

Skrining dan Identifikasi Bakteri Pektinolitik Endosimbion dalam Sistem Pencernaan Serangga Penggerek Kopi (*Hypothenemus hampei* Ferr.)

Gatot Kusiyanto¹⁾, Purwatiningsih¹⁾, Kahar Muzakhar^{1)*}

¹⁾Program Studi Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember, Jl. Kalimantan No. 37, Jember, Jawa Timur, Indonesia

^{*)}Alamat korespondensi: kaharmzk@unej.ac.id

ABSTRAK

Serangga *Hypothenemus hampei* memiliki kemampuan untuk menggerek biji kopi, dan digunakannya sebagai sumber makanan, tempat hidup dan siklus hidup. Aktivitas hidup dari *H. hampei* menyebabkan rontoknya buah kopi dan penurunan kualitas serta kuantitas buah kopi hingga 40%. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri pektinolitik yang memiliki toleransi tinggi terhadap lingkungan khususnya kafein, tanin dan polifenol. Prosedur penelitian terdiri dari tahap pembuatan media skrining bakteri pektinase, isolasi bakteri endosimbion dan identifikasi spesies serta fisiologi bakteri. Berdasarkan hasil identifikasi dan skrining bakteri pada sistem pencernaan *H. hampei* didapatkan 15 isolat bakteri pektinolitik endosimbion. Hasil identifikasi tiga isolat terpilih diketahui bahwa isolat 2B termasuk golongan *Enterobacter* sp. atau *Actinobacillus* sp., isolat 31B masuk ke dalam *Micrococcus* sp. dan isolat 42B termasuk *Chromobacterium* sp. Penelitian ini berguna sebagai kajian untuk strategi penanganan hama serangga *H. hampei* dengan menghambat pertumbuhan bakteri pektinolitik.

Kata kunci: skrining, pektinolitik, *Hypothenemus hampei*, endosimbion

Screening and Identification of Pectinolytic Endosymbiotic Bacteria in the Digestive System of Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei* Ferr.)

Gatot Kusiyanto¹⁾, Purwatiningsih¹⁾, Kahar Muzakhar^{1)*}

¹⁾Study Program of Biology Postgraduate, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Jember, Kalimantan Street No. 37, Jember, East Java, Indonesia

^{*)}Email: kaharmzk@unej.ac.id

ABSTRACT

Hypothenemus hampei insects have the ability to drill coffee beans, and then it is used as food sources, living places and life cycles. The life activity of *H. hampei* causes the fruit fall and decreased the quality and quantity of coffee fruit up to 40%. This study aimed to obtain isolates of pectinolytic bacteria that tolerant to the environment, especially caffeine, tannins and polyphenols. The research procedure consisted of the making of screening media of pectinase bacteria, the isolation and identification of bacterial species as well as its physiology. Based on the results of identification and screening of bacteria in the digestive system *H. Hampei*, it was obtained 15 isolates of the bacteria pectinolytic endosymbiont. Three isolate obtained were identified which were 2B isolate included the *Enterobacter* sp. or *Actinobacillus* sp., 31B isolate was similar to *Micrococcus* sp., and 42B isolate was close to *Chromobacterium* sp. This research was useful as a study for insect pest management strategy of *H. hampei* by inhibiting the growth of pectinolytic bacteria.

Keywords: screening, pectinolytic, *Hypothenemus hampei*, endosymbiont

PENDAHULUAN

Kopi (*Coffea* sp.) merupakan komoditas perkebunan utama yang ada di Indonesia. Produksi kopi di Indonesia pada tahun 2012 mencapai 748 ribu ton yang terdiri dari kopi

robusta (*C. Canephora*) sebesar 601.000 ton (80,4%) dan kopi arabika (*C. Arabica*) sebesar 147.000 ton (19,6%) atau sekitar 6,6% produksi kopi dunia, sehingga Indonesia berada di posisi ketiga sebagai produsen kopi terbesar setelah Brazil dan Vietnam [1]. Pada

saat ini, produksi kopi di Indonesia terus mengalami penurunan dari tahun ke tahun selanjutnya yaitu 740.000 ton (2013), 712.000 ton (2014), 550.000 ton (2015), 664.000 ton (2016), 669.000 ton (2017) hingga pada tahun 2018 hanya mencapai 674.000 ton dan pada akhirnya Indonesia berada di posisi keempat produsen kopi setelah Kolombia [2]. Penyebab utama penurunan produksi kopi di Indonesia adalah adanya hama pada kopi yaitu serangga penggerek kopi *Hyphotenemus hampei* Ferr.

Serangga *H. hampei* memiliki kemampuan untuk menggerek biji kopi, dan digunakannya sebagai sumber makanan, tempat hidup dan siklus hidup. Aktivitas hidup dimulai dari larva *H. hampei* yang berada di dalam biji kopi, memakan biji kopi sampai dewasa, sehingga seluruh siklus hidupnya ada di dalam biji kopi. Aktivitas hidup dari *H. hampei* menyebabkan rontoknya buah kopi dan penurunan kualitas serta kuantitas buah kopi hingga 40% [3]. Siklus hidup dari *H. hampei* yang berada di dalam biji kopi menyebabkan sulitnya penanganan hama tersebut. Serangga ini mampu bertahan hidup walaupun pada buah kopi mengandung kadar kafein, polifenol dan tannin tinggi yang bersifat toksik terhadap serangga tersebut [4].

Siklus hidup *H. hampei* yang dominan berada pada substrat ekstrem yaitu biji kopi menunjukkan bahwa serangga ini memiliki kemampuan adaptasi dan toleransi yang tinggi terhadap kondisi lingkungan pada biji kopi. Kemampuan untuk hidup pada biji kopi tersebut disebabkan karena adanya bakteri endosimbion pada saluran pencernaan *H. hampei*. Bakteri endosimbion pada serangga *H. hampei* berfungsi untuk membantu menyediakan nutrisi, meningkatkan toleransi terhadap lingkungan dan resistensi terhadap parasit [5]. Pada alat pencernaan *H. hampei* terdapat bakteri *Pseudomonas flavus* yang membantu mendegradasi kafein pada biji kopi [6]. Namun selain bakteri endosimbion yang membantu untuk mendegradasi kafein, serangga *H. hampei* juga memerlukan sumber karbon sederhana untuk metabolismenya. Sumber karbon sederhana didapat dengan memecah substrat polisakarida kompleks menjadi monomer sederhana yang bisa diserap oleh serangga. Pada biji kopi, terdapat kandungan C yang cukup tinggi yang berasal dari polisakarida seperti selulosa dan pektin. Kandungan selulosa pada biji kopi robusta sebesar 32-42%, pada biji kopi arabika sebesar

41-43% sedangkan pektin pada kopi sebesar 2% [7].

Bakteri pektinolitik endosimbion pada *H. hampei* menghasilkan enzim pektinase yang mendegradasi pektin di dalam biji kopi. Dengan ditemukannya fenomena bakteri endosimbion di dalam alat pencernaan serangga hama, maka dapat digunakan untuk pengendalian populasi dari hama yaitu dengan pemutusan mekanisme rantai simbiosis yang ada di dalam alat pencernaan.

Sebagai tahap awal yang harus diteliti dan diketahui adalah melakukan identifikasi bakteri pektinolitik yang bersimbiosis di dalam alat pencernaan *H. hampei*. Tahap kedua adalah karakterisasi enzim pektinase yang dihasilkan oleh bakteri endosimbion dan analisis mekanisme aktivasi. Dengan diketahui mekanisme aktivasi dan penghambatan (*blocking*) aktivasi pektinase dalam alat pencernaan *H. hampei* akan menyebabkan metabolisme pencernaannya terganggu.

METODE PENELITIAN

Pembuatan media skrining bakteri peptinase. Langkah awal, Pembuatan pektin agar (pektin 0,5%, Na₂HPO₄ 6 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, MgSO₄ 0,2 g/L, NH₄Cl 1 mg/L, pepton 2 g/L, dan agar 17 g/L) dengan cara mencampurkan bahan-bahan pembuatan media agar pektin. Selanjutnya dilakukan sterilisasi. Setelahnya media pektin agar cair dituang ke dalam cawan petri, selanjutnya didiamkan sampai padat.

Isolasi bakteri endosimbion. Serangga dewasa *H. hampei* pada kopi diseleksi dari serangga lain dan diambil 10 ekor. Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi alkohol 40% dengan garam fisiologis 0,9% (pengenceran 10^{-1}) dihomogenasi menggunakan vorteks kemudian dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-10} dengan mengambil 1 ml dari pengenceran sebelumnya. Kemudian suspensi diencerkan dengan 9 mL NaCl 0,9% steril. Sebanyak 1 mL suspensi serangga dewasa diambil dari pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-10} , lalu ditumbuhkan pada media pektin agar. Kultur diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C . Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dimurnikan dengan menginokulasikannya kembali pada media *nutrient agar* dalam cawan petri sampai didapatkan seluruh biakan tersebut benar-benar murni.

Identifikasi spesies dan fisiologi bakteri. Identifikasi secara makroskopis diawali dengan dilakukan pengujian zona bening dengan menggunakan larutan *congo red* (0,1% w/v) sebagai larutan penguji dan NaCl 1% sebagai larutan pencuci. Sebanyak 1 ml larutan *congo red* (0,1% w/v) sampai merata kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Kemudian sampel dicuci dengan menggunakan larutan NaCl 2 M sebanyak dua kali. Kemudian diamati dan diukur zona bening yang terbentuk. Indeks aktivitas peptinase dapat diukur dengan menggunakan persamaan sebagai berikut [8]:

$$\text{Indeks Aktivitas Enzim} = \frac{\text{diameter zona bening (mm)}}{\text{diameter koloni (mm)}}$$

Pengamatan bakteri secara mikroskopik yang meliputi pewarnaan Gram, uji motilitas, pewarnaan endospora dan bentuk sel. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop (Olympus CX 21) dengan perbesaran 1000 kali. Uji biokimia dilakukan dengan menginokulasikan bakteri ke dalam larutan yang masing-masing mengandung glukosa, sukrosa, laktosa, arabinosa, maltosa, dan mannitol. Setiap larutan mengandung BTB (*Brom Timol Blue*) sebagai indikator pH dan ditambahkan pepton sebagai sumber nitrogen, vitamin, dan mineral. Uji katalase dilakukan dengan menambahkan larutan 3% H_2O_2 pada koloni bakteri. Kemudian pembentukan

gelembung udara (positif) diamati yang terjadi pada koloni. Uji sitrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi sitrat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan skrining bakteri pektinolitik. Pada tahap awal kegiatan isolasi dan skrining bakteri yang terdapat pada alat pencernaan serangga *H. hampei* yang ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) didapatkan 48 isolat. Kemudian isolat tersebut ditumbuhkan pada media selektif pektin dan hanya ada 15 isolat mampu tumbuh yaitu 1A, 2B, 3A, 5A, 10B, 12A, 17A, 18A, 31B, 37A, 40A, 42B, 45B, 47A, dan 48B. Isolat yang mampu membentuk zona bening ada 12 yaitu 2B, 5A, 10B, 12A, 17A, 18A, 31B, 37A, 40A, 42B, 47A, dan 48B.

Aktivitas pektinolitik dari isolat bakteri uji dilihat berdasarkan kemampuan membentuk zona bening di sekeliling koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media pektin yang telah ditetesi larutan iodin 0,03%. Fungsi dari larutan iodin 0,03% yaitu mempercepat deteksi dan penyebaran bakteri dalam kultur bakteri yang ditandai dengan zona bening yang terbentuk. Zona bening menunjukkan bahwa isolat bakteri menggunakan pektin pada media untuk pertumbuhan dan menyebabkan pektin di sekeliling koloni habis terpakai sehingga terbentuk zona bening. Zona bening pada media pektin terbentuk disekitar pertumbuhan koloni maupun hanya terbentuk pada area koloni itu sendiri [9]. Semakin besar indeks pektinase, maka semakin besar pula aktivitas pektinolitik yang dihasilkan [10].

Berdasarkan hasil pengukuran zona bening diperoleh isolat 2B memiliki nilai indeks aktivitas pektinolitik yaitu 9,91, isolat 31B dengan nilai indeks aktivitas pektinolitik sebesar 5,56 dan isolat 42B memiliki nilai indeks aktivitas pektinolitik yaitu 5,47 (Tabel 1). Zona bening pada media pektin pada isolat 2B memiliki indeks aktivitas pektinolitik yang paling tinggi dibandingkan dengan dua isolat lainnya yaitu isolat 31B dan isolat 42B, namun dalam hal ukuran koloni isolat 2B memiliki diameter koloni paling kecil jika dibandingkan kedua isolat tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa isolat 2B memiliki pertumbuhan koloni yang lebih rendah dibandingkan dengan kedua isolat lainnya pada media pektin. Isolat yang memiliki zona bening yang luas tanpa diikuti

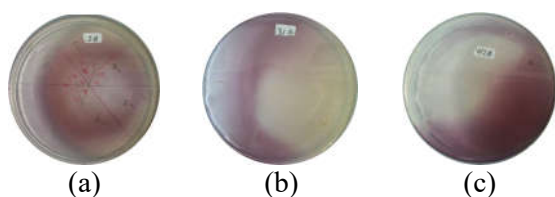
oleh tingginya indeks zona bening cenderung akan memproduksi enzim dengan aktivitas yang lebih tinggi [11].

Tabel 1. Indeks aktivitas bakteri pektinolitik isolat uji

No	Kode isolat	Diameter		Aktivitas pektinolitik
		zona bening (mm)	Diameter koloni (mm)	
1.	1A	1,75	1,75	1
2.	2B*	33	3,33	9,90
3.	3A	4,75	4,75	1
4.	5A	13,75	16	0,86
5.	10B	9	6,25	1,44
6.	12A	1,75	1,75	1
7.	17A	2,5	2	1,25
8.	18A	13,75	6,67	2,06
9.	31B*	50,05	9	5,56
10.	37A	2	1,13	1,78
11.	40A	3	2	1,5
12.	42B*	40,13	7,33	5,47
13.	45B	7	7	1
14.	47A	10,1	6,33	1,59
15.	48B	9,43	11,67	0,80

*isolat terpilih

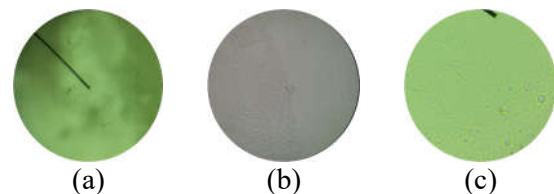
Dari hasil perbandingan indeks aktivitas pektinolitik menunjukkan bahwa ada perbedaan indeks pektinase yang dihasilkan dalam menghidrolisis substrat pektin oleh masing-masing isolat. Setelah melalui proses tahapan uji zona bening pada akhirnya didapat 12 isolat bakteri yang mampu mendegradasi pektin. Di antara isolat tersebut yang memiliki zona bening terbesar adalah isolat nomor 2B, 31B, 42B (Gambar 1) selanjutnya diidentifikasi secara makroskopik, mikroskopik dan uji biokimia.



Gambar 1. Hasil uji aktivitas pektinolitik media pektin dengan pemberian larutan Iodine 0,03% (a) Isolat 2B; (b) Isolat 31B; (c) Isolat 42

Pengamatan secara makroskopik.

Pengamatan makroskopik bakteri meliputi pengamatan morfologi dan pengujian zona bening [12, 13]. Karakteristik koloni isolat 2B yaitu bentuk koloni bulat, elevasi koloni datar, tepi koloni penuh, dan berwarna putih susu. Isolat 31B dan 42B bentuk koloni memanjang, elevasi koloni datar, tepi koloni penuh dan warna koloni putih (Gambar 2).



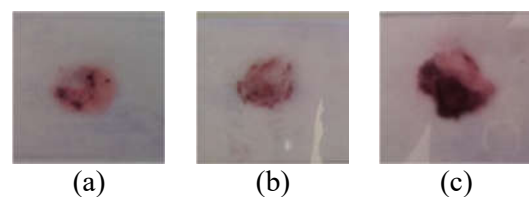
Gambar 2. Hasil pengamatan makroskopik (a) isolat 2B; (b) isolat 31B; (c) isolat 42B

Tabel 2. Pengamatan makroskopis bakteri pektinolitik

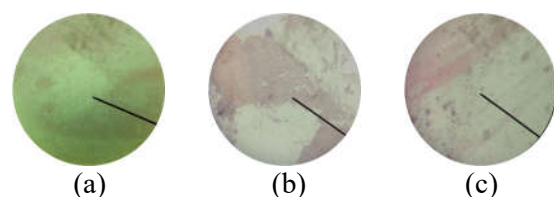
No	Kode Isolat	Morfologi Koloni			
		Bentuk	Elevasi	Tepi	Warna
1	2B	Bulat	Datar	Penuh	Putih susu
2	31B	Panjang	Datar	Penuh	Putih susu
3	42B	Panjang	Datar	Penuh	Putih susu

Pengamatan secara mikroskopik.

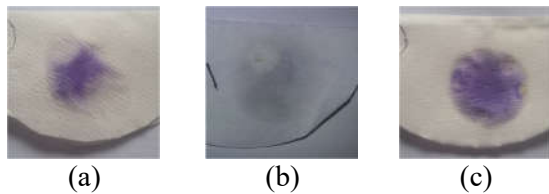
Isolat 2B dan 42B adalah Gram negatif dan selnya berbentuk batang. Sedangkan isolat 31B adalah Gram positif dan selnya berbentuk bulat (Gambar 3 dan 4).



Gambar 3. Uji Gram (a) Isolat 2B; (b) Isolat 31B; (c) Isolat 42B



Gambar 4. Hasil pewarnaan Gram (a) Isolat 2B; (b) Isolat 31B; (c) Isolat 42B



Gambar 5. Uji oksidase (a) Isolat 2B; (b) Isolat 31B; (c) Isolat 42B

Pada pewarnaan endospora semua isolat menunjukkan hasil NT (*Not Testable*). Spora bakteri adalah mekanisme bakteri yang sengaja diatur dalam upaya untuk mengamankan diri terhadap efek buruk dari lingkungan eksternal [14]. Pewarna *Malachite Green* dan Safranin dapat bekerja dengan baik pada bakteri karena alkalin (komponen *chromophoric* bermuatan positif), sedangkan sitoplasma bakteri bersifat basofilik, hal ini menyebabkan bakteri dapat menyerap zat warna dengan baik [15]. Uji motilitas digunakan untuk mengetahui pergerakan bakteri. Bakteri bergerak bebas memiliki flagel sebagai alat geraknya [16]. Hasil isolat uji 2B dan 42B memiliki hasil yang positif atau motil. Sedangkan isolat uji 31B memiliki hasil yang NT (*Not Testable*).

Uji biokimia. Uji biokimia meliputi uji katalase, uji karbohidrat, dan uji sitrat. Uji biokimia bakteri adalah suatu perlakuan untuk memudahkan identifikasi bakteri berdasarkan sifat-sifat fisiologinya [13].

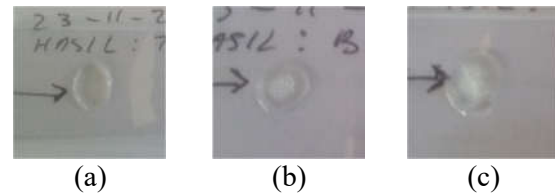
Tabel 3. Hasil uji biokimia pada isolat uji

No	Kode Isolat	Uji Katalase	Uji Karbohidrat	Uji Sitrat
1.	2B	-	+	+
2.	31B	+	NT	+
3.	42B	+	+	+

Keterangan: NT = *Not Testable* (penelitian yang tidak mungkin untuk dilakukan uji lanjutan)

Uji katalase digunakan untuk mendeteksi bakteri yang mampu menghasilkan enzim katalase. Pembentukan gelembung saat penetesan larutan H₂O₂ menunjukkan hasil tes positif dengan adanya pelepasan oksigen [17]. Isolat 2B adalah negatif, sedangkan uji pada

isolat 31B dan 42B memiliki hasil positif terhadap uji katalase (Gambar 5).



Gambar 5. Uji katalase (a) Isolat 2B; (b) Isolat 31B; (c) Isolat 42B

Uji karbohidrat dengan hasil positif diperoleh apabila terdapat perubahan warna dan terbentuknya gas yang menunjukkan bahwa terjadinya fermentasi glukosa oleh bakteri. Fermentasi dapat menghasilkan berbagai senyawa asam seperti asam laktat dan propionat, ester, keton dan gas [18]. Dari hasil uji karbohidrat isolat 2B dan 42B hanya memiliki hasil positif pada uji glukosa, dan uji motilitas, laktosa, manitol dan sukrosa yang dikonfirmasi oleh perubahan warna dari merah ke warna kuning serta terbentuknya gelembung gas (Tabel 3).

Uji simon sitrat digunakan untuk melihat kemampuan bakteri enterik dapat memfermentasi sitrat menjadi sumber karbon. Mikroorganisme yang mampu menggunakan sitrat, akan menyebabkan kekurangan asam sehingga terjadi peningkatan pH dan terjadi perubahan warna dari hijau ke biru.

Identifikasi bakteri. Hasil pengamatan secara makroskopik, mikroskopik dan uji biokimia menunjukkan bahwa isolat 2B diketahui memiliki karakter yang sama dengan bakteri *Enterobacteriaceae* sp. atau *Actinobacillus* sp. Isolat 31B memiliki kesamaan dengan bakteri *Micrococcus* sp., sedangkan isolat 42B dengan bakteri *Chromobacterium* sp. (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil identifikasi bakteri

No	Kode Isolat	Jenis bakteri
1.	2B	<i>Enterobacter</i> sp. <i>Actinobacillus</i> sp.
2.	31B	<i>Micrococcus</i> sp.
3.	42B	<i>Chromobacterium</i> sp.

Enterobacter sp. merupakan bakteri Gram negatif, bersifat fakultatif anaerobik, berbentuk batang dan bisa bergerak (motil).

Bakteri berbentuk batang, dan panjangnya 1-5 μm . Suhu pertumbuhan optimum 30-40°C. Apabila *Enterobacter* sp. dikembangkan pada media buatan, maka menunjukkan aktivitas mengubah glukosa, selanjutnya membentuk asam dan gas. Bakteri ini dapat membentuk kapsul, sitrat, dan asetat yang dapat digunakan sebagai sumber karbon satu-satunya [13].

Actinobacillus sp. merupakan bakteri berukuran sekitar 0,7 x 1,0 μm . Bakteri ini dapat tumbuh soliter atau berkoloni, tidak bergerak, bersifat fakultatif anaerob dan kapnofilik [19]. *Actinobacillus* sp. memiliki fimbriae, membran sel yang mengandung protein dan mampu menghasilkan leukotoksin serta komponen seluler lain.

Micrococcus sp. merupakan bakteri dengan bentuk selnya bulat. Diameter koloni 1-2 μm . Koloni muncul di atas permukaan media NA. Koloni berwarna kuning. Permukaan koloni mengkilat. Termasuk ke dalam bakteri Gram positif. Suhu pertumbuhan optimum 25-37°C. Kebutuhan oksigen termasuk aerob dan anaerob. Termasuk pada bakteri yang tidak mampu bergerak. katalase, oksidase, dan produksi H₂S bersifat positif. Mampu tumbuh dengan baik pada media salinitas 7,5% NaCl.

Chromobacterium sp. merupakan bakteri fakultatif anaerob, Gram negatif dan berbentuk batang serta berpigmen ungu. Bakteri ini umumnya ditemukan di daerah beriklim tropis dan subtropis, pada air dan tanah, juga pada manusia dan hewan (bila terjadi infeksi) [20].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil identifikasi dan skrining bakteri pada sistem pencernaan *H. hampei* maka didapatkan 15 isolat bakteri pektinolitik endosimbion. Hasil identifikasi tiga isolat terpilih didapatkan bahwa isolat 2B termasuk golongan *Enterobacter* sp. atau *Actinobacillus* sp., isolat 31B termasuk ke dalam *Micrococcus* sp. dan isolat 42B termasuk *Chromobacterium* sp. Identifikasi spesies bakteri lebih lanjut menggunakan pendekatan molekuler perlu dilakukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Program Studi Magister Biologi Fakultas

MIPA Universitas Jember dan pihak yang telah membantu proses penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kementerian Perindustrian Republik Indonesia (2013) Produksi kopi nusantara ketiga terbesar di dunia. <http://www.kemenperin.go.id/artikel/6611/Produksi-Kopi-Nusantara-Ketiga-Terbesar-Di-Dunia>, Diakses pada 25 Agustus 2018.
- [2] Indonesia Investments (2017) Kopi. <https://www.indonesia-investments.com/id/bisnis/komoditas/kopi/item186>, Diakses pada 25 Agustus 2018.
- [3] Vega F, Jaramillo J, Castillo A, Infante F (2009) The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): A short review, with recent findings and future research directions. *Terrestrial Arthropod Reviews* 2 (2): 129:147.
- [4] Navarro JAC, Vega FE, Karaoz U, Hao Z, Jenkins S, Lim HC (2015) Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. *Nature Communication* 1 (2):1-8.
- [5] Raina HS, Singh A, Popli S, Pandey N, Rajagopal R (2015) Infection of bacterial endosymbionts in insects: A comparative study of two techniques viz PCR and FISH for detection and localization of symbionts in Whitefly. *Bemisia tabaci*. *PLoS ONE* 10 (8): e0136159. doi:10.1371/journal.pone.0136159.
- [6] Marino YAC, Ospina OE, Rodrigues JV (2018) High diversity and variability in the bacterial microbiota of the coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae), with emphasis on Wolbachia. *Journal of Applied Microbiology* 125 (2): 528-543.
- [7] Berlitz HD, Grosch W, Schieberle P (2009) *Food Chemistry*. Springer Berlin, Heidelberg.
- [8] Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A (2008) A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology* 57: 503-507.

- [9] Rautela GS, Cowling, EB (1966) Simple cultural test for relative cellulolytic activity of fungi. *Applied Microbiology* 14 (6): 892-898.
- [10] Apun K, Jong BC, Salleh MA (2000) Screening and isolation of a cellulolytic and amylolytic *Bacillus* from sago pith waste. *The Journal of General and Applied Microbiology* 46: 263–267.
- [11] Purwadaria T, Marbun PA, Sinurat AP, Ketaren PP (2003) The comparison of cellulase activities from bacteria and molds isolated from termites. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 8(4): 213-219.
- [12] Jutono J, Soedarsono S, Hartadi S, Kabirun S, Suhadi D, Soesanto (1980) Pedoman praktikum mikrobiologi umum untuk perguruan tinggi. UGM Press, Yogyakarta.
- [13] Pelczar M, Chan EC (1986) Dasar-dasar Mikrobiologi. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- [14] Waluyo L (2004) Mikrobiologi Umum. UMM Press, Malang.
- [15] Volk W (1988) Mikrobiologi Dasar. Erlangga, Jakarta.
- [16] Swift FR (1963) A hanging-drop technique for general laboratory use. *Microchemical Journal* 7 (1): 120–136.
- [17] Serra B, Zhang J, Morales MD, de Prada GV, Reviejo J, Pingarrón JM (2008) A rapid method for detection of catalase-positive and catalase-negative bacteria based on monitoring of hydrogen peroxide evolution at a composite peroxidase biosensor. *Talanta* 75 (4): 1134–1139.
- [18] Alatawi A, Susilowati A, Hailu H (2015) Biochemical and molecular characterization of food contaminating bacteria isolates from food stall vegetables. *British Microbiology Research Journal* 5 (5): 405–411.
- [19] Socransky SS, Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ (2004) Subgingivalis chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *Journal of Clinical Periodontology* 31: 996-1002.
- [20] Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2008) *Biology of Microorganisms* 12th Edition. Pearson, San Fransisco.

