

Characterization of Cellulose-Producing Bacterial Isolates from the Areca Nut (*Areca catechu* L.)

Siska Nuryanti^{1*}, Herwin¹, Nurhikma¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia

Article info Received: 16/04/2024	ABSTRACT
Available online: 17/04/2025	<i>Areca nut peel (Areca catechu L.), a byproduct of areca nut processing, holds potential as a raw material for bioplastics through cellulose utilization. This study aimed to identify bacterial species in areca nut peel capable of producing cellulose. Employing bacterial isolation and identification methods, including morphological and biochemical tests, four bacterial isolates were obtained. Two isolates, identified as gram-negative, were classified under the genus Acetobacter, and two gram-positive isolates were identified as belonging to the genus Lactobacillus. These findings demonstrate the potential use of cellulose from areca nut peel in bioplastic production.</i>
Corresponding Author: Siska Nuryanti Department of Microbiology Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, Indonesia email: Siska.nuryanti@umi.ac.id	
Keyword:	<i>Areca nut (Areca catechu L.), Bacterial isolation, Biochemical test, dan Cellulose-producing bacteria.</i>



Copyright ©2024 by Author

Journal Microbiology Science by Faculty of Pharmacy Universitas Muslim Indonesia is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

PENDAHULUAN

Pinang (*Areca catechu* L.) merupakan salah satu jenis palma yang belum banyak dikembangkan kegunaannya dibandingkan dengan tanaman lainnya. Pinang biasanya tumbuh di Pulau Sumatera, Kalimantan, Sulawesi dan Nusa Tenggara, khususnya pada bagian Aceh, pinang telah menjadi produk ekspor¹. Pinang memiliki beberapa manfaat diantaranya digunakan oleh masyarakat pedalaman dengan mengunyah pinang bersama dengan daun sirih dan kapur. Masyarakat menganggap dengan kebiasaan tersebut dapat menguatkan gigi, sehingga dapat dilakukan

secara turun temurun. Selain itu pinang bisa dimanfaatkan oleh masyarakat yaitu air rebusan pinang digunakan untuk mengatasi penyakit seperti menstruasi dengan darah berlebihan, hidung berdarah atau mimisan.

Kulit buah pinang merupakan limbah dari buah pinang yang bijinya sudah diambil. Untuk bentuk kulit buah pinang yaitu setengah lingkaran dengan sisi permukaan seperti serabut yang halus jika sudah kering. Semakin banyak yang produksi biji pinang maka semakin banyak juga limbah yang dihasilkan². Umumnya limbah kulit buah pinang dibuang disekitar perkarangan rumah bahkan membuang ke

sungai yang dapat berdampak negatif pada lingkungan.

Kandungan kimia pada kulit buah pinang yaitu flavanoid, alkaloid, tanin, dan triterpenoid³. Selain itu kulit buah pinang juga mengandung selulosa dengan persentase 53.20%⁴. Kulit buah pinang memiliki kandungan selulosa yang tinggi, sehingga selulosa dari kulit buah pinang dapat digunakan sebagai filler untuk penguatan dalam pembuatan bioplastik¹.

Jenis bakteri yang dapat digunakan untuk memperoleh berbagai jenis selulosa dengan kualitas dan kuantitas yang baik adalah *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, dan *Agrobacterium*. Namun *Acetobacter* cukup efisien digunakan karena dapat mengubah gula menjadi selulosa, dan dapat menggunakan glukosa sebagai sumber energi untuk membentuk senyawa metabolit⁵. Buah-buahan mengandung banyak gula seperti glukosa, fruktosa, dan sukrosa, yang diubah menjadi selulosa bakteri ketika digunakan sebagai substrat oleh strain bakteri penghasil selulosa.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, cawan petri (Normax), autoklaf (SIMIC Model YX-28 B), inkubator (Memmert), *Laminar Air Flow* (LAF), mikroskop dan oven (Memmert). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alkohol 96%, alpha naphthol (Merck),

agar (Merck), asam sitrat (KGaA), aquadest, kulit buah pinang, 3D-glukosa (KGaA), sukrosa, laktosa, disodium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) (KGaA), ekstrak yeast (KGaA), H_2O_2 3% (Merck), larutan iodium (Merck), kalium hidroksida (KOH) (KGaA), medium cair MR-VP broth (KGaA), medium *Nutrient Gelatin* (NG) (Merck), medium *Sulfite Indole Motility* (SIM) (Merck), medium *Simmon's Sitrat Agar* (SSA) (KGaA), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) (Merck), pepton (KGaA), reagen KOVACS (KGaA), kristal violet (KGaA), larutan mordan (Merck), alkohol asam, dan safranin (KGaA).

Isolasi bakteri

Kulit buah pinang yang sudah dibersihkan dipotong kecil. Kemudian digerus setelah itu sampel ditimbang sebanyak 1 gram dan diinokulasikan ke dalam 9 mL NaCl fisiologis steril. Kemudian dilakukan pengenceran hingga 10^{-6} . Setiap pengenceran sampel diambil 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri. Masukkan 9 mL medium standar *Hestrin-Schram* agar (D-glukosa 20 g/L, ekstrak yeast 5 g/L, pepton 5 g/L, Na_2HPO_4 2,7 g/L, asam sitrat 1,15 g/L, dan agar 15 g/L). Kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C ⁶.

Uji skrining bakteri penghasil selulosa

Isolat bakteri diambil 1 ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL medium *Hestrin-Schram* cair. Kemudian diinkubasi selama 7 hari dengan suhu 37°C . Setelah diinkubasi,

tabung dengan folikel putih diatas permukaan medium dipilih sebagai isolat bakteri penghasil selulosa⁶.

Identifikasi bakteri penghasil selulosa

Morfologi bakteri

Isolat bakteri penghasil selulosa yang terpilih diambil 1 ose kemudian dimurnikan dan diamati morfologinya diatas medium Hestrin-Schramm agar secara makroskopik. Pada morfologi makroskopik yang diamati berupa bentuk tepi, bentuk koloni, bentuk elevasi, dan warna. Untuk morfologi secara mikroskopik yaitu isolat bakteri yang terpilih dicat dengan metode pengecatan gram untuk menentukan jenis bakterinya⁶.

Pengecatan Gram

Pewarnaan gram dilakukan untuk memperjelas sel bakteri dengan menempelkan zat warna ke permukaan sel bakteri sehingga dapat ditentukan pengelompokan bakteri berdasarkan perbedaan komponen dinding sel⁷. Langkah awal pada teknik pewarnaan gram yaitu dengan membersihkan kaca objek menggunakan alkohol 95% dan dilewatkan beberapa kali diatas api bunsen sehingga bebas dari kotoran. Setelah itu ambil isolat bakteri menggunakan jarum ose secara aseptis kemudian dioles tipis pada objek glass. Dilakukan fiksasi spesimen dengan melewati diatas api bunsen sebanyak tiga kali. Teteskan kristal violet pada objek glass sampai menutupi seluruh sediaan. Diamkan selama 30-60 detik pada suhu ruangan kemudian di cuci secara perlahan

dengan aquadest selama 5 detik. Jika objek glass sudah terlihat berwarna biru maka dari itu ditetaskan larutan lugol, dibiarkan selama 1-2 menit pada suhu ruangan, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 detik. Setelah itu dilakukan dekolorisasi dengan ditetesi alkohol 95%, kemudian preparat dibilas dengan air mengalir untuk menghentikan aktivitas dekolorisasi. Teteskan safranin pada objek glass dan diamkan selama 1 menit, kemudian bilas dengan air mengalir. Setelah itu dikeringkan dengan di angin-anginkan. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop untuk melihat bentuk bakteri terhadap zat warna. Hasil pewarnaan berwarna ungu jika bakteri tersebut merupakan bakteri gram positif, jika berwarna merah bakteri tersebut merupakan bakteri gram negatif⁸.

Uji biokimia

Uji katalase

Uji katalase bertujuan untuk mengidentifikasi kelompok bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase⁷. Di atas objek glass ditetaskan larutan H₂O₂ 3% sebanyak 1 tetes kemudian diambil 1 ose koloni bakteri lalu diamati. Jika hasil positif menunjukkan adanya gelembung gas⁹.

Uji fermentasi karbohidrat

Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghidrolisis karbohidrat⁷. Tabung reaksi yang berisi medium fermentasi berupa glukosa, laktosa, dan sukrosa di masukkan 1 ose isolat bakteri kemudian diinkubasi

selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. Hasil yang diamati positif jika warna medium fermentasi berwarna merah berubah menjadi warna kuning dan jika terdapat gelembung dalam tabung durham maka menghasilkan gelembung gas (CO₂)¹⁰.

Hidrolisis pati

Hidrolisis pati menggunakan medium agar pati. Pati dapat dihidrolisis dengan mikroorganisme tertentu dengan hasil akhir yang dekstrin. Medium agar pati dicairkan di atas penangas air, suhunya di dinginkan sampai 45°C. Setelah itu medium dituang ke dalam cawan petri steril. Setelah medium membeku masing-masing isolat diinokulasikan kedalam medium agar pati dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 24 jam. Setelah dilihat adanya pertumbuhan, teteskan larutan iodium/lugol disekitar koloni bakteri pada medium tumbuh dan biarkan selama beberapa menit. Perubahan yang diamati yaitu terbentuk daerah bening disekitar koloni yang menandakan terjadinya hidrolisis pati oleh enzim amilase⁶.

Hidrolisis gelatin

Pada hidrolisis gelatin medium yang digunakan yaitu medium nutrient gelatin. Masing-masing isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium nutrient gelatin kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu disimpan pada suhu 4°C selama 30 menit. Gelatin yang telah dihidrolisis akan tetap cair meskipun disimpan pada suhu 4°C. Ada beberapa mikroorganisme

mampu menghidrolisis gelatin karena dapat menghasilkan eksoenzim proteolitik atau disebut juga dengan gelatinase⁶.

Uji Motilitas

Uji motilitas berguna untuk mengetahui gerak kuman⁷. Isolat bakteri ditusukkan ke dalam media *Sulfite Indole Motility* semi padat pada tabung reaksi menggunakan jarum ose steril. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengamatan positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar, maka bakteri tersebut bergerak (motil) dan apabila pertumbuhan bakteri tidak menyebar hanya berupa satu garis, maka bakteri tersebut tidak bergerak⁶.

Uji indol

Uji indol bertujuan untuk mengetahui apakah kuman mempunyai enzim triptophanase sehingga kuman tersebut mampu mengoksidasi asam amino tryptophan membentuk indol⁷. Isolat diinokulasikan ke dalam medium *Sulfite Indole Motility* (SIM) pada tabung reaksi secara aseptik. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° dengan menambahkan 0,2-0,3 ml reagen covac's. Hasil positif apabila kultur berwarna merah pada saat penambahan reagen¹¹.

Uji metil merah

Uji Metil Read bertujuan untuk menentukan glukosa yang dapat diubah menjadi asam seperti asam laktat, asam asetat, atau asam format⁶. Uji ini dilakukan dengan cara isolat murni diambil sebanyak satu ose kemudian

dimasukkan ke dalam medium Methyl Red Voges Proskauer (MRVP) lalu homogenkan. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C kemudian ditambahkan pereaksi Methyl Red (MR). Hasil positif jika terjadi perubahan warna dari kuning menjadi warna merah/kemerahan setelah ditetesi indikator Methyl Red. Warna merah yang terbentuk pada media akibat penurunan pH media oleh produk asam dalam jumlah yang besar dihasilkan dari fermentasi glukosa¹².

Uji Voges-Proskauer (VP)

Uji Voges Proskauer bertujuan untuk menentukan kemampuan bakteri menghasilkan produk akhir yang netral dari fermentasi glukosa melalui jalur butanediol. Uji ini dilakukan dengan cara mengambil isolat murni sebanyak satu ose dimasukkan ke dalam media Methyl Red Voges Proskauer (MRVP) kemudian homogenkan dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian ditambahkan pereaksi α -naftol 5% dan KOH 40%¹². Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi pink atau merah yang mengindikasikan adanya kehadiran aseton. Sedangkan pada hasil reaksi negatif pada media cair adalah tidak berubahnya warna medium atau menjadi warna tembaga⁶.

Uji Simmon's sitrat

Uji simmon's sitrat bertujuan untuk melihat kemampuan organisme menggunakan sitrat sebagai sumber satu – satunya dari karbon dan energi¹². pengujian ini menggunakan simmon's sitrat agar yang berbentuk agar

miring. Kemudian isolat diinokulasikan pada medium simmon's sitrat dengan cara menggoreskan pada permukaan media. Kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif menunjukkan warna biru sedangkan hasil negatif tidak terjadi perubahan warna¹³.

Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Isolat bakteri diinokulasikan pada media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dengan cara diinokulasikan tegak lurus pada bagian butt dan cara goresan sinambung pada bagian slant. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati perubahan warna media. Apabila pada bagian slant media berwarna merah dan butt berwarna kuning, maka bakteri mampu memfermentasi glukosa. Apabila pada bagian slant dan butt media berwarna kuning, maka bakteri mampu memfermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa¹⁴.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini diawali dengan proses isolasi bakteri penghasil selulosa dari kulit buah pinang. dengan pengenceran bertingkat dari 10^{-1} hingga 10^{-6} . Pengenceran bertujuan untuk memperkecil atau mengurangi kepadatan bakteri yang ditanam sehingga membantu untuk mempermudah perhitungan jumlah mikroorganisme¹⁵. Selanjutnya penelitian dilanjutkan ke tahapan isolasi bakteri penghasil selulosa. Tujuan dilakukan isolasi bakteri yaitu untuk mendapatkan kultur

murni bakteri yang diinginkan tanpa kontaminasi bakteri lainnya. Kultur murni bakteri didapatkan sampai terbentuknya koloni tunggal atau tumbuh secara terpisah¹⁶. Isolasi bakteri penghasil selulosa menggunakan medium *Hestrin-Schram* agar dengan metode tuang sehingga sampel tersebar merata. Alasan penggunaan medium *Hestrin-Schram* (HS) karena medium ini merupakan media standar yang sering digunakan untuk memproduksi membran selulosa bakteri¹⁷.

Selanjutnya, isolat bakteri yang diperoleh dilakukan pemurnian menggunakan medium *Hestrin-Schram* agar dengan metode *quadrant streak* untuk memperoleh isolat murni yang tunggal. Pemurnian bertujuan untuk memisahkan hasil inokulasi yang terdiri dari banyak koloni yang berlainan jenis sehingga didapat koloni murni. Koloni bakteri yang diambil adalah koloni yang dominan¹⁸. Tahap selanjutnya dilakukan skrining untuk menentukan isolat bakteri yang mampu memproduksi selulosa. Berdasarkan hasil skrining diperoleh empat isolat bakteri yaitu IBSKBP-01, IBSKBP-02, IBSKBP-03, dan

IBSKBP-04. dimana ciri-cirinya ditandai dengan terbentuknya folikel putih pada permukaan medium.

Hasil skrining isolat bakteri penghasil selulosa dari kulit buah pinang kemudian dilanjutkan dengan karakterisasi untuk mengidentifikasi bakteri penghasil selulosa. Karakterisasi dilakukan secara morfologi dan biokimia. Karakterisasi secara morfologi meliputi pengamatan makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik bertujuan untuk mengetahui bentuk koloni, bentuk tepi, bentuk elevasi, dan warna. Sedangkan pengamatan mikroskopik, yaitu dilakukan dengan pengecatan gram, hal ini dilakukan untuk menentukan bakteri tersebut termasuk golongan bakteri Gram positif atau Gram negatif. Diagnosa mikroskopik hanya merupakan dugaan. Untuk itu agar diperoleh diagnose yang konklusif, sifat-sifat biokimia merupakan suatu keharusan yang harus dilakukan. Suatu bakteri tidak dapat dideterminasi hanya berdasarkan sifat-sifat morfologinya saja, perlu dilakukan uji lanjutan seperti sifat biokimia.

Tabel 1. Karakterisasi morfologi isolat bakteri penghasil selulosa dari kulit buah pinang (*Arecha catechu* L)

Kode isolat	Makroskopik			Mikroskopik		
	Bentuk koloni	Bentuk tepi	Bentuk elevasi	Warna	Gram	Bentuk bakteri
IBSKBP-01	<i>Round</i>	<i>Smooth</i>	<i>Raised</i>	Kuning	Negatif	Basil (batang)
IBSKBP-02	<i>Round</i>	<i>Wavy</i>	<i>Raised</i>	Kuning	Positif	Basil (batang)
IBSKBP-03	<i>Round</i>	<i>Smooth</i>	<i>Convex</i>	Kuning	Negatif	Basil (batang)
IBSKBP-04	<i>Round with raised margin</i>	<i>Wavy</i>	<i>Raised</i>	Kuning	Positif	Basil (batang)

Tabel 2. Karakterisasi biokimia isolat bakteri penghasil selulosa dari kulit buah pinang (*Arecha catechu* L)

Uji Biokimia	IBSKBP-01	IBSKBP-02	IBSKBP-03	IBSKBP-04
Uji Katalase	+	+	+	+
Uji Motilitas	+	+	+	+
Uji Indol	-	-	-	-
Uji Metil Red	+	+	+	+
Uji Voges Proskauer (vp)	-	-	-	-
Uji Simmon's Sitrat	+	+	+	+
<i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSIA)	+	+	+	+
Hidrolisis Pati	-	-	-	+
Hidrolisis Gelatin	-	-	-	-
Uji Fermentasi Karbohidrat				
Glukosa	+	+	+	+
Laktosa	+	+	+	+
Sukrosa	+	+	+	+

Setelah dilakukan karakterisasi morfologi, selanjutnya dilakukan karakterisasi biokimia. Untuk karakterisasi biokimia diperlukan dalam identifikasi spesimen bakteri yang tidak dikenal secara morfologis biakan ataupun sel bakteri yang berbeda dapat tampak serupa, tanpa hasil pengamatan fisiologis yang berdasarkan pada reaksi enzimatik ataupun biokimia⁶. Karakterisasi secara biokimia meliputi uji katalase, uji fermentasi karbohidrat, hidrolisis pati, hidrolisis gelatin, uji motilitas, uji TSIA, uji IMViC (*Indole, methyl red, voges-Proskauer, Citrate*).

Pada uji katalase dilakukan untuk mengidentifikasi kelompok bakteri yang

dapat menghasilkan enzim katalase¹⁹. Dengan adanya gelembung gas pada objek glass setelah diinokulasikan bakteri dan ditetesi dengan H₂O₂ 3% menunjukkan reaksi positif pada isolat IBSKBP-01, IBSKBP-02, IBSKBP-03, dan IBSKBP-04. Ini terjadi karena bakteri memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂²⁰. Enzim ini melindungi bakteri dari H₂O₂ yang dapat terakumulasi selama proses metabolisme aerobik. Jika H₂O₂ terakumulasi, dapat menjadi toksik bagi mikroorganisme. Dengan adanya katalase dapat memecah H₂O₂ menjadi molekul air dan oksigen, sehingga sifat toksiknya hilang.

Pada uji fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu memfermentasi karbohidrat²¹. Pada pengujian ini digunakan 3 jenis gula yaitu glukosa, sukrosa, dan laktosa pada media cair. Hasil uji glukosa, sukrosa, dan laktosa menunjukkan reaksi positif pada isolat IBSKBP-01, IBSKBP-02, IBSKBP-03, dan IBSKBP-04 mampu memfermentasi glukosa, sukrosa, dan laktosa yang ditandai dengan perubahan warna pada medium dari warna merah berubah menjadi warna kuning dan adanya gelembung gas pada tabung durham. Karbohidrat merupakan sumber energi yang terdiri atas karbon, hidrogen dan oksigen. Bakteri aerob maupun anaerob mampu memfermentasi karbohidrat untuk menghasilkan energi. Untuk mendeteksi karbohidrat yang difermentasikan sebagai hasil perombakan dari enzim tertentu, dapat dilihat dari produk akhir yang dihasilkan yaitu asam dan gas. Asam akan merubah warna medium menjadi kuning yang semula berwarna merah karena fenol merah, menjadi kuning (asam) dan gas ditandai dengan adanya gelembung gas dalam tabung durham.

Pada pengujian hidrolisis pati dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri memanfaatkan pati yang memproduksi enzim amilase. Hidrolisis pati merupakan pemecahan molekul amilum menjadi komponen penyusunnya yang lebih sederhana seperti dekstrin, maltotriosa, maltosa, dan glukosa²². Setelah adanya

pertumbuhan bakteri diteteskan larutan iodium disekitar koloni, reaksi positif jika terbentuk daerah bening disekitar koloni bakteri, sedangkan hasil negatif jika disekitar koloni terbentuk warna biru kehitaman. Hasil uji hidrolisis pati hanya pada isolat IBSKBP-04 yang menunjukkan adanya reaksi positif yang menandakan terjadinya hidrolisis pati. Sedangkan pada isolat IBSKBP-01, IBSKBP-02, dan IBSKBP-03 negatif.

Pada pengujian hidrolisis gelatin Pada isolat IBSKBP-01, IBSKBP-02, IBSKBP-03, dan IBSKBP-04, menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak mencairnya medium gelatin setelah disimpan dalam lemari es. Medium gelatin digunakan untuk menguji bakteri yang dapat menghidrolisis gelatin. Untuk pencairan gelatin, bakteri harus membuat enzim yang disebut gelatinase. Sehingga meskipun disimpan dalam suhu dingin, medium akan tetap mencair.

Pada uji motilitas dilakukan untuk melihat pergerakan bakteri dengan cara satu ose bakteri ditusukkan secara tegak lurus di tengah medium *Sulfit Indol Motility* (SIM)¹⁹. Pada isolat IBSKBP-01, IBSKBP-02, IBSKBP-03, dan IBSKBP-04 menunjukkan adanya reaksi positif pada medium SIM tumbuh di daerah tusukan dan menyebar di daerah permukaan medium. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri bersifat motil (bergerak).

Pada uji indol, isolat IBSKBP-01, IBSKBP-02, IBSKBP-03, dan IBSKBP-04 menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya cincin merah di atas permukaan medium. Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri menghasilkan indol dengan menggunakan enzim tryptophan. Tryptophan merupakan asam amino esensial, yang teroksidasi oleh beberapa bakteri yang mengakibatkan pembentukan indol, asam piruvat, dan amonia²³. Kemudian diberi pereaksi kovacs yang mengandung amil alkohol sehingga dengan adanya indol akan menyebabkan amil alkohol berubah menjadi warna merah. Pada uji metil merah, isolat IBSKBP-01, IBSKBP-02, IBSKBP-03, dan IBSKBP-04 menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan medium berwarna merah setelah ditambahkan indikator metil merah. Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam memproduksi dan mempertahankan produk akhir asam stabil dari fermentasi glukosa. Metil merah merupakan indikator pH, yang tetap berwarna merah pada pH 4,4 atau kurang²³.

Pada uji Voges-Proskauer, isolat IBSKBP-01, IBSKBP-02, IBSKBP-03, dan IBSKBP-04 menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada medium. Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi aseton dalam kultur cair bakteri, sehingga jika medium ditambahkan dengan pereaksi alfa-naftol dan kalium hidroksida akan menghasilkan warna

merah, berarti bakteri tersebut menghasilkan aseton²³.

Pada uji sitrat dalam media *Simmons citrat* Agar dilakukan untuk mengidentifikasi kemampuan suatu bakteri untuk memanfaatkan sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Isolat IBSKBP-01, IBSKBP-02, IBSKBP-03, dan IBSKBP-04 menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna medium dari hijau menjadi biru. Hal ini disebabkan karena bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya maka akan menaikkan pH dan mengubah warna medium biakan dari hijau ke biru²³.

Pada uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri dalam memfermentasi karbohidrat²⁴. Isolat IBSKBP-01 dan IBSKBP-03 pada bagian *slant* berwarna merah *butt* berwarna kuning menunjukkan bahwa terjadinya fermentasi glukosa. Hal ini terjadi karena asam laktat yang dihasilkan dalam konsentrasi kecil. Isolat IBSKBP-02 dan IBSKBP-04 pada bagian *slant* dan *butt* media berwarna kuning menunjukkan bahwa terjadinya fermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa. Hal ini terjadi karena asam laktat yang dihasilkan konsentrasinya lebih tinggi¹⁴.

Isolat bakteri diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologis dan biokimia menurut *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Pada isolat

IBSKBP-01 dan IBSKBP-03 diidentifikasi genus *Acetobacter* dengan karakteristik positif pada uji katalase, fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, dan sukrosa), motil, metil merah, simmon's sitrat, dan positif pada uji TSIA ditandai dengan pada bagian slant berwarna merah dan butt kuning menunjukkan bahwa terjadinya fermentasi glukosa. Ciri-ciri genus *Acetobacter* sesuai dengan identifikasi pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* yaitu sel berbentuk ellipsoidal hingga batang, lurus atau sedikit melengkung, muncul sendiri-sendiri, berpasangan, atau berantai. Motil atau non motil; jika bergerak, flagella bersifat peritrik. Endospore tidak terbentuk. Gram negatif, aerobik, bentuk koloni pucat. Positif katalase, oksidase negatif, tidak adanya pencairan gelatine, produksi indol, mengoksidasi etanol menjadi asam asetat. Asetat dioksidasi menjadi CO dan H₂O, pati tidak dihidrolisis²⁵.

Pada isolat IBSKBP-02 dan IBSKBP-04 diidentifikasi genus *Lactobacillus*. Ciri-ciri genus *Lactobacillus* sesuai dengan identifikasi pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* yaitu bakteri gram positif, tidak berspora, tidak motil, fakultatif anaerob, kadang-kadang mikroaerofilik, sedikit tumbuh di udara tapi bagus dalam keadaan di bawah tekanan oksigen rendah, dan beberapa anaerob pada isolasi²⁵.

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi empat isolat bakteri pada kulit buah pinang (*Arecha catechu* L.) yang memiliki potensi sebagai penghasil selulosa. Isolat IBSKBP-01 dan IBSKBP-03 berhasil diidentifikasi sebagai genus *Acetobacter*, sementara IBSKBP-02 dan IBSKBP-04 sebagai genus *Lactobacillus*. Kedua genus ini dikenal dengan kemampuannya dalam mengkonversi substrat menjadi selulosa, yang menjanjikan untuk aplikasi dalam pembuatan bioplastik dan produk ramah lingkungan lainnya.

Temuan ini menonjolkan potensi pemanfaatan limbah kulit buah pinang sebagai sumber alternatif selulosa, menawarkan solusi berkelanjutan untuk mengurangi limbah dan mempromosikan produksi material biodegradable. Selain itu, ketersediaan sumber lokal untuk produksi selulosa bisa mengurangi biaya dan dampak lingkungan dari impor bahan baku serupa.

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengeksplorasi kondisi optimal fermentasi oleh bakteri-bakteri ini untuk memaksimalkan produksi selulosa. Juga penting untuk menguji aplikasi praktis selulosa yang dihasilkan dalam skala industri, termasuk evaluasi sifat mekanis dan biodegradabilitas produk akhir. Diharapkan, penelitian ini akan membuka jalan bagi inovasi lebih lanjut dalam pengembangan bioplastik dan penggunaan sumber daya terbarukan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tamiogy WR, Kardisa A, Hisbullah H, Aprilia S. Pemanfaatan Selulosa Dari Limbah Kulit Buah Pinang Sebagai Bahan Baku Pembuatan Bioplastik. *J Rekayasa Kim Lingkung*. 2019; 14(1):63–71
2. Yanti R, Fadhilah, Fitriana. Pemanfaatan Kulit Pinang Dalam Kreasi Rangkaian Bunga Kering. *J Ilm Mhs Pendidik Kesejaht Kel*. 2020; 5(1):68–82
3. Pribady HK, Ardana M, Rusli R. Potensi Ekstrak Kulit Buah Pinang Sebagai Antibakteri *Propionibacterium Acne* Penyebab Jerawat. *Proceeding Mulawarman Pharm Conf*. 2019; 10:100–103
4. Yusriah L, Sapuan SM, Zainudin ES, Mariatti M. Exploring the Potential of Betel Nut Husk Fiber as Reinforcement in Polymer Composites: Effect of Fiber Maturity. *Procedia Chem*. 2012; 4:87–94
5. Herwin, Fitriana, Nurung AH. Isolasi Bakteri Penghasil Selulosa Dari Buah-Buahan Dipasar Tradisional Makassar. *As-Syifaa J Farm Juli*. 2020; 12(1):47–50
6. Nuryanti S, Fitriana F, Pratiwi AR. Karakterisasi Isolat Bakteri Penghasil Selulosa Dari Buah Naga Merah (*Hylocereus Polyrhizus*). *J Ilm As-Syifaa*. 2021; 13(1):71–79
7. Liempapas AG, Lolo WA, Yamlean P. Isolasi Dan Uji Antibakteri Dari isolat Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Spons *Callyspongia Aerizusa* Serta Identifikasi Secara Biokimia . 8
8. Rahmatullah W, Novianti E, Sari ADL. Identifikasi Bakteri Udara Menggunakan Teknik Pewarnaan Gram. *J Ilmu Kesehat Bhakti Setya Med*. 2021; 6(2):84–92
9. Elvira E, Puspawati N, Wibawa DAA. Identifikasi *Staphylococcus Aureus* Dan Uji Sensitivitas Terhadap Antibiotik Dari Sampel Darah Pasien Sepsis Di RSUD Dr. Moewardi. *Biomedika*. 2017; 10(1):23–29
10. Lestari NW, Budiharjo A. Bakteri Heterotrof Aerobik Asal Saluran Pencernaan Ikan Sidat (*Anguilla Bicolor Bicolor*) Dan Potensinya Sebagai Probiotik. *Bioteknologi*. 2016; 13(1):9–17
11. Karang DAN, Pada G, Di I, Pesisir D. Identifikasi Bakteri Resisten Merkuri Dalam Urine,. 2014; 2:476–480
12. Manalu RT, Bahri S, Melisa, Sarah S. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Asal Feses Manusia Sebagai Antibakteri *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus*. *Sainstech Farma*. 2020; 13(1):55–59
13. AK MD et al. Salix Extract : Impact on the Quantity of *Escherichia Coli* in the Intestines of Broiler Chickens Exposed to the Heat Stress. *J Med Vet*. 2021; 15(1):27–33
14. Kursia S et al. Identifikasi Biokimia Dan Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Limbah Sayur Sawi (*Brassica Juncea L.*). *J Kesehat*. 2019; 16(1):27
15. Ramadhani I. Analisa Cemaran Bakteriologi Pada Minuman Air Kelapa Muda. *J Pustaka Media*. 2022; 1(1):5–8
16. Kefamenanu Welsiliana D, Lisnahan CV, Pardosi L. Isolasi Dan Uji Patogen Bakteri Asam Laktat (BAL) Dari Usus Ayam Kampung Yang Dipelihara Secara Intensif. *Maret 2023 J Pro-Life*. 2023; 10(1):654–664
17. Boby CA, Muhsinin S, Roni A. Review: Produksi, Karakterisasi Dan Aplikasi Selulosa Bakteri Di Bidang Farmasi. *JOPS (Journal Pharm Sci)*. 2021; 4(2):12–28
18. Huda C, Salni M. Penapisan Aktivitas Antibakteri Dari Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Karang Lunak *Sarcophyton Sp*. *Maspari J*. 2012; 04:69–76
19. Damayanti SS, Komala O, Effendi EM. Identification of Bacteria From Liquid Organic Fertilizer Filled in Cattle Rumen. *Ekologia*. 2020; 18(2):63–71
20. Kambey DF, Fatimawali ., Manampiring

- AE. Isolasi Bakteri Resisten Merkuri Dalam Urin Pasien Dengan Tumpatan Amalgam Di Puskesmas Bahu Manado. *J e-Biomedik.*; 4(2). DOI: 10.35790/ebm.4.2.2016.14724
21. Panjaitan FJ et al. Karakterisasi Mikroskopis Dan Uji Biokimia Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) Dari Rhizosfer Tanaman Jagung Fase Vegetatif. *J Ilmu Pertan dan Lingkungan*. 2020; 1(1):9–17
22. Monika A. Uji Hidrolisis Pati Dengan Asam Hydrolysis Test of Starch with Acid. *J Agro-based Ind*. 2021; 2(11):1–6
23. Afrianti Rahayu S, Muhammad Hidayat Gumilar M. Uji Cemarkan Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung Dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia Coli*. *Indones J Pharm Sci Technol*. 2017; 4(2):50
24. Aini F. Isolasi Dan Identifikasi Shigella Sp. Penyebab Diare Pada Balita. *Bio-site*. 2018; 04(1):1–40
25. J BD, Krieg NR, Staley JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Two*. USA: Springer. 2006