

## Sekuensing 16S DNA Bakteri Selulolitik Asal Limbah Cairan Rumen Sapi Peranakan Ongole

(SEQUENCING OF 16S DNA OF CELLULOLYTIC BACTERIA  
FROM BOVINE RUMEN FLUID WASTE ONGOLE CROSSBREED)

Widya Paramita Lokapirnasari<sup>1</sup>, Adriana Monica Sahidu<sup>2</sup>,  
Tri Nurhajati<sup>1</sup>, Koesnoto Supranianondo<sup>1</sup>, Andreas Berny Yulianto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Peternakan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga,  
Kampus-C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia 60115.  
Telp. Kantor 031-5992785; Email: [widyaparamitalokapirnasari@gmail.com](mailto:widyaparamitalokapirnasari@gmail.com)

<sup>2</sup>Departemen Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Unair

<sup>3</sup>Lab. Kedokteran Dasar, Fakultas Kedokteran Hewan,  
Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, Jl. Dukuh Kupang XXV/54 Surabaya

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi lebih lanjut isolat selulolitik kode WPL 214 yang telah diisolasi dari cairan rumen sapi peranakan ongole dari limbah Rumah Potong Hewan Surabaya. Koloni tunggal dari isolat selulolitik ditumbuhkan pada 5 mL media cair Luria Bertani (LB) dengan komposisi 1% NaCl, 1% tripton, 0,5% yeast ekstrak, yang mengandung 1% substrat *carboxymethyl cellulose* (CMC) pada suhu 37°C, dengan pengocokan menggunakan *shaker incubator* selama ±16-18 jam. Penelitian ini terdiri dari dua tahap, tahap pertama dilakukan isolasi DNA, tahap kedua dilakukan identifikasi gen penyandi 16S DNA, amplifikasi DNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR). Amplifikasi gen penyandi 16S DNA menggunakan Kit *High Fidelity Platinum Taq DNA Polymerase* dengan primer forward PB36 5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' dan primer reverse PB38 5'-GMT ACC TTG TTA CGA CTT-3' yang digunakan untuk PCR. Hasil sekuensing nukleotida dari 16S DNA selanjutnya dibandingkan dengan urutan nukleotida dari *GenBank database* untuk dilakukan BLAST untuk mengidentifikasi berdasarkan pohon filogeni. Bakteri tersebut mampu menunjukkan adanya zona bening pada media *Carboxymethyl cellulose* (CMC) dengan pewarnaan *congo red*. Adanya zona bening tersebut berhubungan dengan aktivitas mikroba untuk mendegradasi selulosa. Simpulan penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan hasil urutan nukleotida genom 16S DNA serta pohon filogeni, maka isolat selulolitik tersebut diidentifikasi sebagai *Enterobacter cloacae* WPL 214.

Kata-kata kunci: bakteri selulolitik; PCR, sequencing; pohon filogenetik

### ABSTRACT

This study aimed to identify cellulolytic inoculant code WPL 214 isolated from bovine rumen fluid waste of Ongole Cross Breed of Surabaya Slaughterhouse. A single colony of isolates cellulolytic grown on 5 mL of liquid media LB (Luria Bertani) consist of 1% NaCl, 1% tripton, 0.5% yeast extract, containing 1% carboxymethyl cellulose (CMC) at temperature 37°C, using a shaker of incubator during 16-18 hours. That isolate determined by 16S DNA gen analysis using *High Fidelity Platinum Taq DNA Polymerase* with primer forward PB36 5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' and primer reverse PB38 5'-GMT ACC TTG TTA CGA CTT-3' for PCR. Nucleotide sequence of 16S DNA fragment was determined through the sequencing method. The result was then compared with *GenBank database* to recognize the type of the sample bacteria. DNA isolation and 16S DNA coding genes amplification were carried out using Kit *High Fidelity Platinum Taq DNA Polymerase*. Afterward, BLAST was applied to identify the phylogenetic tree. The bacteria was capable of indicating the existence of clear zone in a media CMC by congo red staining. The existence of the clear zone associated with the activity of microbes to degrade cellulose. The conclusion of this research based on the results was the sequencing nucleotides genome 16S DNA showed that cellulolytic inoculant was identified as *Enterobacter cloacae* WPL 214.

Keywords: *cellulolytic bacteria*; PCR; sequencing; phylogenetic tree

## PENDAHULUAN

Rumen mengandung populasi mikrob yang kompleks, terdiri dari bakteri, protozoa, dan jamur. Bakteri selulolitik merupakan bakteri heterotrop yang termasuk golongan saprofit, yaitu bakteri yang mampu memanfaatkan sisa-sisa tumbuhan yang telah mati untuk memenuhi kebutuhan hidupnya. Bakteri saprofit memerlukan gula (karbohidrat) sebagai sumber energi dalam jumlah tertentu, nitrogen organik, fosfor dan garam-garam mineral, beberapa asam amino, vitamin, sterol untuk memenuhi kebutuhan sel (Campbell, 1985).

Bakteri selulolitik yang terdapat di dalam rumen ternak ruminansia mampu menghasilkan enzim selulolitik yang berperan untuk mendegradasi selulosa. Degradasi selulosa oleh bakteri selulolitik tersebut merupakan hasil kerja sekelompok enzim selulase yang bekerja secara sinergis, yaitu *endo-(1,4)- $\alpha$ -D-glucanase*, *exo-(1,4)- $\alpha$ -D-glucanase*, dan  *$\alpha$ -glucosidase* (Mathew et al., 2008). Bakteri selulolitik *Enterobacter cloacae* strain Razmin-C telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari saluran pencernaan rayap, dengan menggunakan *Bergey's manual*, teknik *polymerase chain reaction* (PCR), dan *16S rRNA sequence homology*. Rayap merupakan serangga di daerah tropis dan berkembang pada kayu dan bersifat selulolitik, sehingga bakteri yang diisolasi berguna dalam degradasi bahan selulosa untuk meningkatkan pencernaan serta untuk produksi enzim. *Enterobacter* mampu berperan pada senyawa yang berbeda, yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin. Bakteri tersebut telah dilaporkan berperan dalam degradasi lignoselulosa (Ramin et al., 2008; Ramin et al., 2009).

Berdasarkan laporan penelitian sebelumnya, telah diketahui bahwa isolat selulolitik *E. cloacae* WPL 214 memiliki kemampuan menghasilkan tiga macam enzim selulase yaitu, *endo- $\alpha$ -1,4-glucanase* sebesar 0,09 unit/mL (U/mL), *exo- $\alpha$ -1,4-glucanase* sebesar 0,13 U/mL, dan  *$\alpha$ -glucosidase* sebesar 0,10 U/mL (Lokapirnasari et al., 2015). Namun, isolat selulolitik tersebut belum diidentifikasi secara molekuler, sehingga perlu dilakukan uji lebih lanjut melalui isolasi DNA serta amplifikasi gen penyandi 16S DNA dengan PCR untuk mengidentifikasi lebih lanjut isolat selulolitik tersebut secara molekuler, sehingga dapat ditemukan isolat selulolitik yang baru. Pemilihan *E. cloacae* yang bersifat selulolitik

didasarkan pada adanya zona bening pada media *Carboxymethyl cellulose* (CMC) dengan *congo red* yang memiliki diameter paling besar, hal ini berhubungan dengan semakin besar kemampuan mikrob untuk memanfaatkan selulosa (Hatami, 2008). Pemilihan *E. cloacae* WPL 214 juga berdasarkan pada aktivitas enzim selulolitik yang dilakukan dengan cara menentukan jumlah gula pereduksi yang terbentuk, yaitu menggunakan metode asam 3,5-*dinitrosalisilat* (DNS), *p-nitrophenyl cellobioside* (pNPC), dan *p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glukopiranoside* (pNPG) dengan CMC sebagai substrat spesifik. Bakteri *E. cloacae* WPL 214 memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan spesies bakteri selulolitik yang telah teridentifikasi tersebut.

Sekuensing DNA merupakan proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu segmen molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, yang merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Pengurutan (*sequencing*) asam nukleat memungkinkan untuk mengetahui kode genetik dari molekul DNA. Sekuensing DNA selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas mau pun fungsi gen atau fragmen DNA dengan cara membandingkan sekuens-nya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui (Glick, 2010; Rogers, 2011). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi lebih lanjut isolat selulolitik kode WPL 214 yang telah diisolasi dari cairan rumen sapi peranakan ongole dari limbah RPH Surabaya. Identifikasi dilakukan melalui pohon filogeni berdasarkan susunan nukleotida pada genom 16S DNA untuk membuktikan adanya isolat selulolitik baru yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulase.

## METODE PENELITIAN

### Isolasi DNA Bakteri Selulolitik

Isolasi DNA bakteri selulolitik dilakukan dengan menggunakan metode Ausubel et al. (2003). Bahan isolat yang digunakan diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya yaitu *E. cloacae* WPL 214 (Lokapirnasari et al., 2015). Suspensi sel sebesar 100 mL yang sudah ditumbuhkan, dipanen dengan sentrifugasi 10 menit, 6000 rpm, 4°C. Supernatan dibuang, sedangkan *pellet* sel diresuspensikan dengan 5 mL buffer

*Tris Ethylenediaminetetraacetic acid* (TE) 50 mM (50 mM tris Cl ( pH 8.0); 50 mM EDTA). Selanjutnya suspensi dibekukan pada suhu minus 20°C selama 30 menit. Larutan *lisozyme* 10 mg/mL sebanyak 500 µL ditambahkan pada sel beku, kemudian dicairkan pada suhu kamar, setelah cair segera dipindahkan ke dalam es selama 45 menit, kemudian ditambahkan larutan SDS 0,5%, 50 mM tris Cl (pH 8,0), 0,4 M EDTA, Proteinase K (STEP) sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam suspensi sel, dicampur dengan baik. Pada tahap selanjutnya, memanaskan campuran pada suhu 50°C selama satu jam sambil sesekali digoyang perlahan, kemudian campuran yang terdiri dari *phenol: kloroform: isoamil alkohol* (25:24:1) dimasukkan sebesar 6 mL, dilakukan pencampuran secara perlahan selama lima menit hingga terbentuk emulsi. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi campuran pada 15.000 rpm, selama lima menit, kemudian dilakukan pemindahan fase air (paling atas) ke tabung baru yang steril, dan ditambahkan Na-asetat 3M sebanyak satu kali volume total serta campur perlahan, kemudian ditambahkan dua kali volume etanol absolut dingin, dicampur perlahan dan diinkubasi pada suhu -20°C selama satu jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi campuran 15.000 rpm, selama lima menit. Hasil *pellet* yang diperoleh, dicuci dengan 0,6 mL etanol 70% kemudian dilakukan sentrifugasi kembali pada 15.000 rpm, selama 10 menit. Supernatant dibuang, selanjutnya *pellet* dilarutkan dengan 50 µL air suling.

**Amplifikasi DNA dengan PCR**

Kit *High Fidelity Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) dengan *primer forward* (10 pmol) 1,0 ml, PB36 5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' (Invitrogen), dan *primer reverse* (10 nmol) 1,0 mL PB38 5'-GMT ACC TTG TTA CGA CTT-3' (Invitrogen) yang memproduksi ± 1400 pb digunakan untuk PCR.

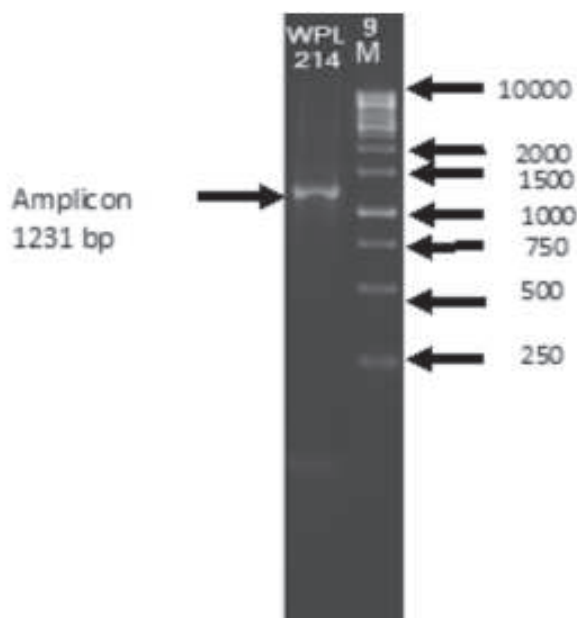
*Master mix* reaksi amplifikasi adalah 10 kali *high fidelity PCR buffer* 2,5 mL, 10 mM dNTP mix 2 mL, 50 mM MgSO<sub>4</sub> 1 mL, *primer forward* 1 mL (10 pmol/mL), *primer reverse* 1 mL (10 pmol/mL), *template* cDNA 2 mL, *platinum tag high fidelity* 0,2 mL, air suling sampai volume total 20 mL. Kondisi PCR yaitu *pre-denaturasi* pada 95°C selama lima menit, *denaturasi* pada 95°C selama satu menit, *annealing* pada 50°C selama satu menit, *extension* pada 72°C selama satu menit, 30 siklus dan *final extension* pada 72°C selama 10

menit. Selanjutnya hasil PCR dianalisis dengan gel elektroforesis pada gel agarose 2% yang mengandung *ethidium bromide*. 5 µL DNA ditambahkan 2 µL *loading dye* dimasukkan pada sumuran agarose, kemudian dijalankan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Selanjutnya dideteksi dengan UV-transluminator dan difoto dengan kamera polaroid.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Identifikasi Gen Pengkode**

Hasil elektroforesis materi genetik isolat selulolitik pada gel agarose tampak pada 1231 bp, seperti disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforegram *polymerase chain reaction* PCR isolat selulolitik Kode 9: marker DNA *ladder* (bp)

Elektroforegram PCR isolat selulolitik WPL 214 pada Gambar 1, menunjukkan bahwa sampel teramplifikasi pada fragmen antara 1000–1500 bp, yaitu sebesar 1231 bp. Senyawa DNA yang berhasil teramplifikasi kemudian dilakukan penentuan urutan nukleotidanya dengan menganalisis hasil PCR produk.

Hasil identifikasi isolat selulolitik menggunakan 16S-DNA memiliki susunan nukleotida seperti disajikan pada Gambar 2

Susunan nukleotida isolat yang diperoleh sesuai Gambar 2 tersebut, selanjutnya diidentifikasi dengan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yaitu

```

1      CGGNANTGGG GCGGACTACC ATGCAGTCGA CGGTCACACA AAGAGCTTGC TCTTGGGTGA
61     CTAGTGGCGG ACGGGTGAGT AATGTCTGGG AAAGTGCCTG ATGGAGGGGG ATAACTACTG
121    GAAACGGTAG CTAATACCGC ATAATGTCTC AAGACCAAAG GGGGGGACCT TCGGGCCTCT
181    TGCCGTCATA TGTGCCCAGA TGGGATTAGC TAGTATGTGG GGTAACGGCT CACCTAGGCT
241    ACGATCCCTA GCTGGTCTGA CAGGATGACC AGGCACACTG GAACTGAGAC ACGGTCCAAA
301    CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCACAATGGG CGCAAGCCTG ATGCAGCCAT
361    GCCCGCTGTA TGAAGAAGGC CTTCGGGTTG TAAAGTACTT TCAGCGGGGA GGAAGGTGTT
421    GAGGTTAATA ACCACAGCAA TTGACGTTAC CCGCAGAAGA AGCACC GGCT AACTCCGTGC
481    CAGCAGCCGC GGTAATACGG AGGGTGCAAG CGTTAATCGG AATTACTGGG CGTAAAGCGC
541    ACGCAGGCGG TCTGTCAAGT CTGATGTGAA ATCCCCGGGC TCAACCTGGG AACTGCATTC
601    AAAACTGGCA GGCTAGAGTC TTGTAGAGGG GGGTAGAATT CCAGGTGTAG CGGTGAAATG
661    CGTAGAGATC TGGAGGAATA CCGGTGACGA AGGCGGCCCC CTGGACAAAG ACTGACGCTC
721    AGGTGCGAAA ACGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC GCCATACACG
781    ATGTCAACTT GGAGGTTGTG CCCTTGAGGC GTGTCTTCCC GAGCTAACGT GTTAAGTCGA
841    CCGCCTGGGG AGTACGGGCG CAAGGTTAAA ACTCGGATGA ATTGACGGGG ACTCGCACAA
901    GCCCTGGAAC ATGTGGGTAA ATTCGATGCA ACTCGAAGAA CTTACCAA TCTTGACATC
961    CTGTGGACTT CCCTGAACTG GTTTGGTGCC TTCCGGTACC CTTAGGCAGG TGATGCATGG
1021   GTGTGCTCAA GTCTTGTGTG AAAATGTTGG GTAAATTTCC GAACAAAGCC AACCCTTATC
1081   CTTTTTTTCA ACTTTTCGGC CGGGAATTCA AAGGGAAGTT CCAGTGAATA ACCGGGAGAA
1141   AAGCGGGGAT AACGTCGAAT TAACTTGAGC CTTAAGGAGC CGGTTAAAAC NGGGCTAAAC
1201   AGGGGCCAAA AAAAGAAAAA AACAACCCCC CAGA

```

Gambar 2. Hasil urutan nukleotida isolat WPL 214 (*Molecule type : nucleic acid, Query Length: 1234*).

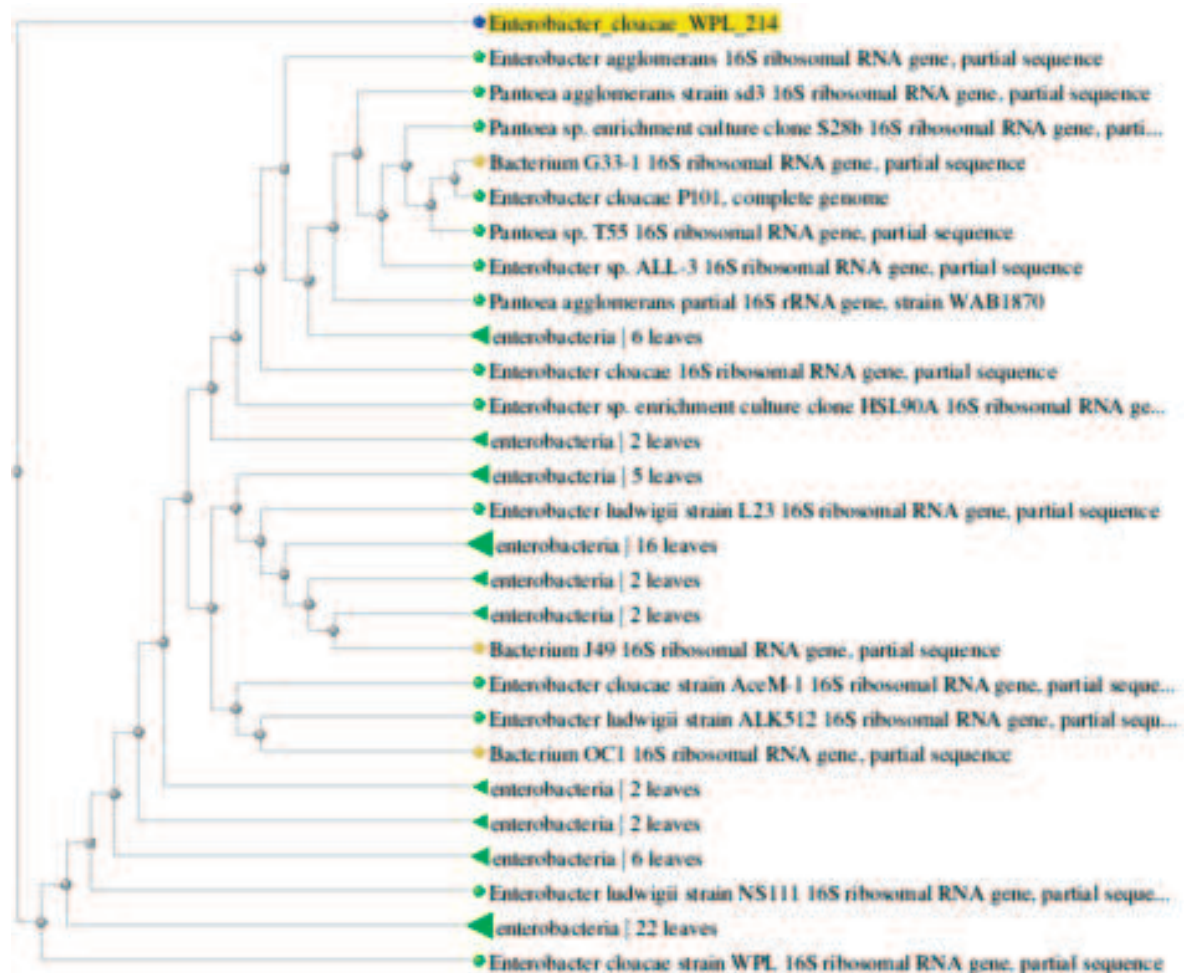
membandingkan dengan database yang ada pada *Genbank* dalam [www.ncbi.com](http://www.ncbi.com).

Sekuensing gen 16S DNA dilakukan untuk mencari hubungan filogenetik antar bakteri dan jarak genetik suatu spesies. Jarak genetik merupakan ukuran perbedaan genetik serta untuk mengidentifikasi bakteri dari berbagai lingkungan. Data sekuen untuk spesies *outgroup* diperoleh dari *Genbank* NCBI. Identifikasi dengan cara ini juga telah dilakukan untuk mengetahui taksonomi bakteri yang berasosiasi dengan tanaman, misalnya bakteri endofit dari famili *Enterobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, dan *Actinobacteridae* (Torres *et al.*, 2008). Hasil analisis pohon filogeni yang diperoleh, disajikan pada Gambar 3.

Pada isolat selulolitik kode WPL 214 telah dilakukan uji lanjut dengan 16S DNA dan penyusunan pohon filogeni terhadap 82 isolat dengan tingkat kemiripan 97-99%. Mayoritas

bakteri yang mirip dengan isolat WPL 214 adalah dari Genus *Enterobacter*. Berdasarkan tingkat kemiripan susunan nukleotida, kedekatan posisi dengan *E. cloacae* strain WPL 16S ribosomal, *Enterobacter ludwigii* strain NS 111 16S ribosomal serta sifat-sifat yang dimiliki sesuai dengan sistem identifikasi mikrob, maka isolat tersebut diidentifikasi sebagai *E. cloacae* WPL 214. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, isolat *E. cloacae* WPL 214 menunjukkan kemampuan untuk menghasilkan enzim selulolitik yang mempunyai aktivitas *endo-(1,4)- $\alpha$ -D-glucanase*, *exo-(1,4)- $\alpha$ -D-glucanase*, dan  *$\alpha$ -glucosidase* (Lokapirnasari *et al.*, 2015).

Bakteri *E. cloacae* merupakan bakteri Gram negatif, bentuk batang. Bakteri tersebut bersifat fakultatif anaerob (Holt *et al.*, 1994). *Enterobacter* juga telah berhasil diisolasi antara lain dari akar tanaman jagung (Ela *et al.*, 1982),



Gambar 3. Hasil analisis pohon filogeni isolat *E. cloacae* WPL 214 dengan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) ([www.ncbi.com](http://www.ncbi.com)).

dan dari bermacam-macam *cereal* dan rumput (Lindberg dan Granhall, 1984). Bakteri *E. cloacae* NCIB 11836, juga diisolasi dari jerami. *Enterobacter* spp. aktif dalam fiksasi nitrogen pada limbah kayu dan dalam rizosfer juga dapat berkontribusi untuk fiksasi nitrogen di jerami (Harper dan Lynch, 1986). Selanjutnya menurut Lynch dan Harper (1985), *E. cloacae* menghasilkan polisakarida ekstraseluler. Konsorsium mikrob antara *E. cloacae*, *Trichoderma*, dan *Clostridium butyricum* digunakan sebagai pupuk dan agen biokontrol.

Bakteri selulolitik yang dapat diisolasi dan diidentifikasi dalam penelitian ini, dapat berasal dari bakteri tanah yang masuk ke dalam rumen sapi bersama dengan pakan atau minuman. Bakteri selulolitik mampu hidup di dalam rumen sapi karena rumen memberikan kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri tersebut. Jumlah bakteri bervariasi tergantung

jenis pakan yang diberikan, spesies yang berbeda dan individu yang berbeda. Bakteri selulolitik dapat ditemukan di tanah, limbah peternakan, dan dalam jaringan tumbuhan yang membusuk. Di alam, bakteri selulolitik mampu mendegradasi selulosa dalam keadaan aerob maupun anaerob. Bakteri selulolitik juga mampu menunjukkan aktivitas selulolitik pada kondisi pH asam maupun basa dan pada kisaran suhu yang luas.

Berdasarkan laporan Sami *et al.* (2008), *E. cloacae* dapat menghasilkan aktivitas enzim *endo-1, 4- $\alpha$ -D-glucanase* yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi selulosa. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa *E. cloacae* ATCC 13047 memiliki kemampuan untuk memanfaatkan gula yang berbeda yaitu glukosa dan sukrosa sebaik memanfaatkan gliserol. Selanjutnya *E. cloacae* dilaporkan mampu memproduksi hidrogen dalam proses

fermentasi dari berbagai macam substrat termasuk glukosa, sukrosa, dan selobiosa (Kumar dan Das, 2000), sedangkan Komori *et al.* (1989) dan Komori *et al.* (1990) menunjukkan bahwa species *E. cloacae* tersebut dapat mereduksi kelarutan ion *chromate* menjadi *chromate*-III dan selenate menjadi selenium.

Bakteri selulolitik *E. cloacae* strain Razmin-C telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari saluran pencernaan rayap, dengan menggunakan *Bergey's manual dengan* teknik PCR dan *16S rRNA sequence homology*. Rayap merupakan serangga di daerah tropis dan berkembang pada kayu dan bersifat selulolitik, sehingga bakteri yang diisolasi berguna dalam degradasi bahan selulosa untuk meningkatkan pencernaan serta untuk produksi enzim. *Enterobacter* mampu berperan pada senyawa yang berbeda, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Bakteri tersebut telah dilaporkan berperan dalam degradasi lignoselulosa (Ramin *et al.*, 2008 ; Ramin *et al.*, 2009).

Koloni bakteri *E. cloacae* WPL 214 dapat tumbuh pada media selektif CMC mencapai diameter 1-2 mm dalam satu hari, bentuk koloni sirkuler, bentuk sel bulat serta bersifat Gram negatif. Bakteri tersebut diisolasi dari cairan rumen sapi dengan pH 6,0–6,5 dan suhu 35–40°C (Lokapirnasari *et al.* ., 2015). Sifat selulolitik tersebut ditunjukkan dari adanya sifat positif dalam uji kemampuan selulolitik, sehingga diduga isolat tersebut mampu mengekskresikan enzim selulase yang mampu memecah ikatan *1,4 β-glycoside* dalam media uji.

### SIMPULAN

Berdasarkan hasil elektroforesis PCR menunjukkan bahwa isolat selulolitik WPL 214 yang telah diisolasi dari limbah cairan rumen sapi peranakan ongle berhasil teramplifikasi pada 1231 bp. Hasil analisis dengan BLAST menunjukkan bahwa isolat teridentifikasi sebagai *E. cloacae* dengan tingkat homologi 97-99%.

### SARAN

Dari hasil penelitian ini telah berhasil diidentifikasi isolat selulolitik baru yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulase, sehingga disarankan untuk dilakukan

penelitian lebih lanjut dengan memanfaatkan isolat tersebut dalam proses fermentasi untuk mendegradasi bahan pakan ternak yang memiliki serat tinggi terutama yang berasal dari hasil samping pertanian atau limbah pertanian sehingga dapat diketahui kemampuannya untuk meningkatkan kandungan nutrisi dari bahan pakan tersebut.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga, Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Pimpinan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, serta Rektor Universitas Airlangga, yang telah mendanai penelitian Desentralisasi, Penelitian unggulan perguruan Tinggi (PUPT), sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Pelaksanaan Hibah Kegiatan Penelitian dan Program Pengabdian Kepada Masyarakat Baru dan Lanjutan Dana DIPA Ditlitabmas Tahun Anggaran 2015 Nomor: 519/UN3/2015. Penulis sampaikan pula rasa terima kasih kepada semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu atas segala bantuannya sampai terselesaikannya penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York. John Willey & Sons,
- Campbell R. 1985. *Plant Microbiology*. London. Edward Arnold Publisher.
- Ela SW, Anderson MA, Bril WJ. 1982. Screening and Selection of Maize to Enhance Associative Bacterial Nitrogen Fixation. *Plant Physiol* 70: 1564-1567.
- Glick BR, Pasternak JJ, Patten CL. 2010. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. (4 ed.). Washington, DC: ASM Press. Hlm. 117–118.

- Harper SHT, Lynch JM. 1986. Dinitrogen Fixation by Obligate and Facultative Anaerobic Bacteria in Association with Cellulolytic Fungi. *Current Microbiology* 14: 127-131.
- Hatami S, Alikhani HA, Besharati H, Salehrastin N, Afrousheh M, Jahromi ZY. 2008. Investigation on Aerobic Cellulolytic Bacteria in Some of North Forest and Farming Soils. *American-Eurasian J Agric & Environ Sci* 3 (5): 713-716.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth edition. Baltimore Maryland. United States of America. Williams and Wilkins. Hlm: 178-179.
- Komori K, Wang P, Toda K, Ohtake H. 1989. Factors affecting chromate reduction in *Enterobacter cloacae* strain HO1. *Appl Microbiol Biotechnol* 31: 567-570.
- Komori K, Rivas R, Toda K and Ohtake H. 1990. Biological removal of toxic chromium using an *Enterobacter cloacae* strain that reduces chromate under anaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng* 35: 951-954.
- Kumar N, Das D. 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem* 35: 589-593.
- Lindberg T, Granhall U. 1984. Isolation and Characterization of Dinitrogen-Fixing Bacteria from the Rhizosphere of Temperate Cereals and Forage Grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 48(4): 683-689.
- Lokapirnasari W P, Nazar DS, Nurhajati T, Supranianondo K, Yulianto AB. 2015. Production and assay of cellulolytic enzyme activity of *Enterobacter cloacae* WPL 214 isolated from bovine rumen fluid waste of Surabaya Abbatoir, Indonesia. *Veterinary World* 8(3): 367-371.
- Lynch JM, Harper SHT. 1985. The microbial upgrading of straw for Agriculture Use. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, *Biological Sciences* B 310: 221-226.
- Mathew GM, Sukumaran RK, Singhanian RR, Pandey A. 2008. Progress in Research on Fungal Cellulases for Lignocellulose Degradation. *Journal of Scientific and Industrial Research* 67: 898-908.
- Ramin M, Alimon AR, Panandam JM, Sijam K, Javanmard A, Abdullah N. 2008. Digestion of rice straw and oil palm fronds by microflora from rumen and termite bacteria, in vitro. *Pakistan Journal Biol Sci* 15;11(4): 583-588.
- Ramin M, Alimon AR, Abdullah N. 2009. Identification of cellulolytic bacteria isolated from the termite *Coptotermes curvignathus* (Holmgren). *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 17(1): 103-116.
- Rogers K. 2011. *New Thinking about Genetics*. New York: Britannica Educational Publishing, Hlm. 132.
- Sami A J, Awais M, Shakoori AR. 2008. Preliminary studies on the production of the endo-1, 4- $\alpha$ -D-glucanases activity produced by *Enterobacter cloacae*. *Afr J Biotechnol* 7: 1318-1322.
- Torres AR, Araujo WL, Cursino L, Hungria M, Plotegher F, Mostasso FL, Azevedo JL. 2008. Diversity of Endophytic Enterobacteria Associated With Different Host Plants. *The Journal of Microbiology* 46(4): 373-379.