
BEKASI
2025**

PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa Skripsi berjudul “Analisis Aktivitas Selulase dan Identifikasi Molekuler Bakteri Selulolitik Asal Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit Menggunakan Marka Gen 16S rRNA”. adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apapun 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 dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Politeknik Kelapa Sawit Citra Widya Edukasi.

Rekasi, 27 Februari 2025



Edo Agam Pamungkas

202114021

RINGKASAN

EDO AGAM PAMUNGKAS. Analisis Aktivitas Selulase dan Identifikasi Molekuler Bakteri Selulolitik Asal Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit Menggunakan Marka Gen 16S rRNA. Dibimbing oleh Dr. SYLVIA MADUSARI S.Si., M.Si., HALIDA ADISTYA PUTRI S.P., M.Si. dan RISA ROSITA S.Si., M.Si.

Bakteri selulolitik merupakan bakteri pendegregasi selulosa yang berperan dalam dekomposisi limbah organik, termasuk tandan kosong kelapa sawit (TKKS). Analisis aktivitas selulase dilakukan dengan menguji kemampuan isolat bakteri selulolitik dalam mendegregasi selulosa. Identifikasi molekuler dilakukan dengan tujuan eksplorasi keragaman spesies bakteri selulolitik asal limbah TKKS. Tujuan penelitian ini yaitu mengetahui aktivitas selulase isolat bakteri selulolitik asal limbah TKKS dan melakukan identifikasi spesies bakteri selulolitik asal limbah TKKS menggunakan pendekatan DNA *Barcoding*. Tahapan penelitian meliputi isolasi dan peremajaan isolat, uji hipersensitifitas, analisis aktivitas selulase (uji selulolitik), amplifikasi DNA, dan analisis bioinformatika (identifikasi spesies dan pohon filogenetik). Penelitian ini menggunakan isolat bakteri selulolitik yang berasal dari tiga lokasi TKKS yang berbeda. Isolat kode PO berasal dari kebun pupuk organik Sulung Research Station (SRS) ; kode PL berasal dari Kebun sawit PT.SSMS dan kode PK merupakan isolat bakteri yang berasal dari Pabrik Pengolahan Kelapa Sawit Sulung. Hasil peremajaan isolat media padat dengan waktu inkubasi 48jam dan media cair dengan waktu inkubasi selama 24 jam, kemudian dilakukan uji hipersensitivitas hasil pengujian menunjukkan sifat tidak patogen. Hasil analisis aktivitas selulase menggunakan metode uji selulolitik menunjukkan adanya aktivitas selulase pada isolat bakteri selulolitik asal limbah tandan kosong kelapa sawit. Kode PO dengan indeks selulolitik sedang, kode PL indeks selulolitik rendah, dan kode PK dengan tidak memiliki indeks selulolitik. Hasil amplifikasi DNA berdasarkan elektroforegram ketiga isolat memiliki pita tunggal yang tebal dan jelas dengan ukuran 1500 bp. Hasil analisa bioinformatika dari isolat bakteri selulolitik yang dilakukan identifikasi molekuler bakteri selulolitik Sampel PK merupakan spesies *Aeromonas enteropelogenes*, sampel PL spesies *Nitrosomonas stercoris*, dan sampel PO *Methylobacillus caricis*. Analisa kekerabatan spesies dilakukan menggunakan pohon filogenetik, hasil menunjukkan bahwa bakteri *Nitrosomonas stercoris* NCBI dan *Aeromonas enteropelogenes* NCBI memiliki homologi 96% dengan spesies *Methylobacillus caricis* NCBI. *Methylobacillus caricis* NCBI memiliki kemiripan 94% dengan *Methylobacillus caricis* PO, dengan kemiripan 20% terhadap spesies *Aeromonas enteropelogenes* PK dan 13% tingkat kemiripannya dengan spesies *Nitrosomonas stercoris* PL. Isolat teridentifikasi <97% sehingga dapat dikatakan spesies yang berbeda, sesuai dengan pendekatan DNA barcoding yang dilakukan. DNA barcoding menggunakan sekuen spesifik dalam mengkode spesies tertentu sehingga proses identifikasi berhasil dilakukan. namun tidak dapat dikatakan spesies yang sama karna homologi <97% sehingga dibutuhkan studi lanjutan terkait keragaman spesies bakteri selulolitik pada limbah tandan kosong kelapa sawit.

Kata kunci : Bakteri Selulolitik, DNA *Barcoding*, Gen 16S rRNA, Identifikasi Molekuler, dan Tandan Kosong kelapa Sawit.

SUMMARY

EDO AGAM PAMUNGKAS. Cellulase Activity Analysis and Molecular Identification of Cellulolytic Bacteria from Oil Palm Empty Bunch Waste Using 16S rRNA Gene Markers. Suverpised by Dr. SYLVIA MADUSARI S.Si., M.Si., HALIDA ADISTYA PUTRI S.P.,M.Si. dan RISA ROSITA S.Si., M.Si.

Cellulolytic bacteria are cellulose-digesting bacteria that play a role in decomposing organic waste, including empty fruit bunches (EFB). The analysis of cellulase activity was carried out by testing the ability of cellulolytic bacterial isolates to degrade cellulose, and molecular identification to explore the species diversity of cellulolytic bacteria from EFB waste. The purpose is to determine the cellulase activity of cellulolytic bacterial isolates from EFB waste, identify cellulolytic bacterial species from EFB waste, and identify the species of cellulolytic bacteria from EFB waste using DNA barcoding. Stages of research: isolation and rejuvenation isolates, hypersensitivity test, cellulase activity analysis (cellulolytic test), DNA amplification, and bioinformatics analysis (species identification and phylogenetic tree). This study used cellulolytic bacterial isolates from three different EFB locations. Isolate code PO from the organic fertilizer garden of Sulung Research Station (SRS); PL code from PT.SSMS palm oil plantation and PK code are isolated from the Palm Oil Factory and Processing of Sulung. The results of rejuvenation of solid media isolates with an incubation time of 48 hours and liquid media with an incubation time of 24 hours showed that the hypersensitivity test results were nonpathogenic. The results of cellulase activity analysis using the cellulolytic test method showed the presence of cellulase activity in isolates of cellulolytic bacteria from EFB waste. PO code with moderate cellulolytic index, PL code low cellulolytic index, and PK code with no cellulase activity did not have cellulolytic indeks. DNA amplification results on electrophoresis show that the three isolates have a single band that is thick and clear, with a size of 1500 bp. Results of bioinformatics analysis of cellulolytic bacterial isolates true molecular identification code PK species of *Aeromonas enteropelogenes*, code PL sample *Nitrosomonas stercoris* species, and code PO sample *Methylobacillus caricis*. Species kinship analysis using a phylogenetic tree, the results showed that the bacteria *Nitrosomonas stercoris* NCBI and *Aeromonas enteropelogenes* NCBI have 96% homology with the species *Methylobacillus caricis* NCBI. *Methylobacillus caricis* NCBI has 94% similarity with *Methylobacillus caricis* sample code PO, with 20% similarity to *Aeromonas enteropelogenes* PK species and 13% similarity with *Nitrosomonas stercoris* PL species. According to the DNA barcoding approach, isolates are identified as <97%, so that it can be said to be a different species. DNA barcoding uses specific sequences in the identification process. But, it is not the same species because homology <97%, so further studies are needed related to the diversity of cellulolytic bacterial species in oil palm empty fruit bunch waste.

Keywords: Cellulolytic Bacteria, DNA *Barcoding*, Gen 16S rRNA, Molecular Identification, and Empty Fruits Bunch Waste.

© Hak Cipta Milik Politeknik Kelapa Sawit Citra Widya Edukasi

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk penulisan karya ilmiah dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan Politeknik Kelapa Sawit Citra Widya Edukasi.

Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin Politeknik Kelapa Sawit Citra Widya Edukasi.

**ANALISIS AKTIVITAS SELULASE DAN IDENTIFIKASI
MOLEKULER BAKTERI SELULOLITIK ASAL
LIMBAH TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT
MENGUNAKAN MARKA GEN 16S rRNA**

EDO AGAM PAMUNGKAS

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk
memperoleh gelar Sarjana Terapan
pada
Program Studi Teknologi Produksi Tanaman Perkebunan

**PROGRAM STUDI DIPLOMA IV
TEKNOLOGI PRODUKSI TANAMAN PERKEBUNAN
POLITEKNIK KELAPA SAWIT CITRA WIDYA EDUKASI
BEKASI
2025**

Penguji Luar Komisi pada Ujian Skripsi: Ebenezer Muaratama Sibarani S.P., M.Si

Judul Skripsi : Analisis Aktivitas Selulase dan Identifikasi Molekuler Bakteri
Selulolitik Asal Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit
Menggunakan Marka Gen 16S rRNA
Nama : Edo Agam Pamungkas
NIM : 202114021

Disetujui Oleh
Komisi
Pembimbing

Pembimbing I



Dr. Sylvia Madusari, S.Si., M.Si.
NIP : 201108210

Pembimbing II



Halida Adistya Putri, S.P., M.Si.
NIP : 202012203

Pembimbing III



Risa Rosita, S.Si., M.Si.
NIP : 198507172012032101

Diketahui Oleh

Kepala Program Studi
Teknologi Produksi Tanaman Perkebunan



Halida Adistya Putri S.P., M.Si.
NIP : 202012203

Tanggal Ujian : 27 Februari 2025

Tanggal Lulus: 13 MAY 2025

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Penelitian Tugas akhir ini dilaksanakan sejak bulan September sampai Desember 2024. Konsentrasi tugas akhir dalam bidang Mikrobiologi Molekuler pada Program Studi D-IV Teknologi Produksi Tanaman Perkebunan dengan judul “Analisis Aktivitas Selulase dan Identifikasi Molekuler Bakteri Selulolitik Asal Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit Menggunakan Marka Gen 16S rRNA”.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Orang tua tercinta, Bapak Muhammad dan Ibu Marlinda serta keluarga tercinta, yang telah memberikan do'a serta dukungan kepada penulis secara penuh, selama penulis menempuh pendidikan dan menyelesaikan penelitian skripsi ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
2. Dr. Sylvia Madusari, S.Si, M.Si. Selaku dosen pembimbing 1 skripsi, yang telah mengarahkan, dan memotivasi serta memberikan dukungan selama pelaksanaan penelitian.
3. Halida Adistya Putri, S.P, M.Si. Selaku dosen pembimbing 2 Skripsi dan sekaligus Kepala Program Studi Teknologi Produksi Tanaman Perkebunan, yang telah memberikan motivasi serta dukungan.
4. Risa Rosita, S.Si, M.Si. Selaku dosen pembimbing 3 skripsi, yang telah mengarahkan, memotivasi, dan membantu selama pelaksanaan penelitian.
5. Ebenezer Muratama Sibarani, S.P., M.Si. Selaku dosen penguji skripsi yang telah memotivasi, memberikan kritik dan saran serta, meluangkan waktunya sehingga penulis dapat melaksanakan ujian skripsi.
6. Dr. Rhomi Ardiansyah, S.Hut., M.Si., Dewi Rahmawati, S.Si., M.Si., dan Dr. Ir. Supriyanto, Selaku Staf Seameo Biotrop yang telah mengarahkan, memotivasi serta memberikan dukungan selama kegiatan di laboratorium bioteknologi molekuler SEAMEO BIOTROP.
7. Dr. Fizrul Indra Lubis, S.P., M.P. selaku Head Of Sulung Research Station dan Ibnu Rizki Perdana, S.P., M.Agr, Selaku pembimbing Praktik Kerja Lapangan yang mengarahkan, memberikan masukan, serta menjembatani selama penelitian sewaktu PKL.
8. Sahabat penulis M. Khozi Al-Fariz, Fatria Rahman, M.Fikri Al-Gibran, dan teman Aldi Melsanditiya Pratama, Febrian Nadapdap, Teuku Furqan Alfansyah, seluruh Crew WSC, serta rekan seperjuangan TPTP21 yang tidak bisa disebutkan satu-persatu yang membersamai selama masa studi.

Penulis menyadari masih banyak terdapat kekurangan dalam penulisan skripsi ini, Kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan bagi penelitian ini demi hasil penelitian yang dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan pihak yang membutuhkan. Demikian yang dapat penulis sampaikan, Terimakasih.

Bekasi, 27 Februari 2025



Edo Agam Pamungkas
202114021

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	i
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan.....	2
1.3. Hipotesis.....	2
1.4. Manfaat penelitian.....	2
1.5. Lingkup Penelitian.....	3
1.6. Kerangka Pemikiran.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS).....	4
2.2. Bakteri Selulolitik.....	5
2.3. Selulase.....	13
2.4. DNA <i>Barcoding</i>	13
III. METODOLOGI	10
3.1. Waktu dan Tempat.....	10
3.2. Alat dan Bahan.....	10
3.2.1. Alat.....	10
3.2.2. Bahan.....	10
3.3. Rangkaian Penelitian.....	17
3.4. Tahapan Penelitian.....	18
3.4.1. Metode Isolasi dan Peremajaan isolat.....	18
3.4.2. Uji Hipersensitivitas.....	19
3.4.3. Metode Uji Aktivitas Selulase.....	20
3.4.4. Metode Amplifikasi DNA.....	21
3.4.5. Analisa Bioinformatika.....	22
A. Bioedit.....	22
B. NCBI.....	22
C. Megal1.....	22
3.5. Pelaksanaan Penelitian.....	22
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1. Hasil.....	23
4.1.1. Isolasi dan Peremajaan Isolat.....	23
4.1.2. Uji Hipersensitivitas.....	23
4.1.3. Uji Aktivitas Selulase.....	24
4.1.4. Amplifikasi DNA.....	25
4.1.5. Analisa Bioinformatika.....	25
A. Identifikasi Spesies.....	25
B. Pohon Filogenetik.....	26
4.2. Pembahasan.....	27

V. KESIMPULAN DAN SARAN	30
5.1. Kesimpulan	30
5.2. Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31
LAMPIRAN.....	38
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Kerangka pemikiran penelitian. Analisis aktivitas selulase dan identifikasi molekuler bakteri selulolitik asal limbah tandan kosong kelapa sawit.....	3
Gambar 2.	Hasil Pengamatan isolat bakteri selulolitik. Hasil pengamatan bentuk bakteri (A), Isolat kode PL berasal dari kebun sawit PT.SSMS (B), Isolat PO dari kebun pupuk organik SRS (C), Isolat PK berasal dari PKS Sulung (D).....	6
Gambar 3.	Hasil isolasi bakteri selulolitik yang berasal dari, kode PO berasal dari kebun pupuk organik SRS (A), kode PK berasal dari kebun sawit PT.SSMS (B), dan kode PL berasal dari PKS Sulung (C).....	6
Gambar 4.	Struktur kimia selulosa.....	13
Gambar 5.	Lokasi asal isolat. Sulung Research Station, Citra Borneo Indah (CBI GROUP), PT.SSMS (Sawit Sumbermas Sarana Tbk), Pangkalan Bun, Kalimantan Tengah (Goggle Earth, 2024).	16
Gambar 6.	Rangkaian Penelitian Skripsi	17
Gambar 7.	Tahapan Penelitian.....	18
Gambar 8.	Gambar limbah TKKS. Kebun pupuk organik SRS(A), kebun sawit PT.SSMS (B), PKS Sulung (C).....	18
Gambar 9.	Tahapan Amplifikasi DNA Bakteri Selulolitik, Asal Isolat kebun Pupuk organik SRS (PO), kebun sawit PT.SSMS (PL), PKS Sulung (PK).....	21
Gambar 10.	Hasil penanaman isolat bakteri (A), Media cair yang telah diinokulasi isolat (B), Hasil Pemurnian isolat (C).....	23
Gambar 11.	Hasil pengujian hipersensitivitas menunjukkan ketiga isolat bersifat tidak patogen yang dibuktikan dengan tidak adanya bercak nekrosis pada daun tembakau.....	23
Gambar 12.	Pengujian Aktivitas Selulase. 9 unit percobaan (PLU1, PLU2, PLU3,POU1, POU2, POU3, PKU1, PKU2 dan PKU3). (A), Isolat tanpa aktivitas selulase (B), Isolat dengan aktivitas selulase (C).....	24
Gambar 13.	Elektroforegram amplikon sampel bakteri selulolitik. M: Ladder DNA, PO: sampel kebun pupuk organik SRS, PL: sampel kebun sawit PT.SSMS, PK: sampel PK Sulung.....	25
Gambar 14.	Konstruksi pohon filogeni. Isolat bakteri dengan data gen bank NCBI.....	26

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Komposisi Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit.....	4
Tabel 2. Review Penelitian Terdahulu.....	7
Tabel 3. Komposisi Media CMC selektif bakteri.....	19
Tabel 4. Jadwal Kegiatan Penelitian	22
Tabel 5. Hasil analisis aktivitas selulase.....	24
Tabel 6. Hasil identifikasi Spesies Bakteri Selulolitik	25

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rangkaian penelitian ini dilakukan pada saat Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Sulung Research Station, CBI Group. Oleh (Pamungkas, 2024).....	39
Lampiran 2. Tampilan software bioedit	41
Lampiran 3. Tampilan Website NCBI.....	41
Lampiran 4. Tampilan software Mega11	41
Lampiran 5. Data Identitas spesies teridentifikasi	43
Lampiran 6. Data Identitas primer 16S rRNA	45

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

SINGKATAN	Nama	Pemakaian pertama kali pada halaman
TKKS	Tandan Kosong Kelapa Sawit	1
TBS	Tandan Buah Segar	1
Rna		2
SRS	Sulung Research Station	2
CBI	Citra Borneo Indah	2
PO	Isolat asal kebun pupuk organik SRS	3
PL	Isolat asal kebun sawit PT. SSMS	3
PK	Isolat asal PKS Sulung	3
CPO	<i>Crude palm oil</i>	4
PKO	<i>Palm kernel oil</i>	4
POME	<i>Palm oil mill effluent</i>	4
Ha	Hektar	4
°C	<i>Celcius</i>	4
DNA	<i>Deoxsiribosa nucleic acid</i>	13
Bp	<i>Base pair</i> (pasang basa)	14
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	14
CMC	<i>Carboxy Methyl Cellulose</i>	14
μL	Mikroliter	16
UV	<i>Ultaviolet</i>	16
mL	Mililiter	16
DB	Diameter zona bening	20
DK	Diameter Koloni	20
IS	Indeks selulolitik	20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	21
Rpm	<i>Revolutions per Minute</i>	21
V	<i>Ultaviolet</i>	21
DC	<i>Direct Current Voltage</i>	21
BLASTn	<i>Basic Local Search Aligment Tool nucleotide</i>	22
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>	22