

Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Lignolitik Penghasil Enzim Ligninase asal Sampah Dapur dan Kotoran Sapi

Screening and Characterization of Lignolytic Bacteria Producing Ligninolytic Enzymes from Kitchen Waste and Cow Manure

Desti Rahmadani Ekawati, Dini Ryandini, Taruna Dwi Satwika*

Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Jalan Dr. Soeparno 63 Grendeng Purwokerto Utara Kabupaten Banyumas
Jawa Tengah, 53122, Indonesia.

*corresponding author, E-mail: tarunadwisatwika@unsoed.ac.id

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 15/11/2025

Disetujui : 31/03/2026

Abstract

Delignification is a crucial initial step in the conversion of lignocellulosic biomass into value-added products. The aim of delignification is to dissolve lignin and break its chemical bonds, thereby facilitating the hydrolysis process. The use of lignolytic bacteria that produce ligninase enzymes—namely lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), and laccase offers a promising alternative. This study aimed to screen 33 bacterial isolates for lignin-degrading potential, determine their ligninase activities (lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase), and identify promising lignolytic isolates. Preliminary screening of lignolytic bacteria was conducted on Lignin-Mineral Salt Medium agar (L-MSM agar). The activity of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase enzymes was tested quantitatively using the spectrophotometric method. Bacterial characterization was based on phenetic features, including morphological, physiological, and biochemical traits. Among the 33 bacterial isolates screened, two isolates exhibiting lignolytic activity were obtained from cow dung (KS5) and kitchen waste (SD5). Isolate KS5 exhibited LiP, MnP, and laccase activities of 46.45 ± 7.56 U/mL, 3.11 ± 0.38 U/mL, and 8.54 ± 0.09 U/mL, respectively. Meanwhile, isolate SD5 produced LiP, MnP, and laccase enzyme activities of 49.45 ± 4.59 U/mL, 6.39 ± 1.07 U/mL, and 6.22 ± 0.55 U/mL, respectively. Phenetic characterization indicated that isolate SD5 was closely related to the genus *Bacillus*, whereas isolate KS5 could not be reliably assigned to a particular genus. These findings demonstrate the potential of indigenous bacterial isolates as sources of ligninolytic enzymes for lignocellulosic biomass pretreatment.

Key Words: laccase, lignin, lignolytic bacteria, lignin peroxidase, manganese peroxidase

Abstrak

Delignifikasi merupakan proses awal dalam pemanfaatan biomassa lignoselulosa menjadi produk bernilai tinggi. Proses ini bertujuan untuk melarutkan lignin dan menguraikan ikatan kimianya, sehingga mempermudah proses hidrolisis. Pemanfaatan bakteri lignolitik penghasil enzim ligninase; seperti lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP), dan lakase; dapat menjadi alternatif yang menjanjikan. Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi kemampuan degradasi lignin dari Isolat bakteri asal sampah dapur dan kotoran sapi yang telah diperoleh pada penelitian sebelumnya. Seleksi isolat bakteri dilakukan secara kualitatif dengan menumbuhkan bakteri pada medium Lignin-Mineral Salt Medium agar (L-MSM agar), sedangkan pengujian aktivitas enzim dilakukan secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri. Karakterisasi bakteri didasarkan pada karakter fenetik, yang meliputi sifat morfologi, fisiologi, dan biokimia. Sebanyak dua dari 33 isolat bakteri menunjukkan kemampuan lignolitik, yaitu KS5 yang berasal dari kotoran sapi dan SD5 yang berasal dari sampah dapur. Isolat KS5 menghasilkan aktivitas LiP, MnP, dan lakase masing-masing sebesar $46,45 \pm 7,56$ U/mL, $3,11 \pm 0,38$ U/mL, dan $8,54 \pm 0,09$ U/mL. Sementara itu, isolat SD5 menghasilkan aktivitas LiP, MnP, dan lakase masing-masing sebesar $49,45 \pm 4,59$ U/mL, $6,39 \pm 1,07$ U/mL, dan $6,22 \pm 0,55$ U/mL. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat SD5 termasuk dalam genus *Bacillus*, sedangkan isolat KS5 belum dapat diklasifikasikan ke dalam genus tertentu. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat bakteri indigenous yang berasal dari lingkungan kaya bahan organik berpotensi menjadi sumber enzim lignolitik untuk aplikasi pretreatment biomassa lignoselulosa.

Kata kunci: bakteri lignolitik, lakase, lignin, lignin peroksidase, mangan peroksidase

PENDAHULUAN

Lignoselulosa adalah komponen polisakarida yang melimpah dan terdiri dari tiga jenis polimer utama: selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Lignoselulosa banyak ditemukan pada limbah organik, seperti limbah dapur dan limbah pertanian, serta limbah dari industri kertas dan kayu (Agustiany

et al., 2022). Komponen ini dapat diolah menjadi berbagai produk bernilai tinggi, seperti pupuk organik, bioetanol, dan pakan ternak. Namun, pemanfaatan lignoselulosa masih belum optimal karena keberadaan lignin, yang menjadi faktor pembatas.

Lignin adalah senyawa heterogen kompleks yang sulit didegradasi secara alami karena terjalin erat dengan selulosa dan hemiselulosa di dalam dinding sel tanaman. Lignin berfungsi memberikan kekuatan struktural, ketahanan, dan kemampuan transportasi air pada dinding sel, serta melindungi dari degradasi oleh mikroorganisme dan enzim (Brink et al., 2019). Untuk memanfaatkan lignoselulosa secara maksimal, lignin perlu dihilangkan melalui proses delignifikasi. Proses ini mengubah struktur kimia lignoselulosa dengan cara mendegradasi lignin secara selektif dan menguraikan ikatan kimianya, sehingga kandungan lignin dapat terlarut dan dipisahkan dengan lebih mudah.

Delignifikasi secara biologis merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk mengolah lignoselulosa, terutama dengan memanfaatkan mikroorganisme penghasil enzim ligninase, termasuk bakteri lignolitik (Permata et al., 2022). Bakteri lignolitik mampu mendepolimerisasi lignin melalui aktivitas enzimatik sehingga menghasilkan senyawa aromatik dengan berat molekul yang lebih rendah. Beberapa jenis bakteri diketahui mampu menghasilkan enzim ligninase yang efektif dalam mendegradasi limbah lignoselulosa. Penelitian oleh Umashankar et al. (2018) menemukan bahwa 25 isolat bakteri yang berasal dari kotoran sapi, tanah, dan kompos memiliki kemampuan mendegradasi lignin. Sementara itu, penelitian Rupaedah et al. (2019) menunjukkan bahwa lima isolat bakteri yang berasal dari tandan kosong kelapa sawit mampu mendegradasi lignin secara efektif. Beberapa genera telah dilaporkan mampu menghasilkan enzim lignolitik ekstraseluler, seperti *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Mesorhizobium*, *Serratia*, *Pantoea*, *Thauera*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, dan *Pseudomonas* (Huang et al., 2013; Tian et al., 2016; Wang et al., 2016; Woo et al., 2014; Xiong et al., 2014; Yang et al., 2017; Zainith et al., 2019). Kemampuan bakteri dalam mendegradasi lignin merupakan respon dari aktivitas tiga kelompok utama enzim ekstraseluler yaitu lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP), dan lakase (Lac) (Mudita et al., 2019).

Meskipun berbagai bakteri lignolitik telah berhasil diisolasi dari beragam lingkungan, informasi mengenai potensi lignolitik isolat bakteri indigenous yang berasal dari tanah, sampah dapur, serasah daun, dan kotoran sapi masih terbatas. Selain itu, sebagian besar penelitian hanya berfokus pada kemampuan degradasi lignin secara kualitatif, sedangkan data mengenai aktivitas enzim lignin peroksidase, mangan peroksidase, dan lakase yang dihasilkan oleh isolat lokal masih belum banyak dilaporkan. Oleh karena itu, eksplorasi dan karakterisasi bakteri lignolitik dari berbagai sumber lingkungan diperlukan untuk memperoleh kandidat bakteri yang berpotensi digunakan dalam proses delignifikasi biomassa lignoselulosa.

Sebanyak 33 isolat bakteri yang berasal dari

tanah, sampah dapur, serasah daun, dan kotoran sapi telah berhasil diisolasi pada penelitian sebelumnya (Satwika et al., 2021). Namun, potensi lignolitik dan karakteristik enzimatik isolat-isolat tersebut belum pernah dievaluasi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi isolat bakteri yang berpotensi mendegradasi lignin, menentukan aktivitas enzim lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP), dan lakase (Lac) yang dihasilkan, serta mengidentifikasi isolat bakteri lignolitik potensial berdasarkan karakter fenetiknya.

MATERI DAN METODE

Peremajaan isolat bakteri

Sebanyak 33 isolat bakteri koleksi laboratorium Mikrobiologi asal sampah dapur, tanah, serasah daun, dan kotoran sapi (Satwika et al., 2021) diinokulasikan ke dalam medium *Nutrient Agar* (NA) miring secara aseptis menggunakan metode *streak*. Kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C.

Uji kualitatif kemampuan isolat bakteri (Xiong et al., 2020)

Isolat bakteri diuji kemampuan lignolitiknya secara kualitatif dengan cara menginokulasikan masing-masing isolat pada medium L-MSM Agar secara *streak*. Komposisi L-MSM Agar (dalam g.L⁻¹) adalah (NH₄)₂SO₄ 2,0; MgSO₄ 0,5; K₂HPO₄ 1,0; NaCl 0,5; alkali lignin 5,0; dan agar 20,0. Kemudian medium diinkubasi pada suhu 30°C selama 3-5 hari. Pertumbuhan isolat pada medium L-MSM yang menggunakan alkali lignin sebagai sumber karbon utama digunakan sebagai indikator awal kemampuan bakteri dalam memanfaatkan lignin. Isolat yang menunjukkan pertumbuhan selanjutnya dipilih untuk pengujian aktivitas enzim lignolitik.

Produksi enzimatik kasar

Inokulum disiapkan pada medium L-MSM *broth*. Sebanyak 1 mL inokulum diinokulasikan pada 50 mL medium L-MSM *broth* dan inkubasi pada suhu 32°C selama 72 jam dengan kondisi pengocokan pada 120 rpm. Hasil fermentasi diambil 2 mL untuk disentrifugasi pada 8000 rpm selama 15 menit. Supernatan digunakan sebagai enzim kasar.

Uji aktivitas enzim lignin peroksidase (LiP) (Tien & Kirk, 1988 dengan modifikasi)

Analisis aktivitas LiP dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL ekstrak enzim kasar pada campuran yang mengandung *veratryl alcohol* 2 mM, asam tartat 50 mM, dan H₂O₂ 0,4 mM kemudian divorteks. Aktivitas enzim diukur *optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 310 nm pada menit ke 0 dan 30.

Uji aktivitas enzim mangan peroksidase (MnP) (Orth et al., 1993)

Sebanyak 1 mL ekstrak enzim kasar dicampur dengan 1 mL buffer fosfat (pH 7), 500 µL H₂O₂, 500 µL MnSO₄, dan 1 mL *phenol red*. Reaksi dimulai dengan menambahkan H₂O₂ ke dalam campuran

reaksi. Sampel diambil 1 mL dari campuran reaksi dan ditambahkan 40 μ L NaOH 5M untuk menghentikan reaksi. Aktivitas enzim diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 610 nm pada menit ke 0 dan 30.

Uji aktivitas enzim lakase (Lac) (Sheikhi *et al.*, 2012)

Sebanyak 0,4 mL ekstrak enzim kasar ditambahkan pada campuran 0,5 mL buffer asetat (pH 5), dan 0,1 mL ABTS 1 mM kemudian divorteks. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengukur *optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm, pada menit ke 0 dan 30.

Penentuan aktivitas enzim (Perwitasari *et al.*, 2018)

Aktivitas enzim lignin peroksidase, mangan peroksidase, dan lakase dihitung berdasarkan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{(\text{At}-\text{Ao}) \times \text{vol total (ml)} \times 10^6}{\epsilon \text{ maks} \times d \times \text{vol enzim} \times t}$$

Keterangan:

Ao = absorbansi awal (menit ke-0)

At = absorbansi akhir (menit ke-30)

d = ketebalan kuvet

ϵ maks = absorptivitas molar untuk masing-masing substrat pada uji enzim: ABTS: 3600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, veratril alkohol: 9300 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Phenol red: 2200 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Identifikasi isolat bakteri (Cappuccino & Welsh, 2018)

1. Karakterisasi morfologi

Isolat bakteri yang memiliki potensi untuk mendegradasi lignin dikarakterisasi secara makromorfologi, sifat yang diamati adalah bentuk koloni, warna koloni, tepi koloni, elevasi koloni, dan karakteristik optik. Isolat bakteri juga dikarakterisasi secara mikromorfologi untuk melihat bentuk sel dan sifat Gram, dan keberadaan endospora.

2. Uji katalase

Isolat bakteri sebanyak 1 ose dioleskan di atas object glass menggunakan jarum ose. Kemudian reagen H_2O_2 diteteskan di atas ulasan bakteri. Interpretasi positif dari uji katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung.

3. Uji oksidase

Isolat bakteri sebanyak 1 ose dioleskan pada kertas saring lembab menggunakan jarum ose. Kemudian reagen tetrametil parafenilendiamine diteteskan di atas ulasan bakteri dan amati perubahan warna yang terjadi. Hasil positif dari uji oksidase adalah adanya perubahan warna menjadi biru gelap.

4. Uji fermentasi karbohidrat

Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan pada media *Phenol Red Glucose Broth* dalam tabung reaksi berisi tabung Durham. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Hasil positif

ditandai dengan perubahan warna medium menjadi kuning karena produksi asam dan terdapat gelembung pada tabung Durham.

5. Uji indol

Isolat bakteri sebanyak 1 ose diinokulasikan pada medium *Tryptone broth*, kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Reagen kovac diteteskan setelah inkubasi selesai. Interpretasi positif dari uji indol ditandai dengan adanya warna merah pada lapisan larutan.

6. Uji reduksi nitrat

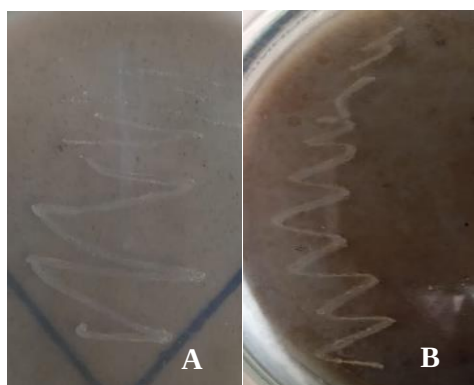
Sebanyak 1 ose isolat bakteri ditumbuhkan pada medium *nitrate broth* dan inkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Kemudian reagen asam sulfanilat dan alfa naftilamin ditambahkan ke dalam larutan. Interpretasi positif dari uji reduksi nitrat adalah terjadinya perubahan warna pada larutan menjadi merah.

Identifikasi isolat bakteri

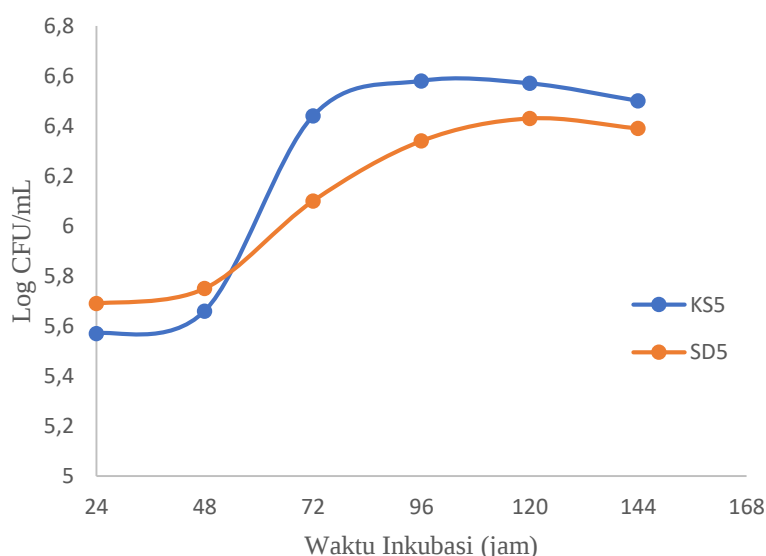
Analisis aktivitas enzim dilakukan menggunakan dua kali ulangan. Data disajikan sebagai rerata $\pm$ standar deviasi. Analisis deskriptif digunakan untuk membandingkan aktivitas lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP), dan lakase (Lac) yang dihasilkan oleh masing-masing isolat bakteri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian kemampuan lignolitik 33 isolat bakteri dalam medium *Lignin Mineral Salt Medium* (L-MSM) agar menggunakan metode kualitatif. Sebanyak dua isolat bakteri menunjukkan aktivitas lignolitik yaitu SD5 dan KS5. Pertumbuhan isolat pada medium L-MSM menunjukkan kemampuan bakteri untuk memanfaatkan lignin sebagai sumber karbon utama (Gambar 1). Namun demikian, kemampuan degradasi lignin secara spesifik perlu dikonfirmasi melalui pengukuran aktivitas enzim lignolitik yang terlibat dalam proses depolimerisasi lignin. Isolat SD5 merupakan bakteri asal sampah dapur, sedangkan isolat KS5 berasal dari kotoran sapi (Satwika *et al.*, 2021). Isolat bakteri asal tanah dan limbah dapur dapat tumbuh dalam medium mineral yang mengandung lignin sebagai satu-satunya sumber karbon, dan tumbuh optimum pada konsentrasi lignin 0,5% (Ahmed *et al.*, 2018; Sharadamma *et al.*, 2021; Thirupathi *et al.*, 2021). Menurut Kameshwar & Qin (2016) tidak semua bakteri dapat tumbuh dengan menggunakan lignin atau kraft lignin sebagai satu-satunya sumber karbon karena tingginya berat molekul dan kemampuan degradasi yang terbatas. Hanya bakteri tertentu yang dapat bertahan hidup dalam konsentrasi lignin yang tinggi karena aromatik turunan lignin memiliki efek berbahaya yang dapat menyebabkan kematian sel, kerusakan DNA, dan penghambatan enzim (Khan *et al.*, 2022).



Gambar 1. Pertumbuhan isolat bakteri SD5 dan KS5 pada medium L-MSM. A : isolat SD5, B : isolat KS5



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri Lignolitik Isolat KS5 dan SD5

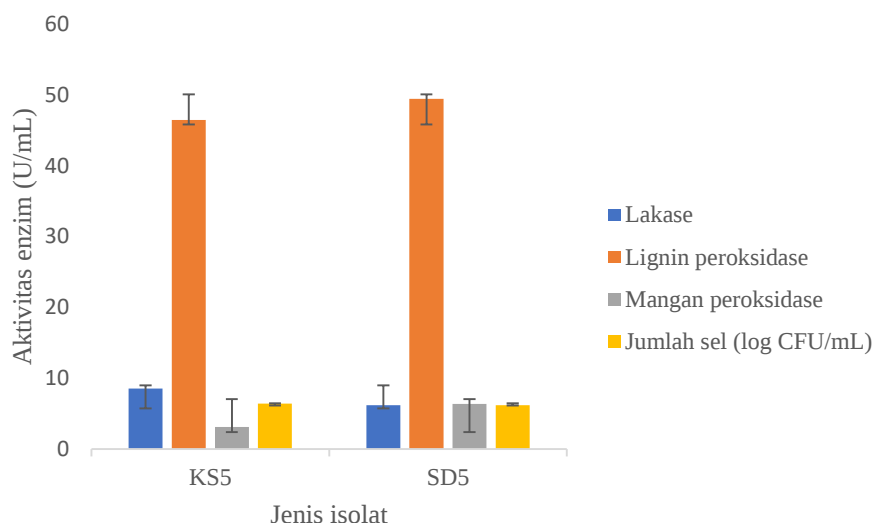
Kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa kedua isolat lignolitik mampu tumbuh pada medium L-MSM yang mengandung lignin sebagai sumber karbon utama (Gambar 2). Populasi isolat KS5 meningkat dari 5,58 Log CFU/mL pada 24 jam inkubasi menjadi 6,58 Log CFU/mL pada 96 jam inkubasi, sedangkan isolat SD5 meningkat dari 5,69 Log CFU/mL menjadi 6,43 Log CFU/mL pada 120 jam inkubasi. Peningkatan populasi ini menunjukkan bahwa kedua isolat mampu memanfaatkan senyawa lignin sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan.

Isolat KS5 menunjukkan laju pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan isolat SD5, yang ditunjukkan oleh peningkatan populasi yang lebih tajam pada periode 48–72 jam. Sementara itu, isolat SD5 mengalami peningkatan populasi secara bertahap hingga mencapai kepadatan maksimum pada 120 jam inkubasi. Perbedaan pola pertumbuhan tersebut mengindikasikan adanya variasi kemampuan adaptasi dan pemanfaatan substrat lignin antara kedua isolat.

Berdasarkan kurva pertumbuhan, produksi enzim lignolitik dilakukan pada jam ke-72 ketika

kedua isolat berada pada fase eksponensial. Pemilihan waktu ini didasarkan pada pertimbangan bahwa produksi enzim ekstraseluler umumnya meningkat selama fase pertumbuhan aktif dan dapat mencapai aktivitas maksimum pada akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner. Dube et al. (2023) melaporkan bahwa lama inkubasi memengaruhi produksi enzim aktif, sedangkan peningkatan biomassa sel berkontribusi terhadap peningkatan produksi enzim lignolitik (Kurniawati et al., 2019).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa kedua isolat menghasilkan tiga jenis enzim lignolitik, yaitu lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP), dan lakase (Lac) (Gambar 3). Aktivitas enzim tertinggi pada kedua isolat ditunjukkan oleh lignin peroksidase. Isolat KS5 menghasilkan aktivitas LiP sebesar $46,45 \pm 7,56$ U/mL, sedangkan isolat SD5 menghasilkan aktivitas LiP sebesar $49,45 \pm 4,59$ U/mL. Aktivitas lakase pada isolat KS5 dan SD5 masing-masing sebesar $8,54 \pm 0,09$ U/mL dan $6,22 \pm 0,55$ U/mL, sedangkan aktivitas MnP masing-masing sebesar $3,11 \pm 0,38$ U/mL dan $6,39 \pm 1,07$ U/mL.



Gambar 3. Aktivitas enzim ligninase isolat KS5 dan SD5

Dominannya aktivitas lignin peroksidase dibandingkan enzim ligninolitik lainnya mengindikasikan bahwa proses degradasi lignin oleh kedua isolat kemungkinan lebih banyak melibatkan oksidasi senyawa aromatik nonfenolik. Lignin peroksidase diketahui memiliki kemampuan mengoksidasi struktur lignin dengan potensial redoks tinggi, termasuk komponen nonfenolik yang menyusun sebagian besar struktur lignin. Oleh karena itu, enzim ini sering berperan penting pada tahap awal depolimerisasi lignin dan pembentukan senyawa aromatik dengan berat molekul yang lebih rendah.

Meskipun isolat KS5 menunjukkan laju pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan SD5, aktivitas ligninase yang dihasilkan tidak selalu lebih tinggi. Isolat SD5 menghasilkan aktivitas LiP dan MnP yang lebih tinggi dibandingkan KS5, sedangkan aktivitas lakase lebih tinggi pada KS5. Hasil ini menunjukkan bahwa kemampuan produksi enzim ligninolitik tidak hanya dipengaruhi oleh jumlah sel, tetapi juga oleh karakteristik fisiologis dan regulasi metabolisme masing-masing isolat bakteri. Perbedaan habitat asal isolat juga diduga berkontribusi terhadap variasi profil enzim yang dihasilkan.

Aktivitas ligninase yang diperoleh pada penelitian ini relatif lebih tinggi dibandingkan beberapa laporan sebelumnya. Priyanka *et al.* (2021) melaporkan bahwa isolat bakteri asal kotoran sapi hanya menghasilkan aktivitas lignin peroksidase sebesar 0,11 U/mL, lakase sebesar 0,004 U/mL, dan mangan peroksidase sebesar 0,006 U/mL. Perbedaan aktivitas enzim tersebut dapat dipengaruhi oleh jenis isolat, komposisi medium, sumber lignin yang digunakan, kondisi inkubasi, serta metode pengukuran aktivitas enzim.

Karakterisasi isolat KS5 dan SD5 dilakukan secara morfologi, fisiologi, dan biokimia dengan

hasil yang ditampilkan dalam Tabel 1. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kedua isolat merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang. Hal ini terindikasi dari warna sel bakteri lignolitik berdasarkan pewarnaan Gram yang menunjukkan warna ungu. Pewarnaan endospora yang dilakukan menunjukkan bahwa isolat bakteri SD5 merupakan bakteri pembentuk endospora. Endospora adalah struktur sel bakteri yang berperan untuk melindungi bakteri dari tekanan fisik dan kimia, seperti kering, panas, paparan bahan kimia, dan radiasi atau kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan (Mawardika *et al.*, 2023).

Uji fisiologis bakteri terdiri dari pengaruh suhu dan pengaruh pH. Hasil uji bakteri lignolitik terhadap pengaruh suhu menunjukkan kedua isolat bakteri termasuk ke dalam kelompok bakteri mesofil, karena bakteri dapat tumbuh pada kisaran suhu 29-40°C. Hasil pengujian terhadap pH menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri digolongkan ke dalam mikroba yang toleran terhadap kondisi alkali, karena tumbuh pada pH 7-10. Uji katalase menunjukkan reaksi positif. Aktivitas katalase ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung pada media sebagai akibat penguraian H_2O_2 dan pembentukan oksigen (Panjaitan *et al.*, 2020). Kedua isolat bakteri lignolitik memiliki enzim katalase untuk melindungi diri dari hidrogen peroksida. Hasil pengamatan pada uji oksidase isolat KS5 dan SD5 menunjukkan reaksi positif yang ditandai dengan warna biru setelah ditetesi oleh reagen oksidase. Satwika *et al.* (2021) menjelaskan bahwa uji oksidase digunakan untuk mengidentifikasi enzim sitokrom oksidase, yang bertanggung jawab atas rantai transpor elektron dalam respirasi aerob.

Uji indol pada kedua isolat menunjukkan hasil yang negatif. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak menghasilkan enzim tryptophanase, yang memungkinkan mereka untuk menguraikan triptofan

Tabel 1. Hasil karakterisasi bakteri lignolitik isolat KS5 dan SD5

Karakteristik	Kode isolat	
	KS5	SD5
Makromorfologi		
Bentuk koloni	Sirkuler	Irregular
Warna koloni	Putih	Putih
Elevasi koloni	Raised	Rata
Tepi koloni	Rata	Undulate
Karakter optik	Translucent	Opaque
Ukuran koloni	Kecil	Kecil
Mikromorfologi		
Sifat Gram	Gram positif	Gram positif
Bentuk sel	Basil	Basil
Endospora	Tidak ada	Ada
Karakter fisiologis		
Pertumbuhan pada pH 3	-	-
Pertumbuhan pada pH 7	+	+
Pertumbuhan pada pH 10	+	+
Pertumbuhan pada suhu 4°	-	-
Pertumbuhan pada suhu 29°	+	+
Pertumbuhan pada suhu 40°	+	+
Karakter biokimia		
Fermentasi karbohidrat		
• Sukrosa	+	+
• Glukosa	+	+
• Laktosa	+	-
Indol	-	-
Katalase	+	+
Oksidase	+	+
Reduksi nitrat	+	-

Keterangan:

Fermentasi karbohidrat: * terbentuk gelembung

dan menghasilkan senyawa indol bersama dengan asam piruvat dan amonia. Reaksi reagen kovacs dengan alkohol menyebabkan permukaan media menjadi merah (Gunawan et al., 2022). Uji reduksi nitrat pada isolat KS5 menunjukkan hasil positif dan isolat SD5 menunjukkan hasil negatif. Interpretasi positif pengujian ini ditunjukkan dengan perubahan warna pada medium menjadi merah. Hal ini sesuai dengan Cappuccino & Welsh (2018) bahwa perubahan warna menjadi merah setelah ditetesi dengan reagen asam sulfanilat dan alfa naftilamin menunjukkan bakteri mampu mereduksi nitrat oleh enzim nitrat reduktase.

Hasil uji fermentasi karbohidrat dengan glukosa, sukrosa, dan laktosa pada kedua bakteri lignolitik menunjukkan bahwa isolat KS5 dapat memfermentasi karbohidrat pada ketiga gula, serta dapat memproduksi gas. Sementara isolat SD5 hanya dapat melakukan fermentasi karbohidrat apabila gula berupa sukrosa dan glukosa, serta tidak memproduksi gas. Interpretasi positif pada uji fermentasi karbohidrat ditunjukkan dengan perubahan warna pada medium menjadi kuning, serta terdapat gelembung gas pada tabung Durham. Perubahan warna pada medium merupakan akibat dari produksi asam (Fitriani et al., 2016). Bakteri akan

memfermentasi gula untuk menghasilkan energi berupa asam piruvat dan asam asetat, bersama dengan gelembung gas CO₂ dalam media (Putri & Kurnia, 2018).

Berdasarkan karakterisasi fenetik yang merujuk pada Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Vos et al., 2011), isolat SD5 menunjukkan kemiripan karakteristik dengan genus *Bacillus*, sedangkan isolat KS5 belum dapat merujuk pada suatu karakter genus tertentu. Genus *Bacillus* termasuk bakteri Gram positif yang dapat membentuk endospora, memiliki bentuk batang lurus atau sedikit melengkung. Endospora *Bacillus* terdiri hanya satu spora per sel, berbentuk bulat atau silinder. Bersifat aerob atau fakultatif anaerob, serta beberapa spesies digambarkan sebagai anaerob. *Bacillus* bersifat motil dan bergerak melalui flagela peritrikus. Genus *Bacillus* memiliki suhu optimum 30-37°C dan dapat tumbuh pada pH 5-10. *Bacillus* dapat ditemukan di berbagai habitat dan lingkungan ekstrim karena tingkat kepekaan terhadap panas, pH, dan salinitas yang tinggi (Napitupulu et al., 2019).

Penelitian oleh Yang et al. (2021) menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. dapat tumbuh efektif pada medium selektif dengan lignin sebagai satu-satunya sumber karbon. Ahmed et al. (2018) dalam

penelitiannya yang mengisolasi bakteri dari sampah dapur menunjukkan bahwa *Bacillus* memiliki aktivitas lignolitik, serta dapat menghasilkan enzim lakase. Beberapa bakteri mampu menghasilkan enzim ligninase diantaranya *Bacillus* sp., *Sphingomonas* sp., *Streptomyces* sp., dan *Pseudomonas* sp (Prakoso *et al.*, 2014).

SIMPULAN

Dari 33 isolat bakteri yang diuji, dua isolat yaitu KS5 dan SD5 menunjukkan kemampuan tumbuh pada medium Lignin-Mineral Salt Medium (L-MSM) sehingga berpotensi sebagai bakteri lignolitik. Kedua isolat mampu menghasilkan enzim lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP), dan lakase (Lac), dengan aktivitas lignin peroksidase sebagai aktivitas tertinggi yang terdeteksi. Berdasarkan karakterisasi fenetik, isolat SD5 menunjukkan kemiripan karakteristik dengan genus *Bacillus*, sedangkan isolat KS5 belum dapat diidentifikasi hingga tingkat genus. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat bakteri yang berasal dari sampah dapur dan kotoran sapi berpotensi menjadi sumber enzim ligninolitik untuk mendukung proses delignifikasi biomassa lignoselulosa.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih diberikan kepada Universitas Jenderal Soedirman dan Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) yang telah memberikan pendanaan penelitian melalui Skema Riset Peningkatan Kompetensi tahun 2022 di bawah pengawasan BLU Unsoed dengan nomor kontrak T/862/UN23.18/PT.01.03/2022

DAFTAR REFERENSI

- Agustiany, E. A., Ridho, M. R., Rahmi, M., Madyaratri, E. W., Falah, F., Lubis, M. A. R., Solihat, N. N., Syamani, F. A., Karungamye, P., Sohail, A., Nawawi, D. S., Prianto, A. H., Iswanto, A. H., Ghozali, M., Restu, W. K., Juliana, I., Antov, P., Kristak, L., Fatriasari, W. & Fudholi, A. 2022. Recent Developments in Lignin Modification and its Application in Lignin-Based green Composites: A Review. *Polymer Composites*, 43(8), pp. 1-18.
- Ahmed, S., Rahman, S., Hasan, M., Paul, N. & Sajib A. A. 2018. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass: Discovery of Novel Natural Lignocellulolytic Bacteria. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 99(2), pp. 137-146.
- Brink, D. P., Ravi, K., Liden, G. & Gorwa-Grauslund, M. F. 2019. Mapping the Diversity of Microbial Lignin Catabolism: Experience from the eLignin Database. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 103, pp. 3979- 4002.
- Cappuccino, J. G. & Welsh, C., 2018. *Microbiology A Laboratory Manual Eleventh Edition*. London: Pearson.
- Dube, S. L., Osunsanmi, F. O., Ikhane, A. O., Mosa, R. A. & Opoku, A. R. 2023. Optimization of the Culture Conditions of Bacterial Strains (*Escherichia coli* LR0250096.1 and *Pseudomonas aeruginosa* CP031449.2) to Produce Lignin Peroxidase. pp. 1-10.
- Fitriani, Meylina, L. & Rijai, L., 2016. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Antibiotik dari Tanah Sawah. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceutical Conferences*, pp. 125-132.
- Gunawan, Kholik & Agustin, A. L. D., 2022. Profil Uji Biokimia Hasil Isolasi *Escherichia coli* pada Feses, Air Minum dan Air Saluran Buangan Kandang Sapi Bali Di Kelompok Tani Ternak Menemeng (KT2M) Kabupaten Lombok Tengah. *Mandalika Veterinary Journal*, 2(1), pp. 26-36.
- Huang, X. F., Santhanam, N., Badri, D. V., Hunter, W. J., Manter, D. K., Decker, S. R., Vivanco, J. M., & Reardon, K. F., 2013. Isolation and characterization of lignin-degrading bacteria from rainforest soils. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6), pp. 1616–1626. <https://doi.org/10.1002/bit.24833>
- Kameshwar, A. K. S. & Qin, W., 2016. Qualitative and Quantitative Methods for Isolation and Characterization of Lignin-Modifying Enzymes Secreted by Microorganisms. *BioEnergy Research*, pp. 248-266.
- Khan, S. I., Zarin, A., Ahmed, S., Hasan, F., Belduz, A. O., Canakci, S., Khan, S., Badshah, M., Farman, M. & Shah, A. A. 2022. Degradation of Lignin by *Bacillus altitudinis* SL7 Isolated from Pulp and Paper Mill Effluent. *Water Science & Technology*, 85(1), p. 420.
- Kurniawati, L., Kusdiyantini, E. & Wijanarka. 2019. Pengaruh Variasi Suhu dan Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri *Serratia marcescens*. *Jurnal Akademia Biologi*, 8(1), pp. 1-9.
- Mawardika, H., Pertiwi, K. K., Wahyuni, D. & Aulia, Q. W., 2023. Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Kandidat Probiotik dari Terasi Udang Rebon. *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*, 11(2), pp. 1216-1226.
- Mudita, I. M., Partama, I. B. G. & Suberata, I. W., 2019. *Bakteri Lignoselulolitik Probiotik Sumber Asam Amino*. Denpasar: Swasta Nulus.

- Napitupulu, H. G., Rumengan, I. F. M., Wullur, S., Ginting, E. L., Rimper, J. R. T. S. L. & Toloh, B. H. 2019. *Bacillus* sp. sebagai Agensi Penurai dalam Pemeliharaan *Brachionus rotundiformis* yang Menggunakan Ikan Mentah Sebagai Sumber Nutrisi. *Jurnal Ilmiah Platax*, 7(1), pp. 158-169.
- Orth, A. B., Rosye, D. J. & Tien, M., 1993. Ubiquity of Lignin Degrading Peroxidase Among Various Wood-Degrading Fungi. *Appl Environ Microbiol*, 59(12), pp. 4017-4023.
- Panjaitan, F. J., Bachtiar, T., Arsyad, I., Lele, O. K. & Indiyani, W. 2020. Karakterisasi Mikroskopis dan Uji Biokimia Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) dari Rhizosfer Tanaman jagung Fase Vegetatif. *jurnal Ilmu Pertanian dan Lingkungan*, 1(1), pp. 9-17.
- Permata, D. A., Kasim, A., Asben, A. & Yusniwati, 2022. Pengaruh Penggunaan Lindi Hitam pada Proses Bidelignifikasi Tandan Kosong Kelapa Sawit terhadap Degradasi Komponen Lignoselulosa. *Jurnal Teknologi Pertanian Andalas*, 26(1), pp. 124-129.
- Perwitasari, U., Dimawarnita, F. & Ratnakomala, S. 2018. Optimasi Produksi Enzim Ligninolitik dari Medium Limbah Produksi *Pleurotus ostreatus* Menggunakan Metode Respons Permukaan. *Menara Perkebunan*, 86(1), pp. 29-37.
- Prakoso, H. T., Widiastuti, H., Suharyanto & Siswanto, 2014. Eksplorasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Ligninolitik serta Aplikasinya Untuk Pengomposan Tandan Kosong Kelapa Sawit. *Menara Perkebunan*, 82(1), pp. 15-24.
- Priyanka, A., Subhashini, R., Jayashree, R. & Vendan, T. R., 2021. Bioprospecting of Microorganisms with Lignocellulolytic Enzyme Activity for Leaf Litter Degradation. *The Pharma Innovation Journal*, 10(11), pp. 465-470.
- Putri, A. M. & Kurnia, P., 2018. Identifikasi Keberadaan Bakteri Coliform dan Total Mikroba dalam Es Dung-dung di Sekitar Kampus Universitas Muhammadiyah Surakarta.. *Media Gizi Indonesia*, 13(1), p. 41.
- Rupaedah, B., Purwoko, D., Saffarida, A., Tajuddin, T., Wahid, A., Sugianto, M., Suja'i, I. & Suyono, A. 2019. Skrining dan Identifikasi Mikroba Ligninolitik pada Pengomposan Alami Tandan Kosong Kelapa Sawit. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 6(1), pp. 139-148.
- Satwika, T. D., Yulianti, D. M. & Hikam, A. R., 2021. Karakteristik dan Potensi Enzimatik bakteri Asal Tanah Sampah Dapur dan Kotoran Ternak sebagai Kandidat Agen Biodegradasi Sampah Organik. *Al-Hayat- Journal of Biology and Applied Biology*, 4(1), pp. 11-18.
- Sharadamma, N., Ghosh, D. & Khan, S., 2021. Isolation and Characterization of Lignin Degrading Bacteria. *Journal of Advanced Scientific Research*, 12(4), pp. 140-149.
- Sheikhi, F., Ardakani, M. R., Enayatizamir, N. & Couto, S. R., 2012. The Determination of Assay for Laccase of *Bacillus subtilis* WPI with Two Classes of Chemical Compounds as Substrates. *Indian Journal Microbiol*, 54(4), pp. 701-707.
- Thiruppathi, K., Rangasamy, K., Ramasamy, M. & Muthu, D., 2021. Evaluation of Textile Dye Degrading Potential of Ligninolytic Bacteria Consortia. *Environmental Challenges*, Volume 4, pp. 1-9.
- Tian, J. H., Pourcher, A. M., & Peu, P., 2016. Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin and lignin-related compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 63(1), 30-37. <https://doi.org/10.1111/lam.12581>
- Tien, M. & Kirk, T. K. 1998. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, 161, pp. 238-249.
- Umashankar, N., Megashree, H. M., Benherlal, P. & Chavan, M., 2018. Isolation and Screening of Lignin Degrading Bacteria from Different. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(12), pp. 609-617.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H. & Whitman, W. B. 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: Volume 3: The Firmicutes. New York: Springer.
- Wang, L., Nie, Y., Tang, Y. Q., Song, X. M., Cao, K., Sun, L. Z., Wang, Z. J., & Wu, X. L., 2016. Diverse bacteria with lignin degrading potentials isolated from two ranks of coal. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), pp. 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01428>
- Woo, H. L., Hazen, T. C., Simmons, B. A., & DeAngelis, K. M., 2014. Enzyme activities of aerobic lignocellulolytic bacteria isolated from wet tropical forest soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(1), pp. 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.10.001>
- Xiong, X. Q., Liao, H. D., Ma, J. S., Liu, X. M., Zhang, L. Y., Shi, X. W., Yang, X. L., Lu, X. N., & Zhu, Y. H., 2014. Isolation of a rice endophytic bacterium, *Pantoea* sp. Sd-1, with ligninolytic activity and characterization of its rice straw degradation ability. *Letters in Applied Microbiology*, 58(2), pp. 123-129. <https://doi.org/10.1111/lam.12163>

- Xiong, Y. et al., 2020. Characterization of Ligninolytic Bacteria and Analysis of Alkali-Lignin Biodegradation Products. *Polish Journal of Microbiology*, 69(3), pp. 339-347.
- Yang, C. X., Wang, T., Gao, L. N., Yin, H. J., & Lü, X., 2017. Isolation, identification and characterization of lignin-degrading bacteria from Qinling, China. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), pp. 1447–1460. <https://doi.org/10.1111/jam.13562>
- Yang, J. et al., 2021. Isolation and Characterization of *Bacillus* Sp. Capable of Degradating Alkali Lignin. *Frontiers in energy Research*, pp. 1-7.
- Zainith, S., Purchase, D., Saratale, G. D., Ferreira, L. F. R., Bilal, M. & Bharagava, R. N. 2019. Isolation and Characterization of Lignin-Degrading Bacterium *Bacillus aryabhatai* from Pulp and Papper Mill Wastewater and Evaluation of its Lignin-Degrading Potential. *Biotech*, 9(92), pp. 1-11.