

**IDENTIFIKASI FENOTIP BAKTERI AMILOLITIK DAN SELULOLITIK
DARI ISOLAT BEKATUL DENGAN *METODE PROFILE MATCHING*
BERDASARKAN *BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE
BACTERIOLOGY***

SKRIPSI

**Oleh:
EVA CHASANAH
NIM. 12630062**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**IDENTIFIKASI FENOTIP BAKTERI AMILOLITIK DAN SELULOLITIK
DARI ISOLAT BEKATUL DENGAN METODE *PROFILE MATCHING*
BERDASARKAN *BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE
BACTERIOLOGY***

SKRIPSI

**Oleh:
EVA CHASANAH
NIM. 12630062**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**IDENTIFIKASI FENOTIP BAKTERI AMILOLITIK DAN SELULOLITIK
DARI ISOLAT BEKATUL DENGAN METODE *PROFILE MATCHING*
BERDASARKAN *BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE
BACTERIOLOGY***

SKRIPSI


Oleh:
EVA CHASANAH
NIM. 12630062

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 5 Juli 2018

Pembimbing I



Akyunul Jannah, S.Si., M.P
NIP. 19750410 200501 2 009

Pembimbing II


Ach. Nasichuddin, M.A
NIP. 19730705 200003 1 002



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia


Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**IDENTIFIKASI FENOTIP BAKTERI AMILOLITIK DAN SELULOLITIK
DARI ISOLAT BEKATUL DENGAN METODE *PROFILE MATCHING*
BERDASARKAN *BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE
BACTERIOLOGY***

SKRIPSI

Oleh:
EVA CHASANAH
NIM. 12630062

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 5 Juli 2018

Penguji Utama	: Rachmawati Ningsih, M.Si NIP. 19810811 200801 2 010	(.....)
Ketua Penguji	: Dewi Yuliani, M.Si NIDT. 19880711 20160801 2 067	(.....)
Sekretaris Penguji	: Akyunul Jannah, S.Si., M.P NIP. 19750410 200501 2 009	(.....)
Anggota Penguji	: Ach. Nasichuddin, M.A NIP. 19730705 200003 1 002	(.....)

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia



Elok Kamillah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN ORISINALITAS TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Eva Chasanah

NIM :12630062

Jurusan :Kimia


Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Identifikasi Fenotip Bakteri Amilolitik dan Selulolitik dari Isolat Bekatul dengan Metode Profile Matching berdasarkan Bergey;s Manual of Determinative Bacteriology

Menyatakan bahwa hasil penelitian saya ini benarbenar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data dan tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau terdapat unsure-unsur penjiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggungjawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 5 Juli 2018
Yang Membuat Pernyataan,




Eva Chasanah
NIM. 12630062

KATA PENGANTAR

Puji syukur *Alhamdulillah* penulis ucapkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufiq serta hidayah dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul “**Identifikasi Fenotip Bakteri Amilolitik dan Selulolitik dari Isolat Bekatul dengan Metode Profile Matching berdasarkan Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology**” ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana dalam bidang Kimia di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penyusunan skripsi ini tentu tidak lepas dari bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Akyunul Jannah, S.Si., M.P selaku dosen pembimbing, Ibu Dewi Yuliani, M.Si selaku konsultan, Bapak Ach Nasichuddin, M.A selaku dosen pembimbing agama, dan ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku dosen pengujiyang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.
3. Bapak A.Ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen wali yang telah memberikan dukungan dan semangat ehingga penulisan skripsi dapat terselesaikan.
4. Seluruh dosen dan laboran Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengalaman wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
5. Ibu, Bapak, Adik dan seluruh keluarga yang selalu memberikan doa, semangat, serta motivasi kepada penulis sampai saat ini

6. Sahabat-sahabat Shinta Wulansari, Habibah Askur Liana, Asfiah Asmawati, Imam Abu, yang telah memberikan motivasi untuk menyelesaikan skripsi
7. Rekan-rekan mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, khususnya angkatan 2012 yang berjuang bersama-sama menyelesaikan studi sampai memperoleh gelar S.Si.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat member manfaat bagi penulis khususnya, dan bagi para pembaca pada umumnya. Semoga Allah *Subhanahu wa Ta'ala* senantiasa memberikan ilmu yang bermanfaat dan melimpahkan Rahmat dan Ridho-Nya. Amin.



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGANTAR	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
ABSTRAK	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan	5
1.4 Batasan Masalah	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Bekatul	7
2.2 Siklus kehidupan dalam al-Qur'an.....	8
2.3 Bakteri Amilolitik	10
2.4 Bakteri Selulolitik	12
2.5 Uji kualitatif bakteri	13
2.6 Karakterisasi bakteri secara fenotip	14
2.6.1 Pewarnaan Gram	14
2.6.2 Pembentukan Endospora.....	15
2.6.3 Uji Fermentasi Karbohidrat	16
2.6.4 Uji MR (Methyl Red).....	16
2.6.6 Uji Voges-Proskauer.....	17
2.6.7 Uji Motil	17
2.6.8 Uji Katalase.....	17
2.7 Penentuan aktivitas enzim dengan metode DNS	18
2.8 Identifikasi bakteri secara fenotip menggunakan metode profile matching berdasarkan bergey's manual determinative bacteriology	19
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Pelaksanaan Penelitian	21
3.2 Alat dan Bahan	21
3.2.1 Alat	21
3.2.2 Bahan	21
3.3 Rancangan Penelitian	22
3.4 Tahapan Penelitian.....	22
3.5 Cara Kerja	23

3.5.1. Peremajaan bakteri	23
3.5.2 Uji kualitatif bakteri	23
3.5.2.1 Bakteri amilolitik	23
3.5.2.2 Bakteri selulolitik.....	23
3.5.3 Uji kuantitatif	24
3.5.3.1 Ekstraksi enzim amilase dan selulase	24
3.5.3.2 Uji aktivitas amilase.....	24
3.5.3.3 Uji aktivitas selulase	24
3.5.3.4 Pembuatan kurva standar glukosa	25
3.5.4 Identifikasi dan karakterisasi isolate bakteri.....	26
3.5.4.1 Pewarnaan Gram.....	26
3.5.4.2 Pewarnaan endospora.....	26
3.5.4.3 Uji fermentasi karbohidrat.....	27
3.5.4.4 Uji <i>methyl red</i>	27
3.5.4.5 Uji Voges-Proskeur	27
3.5.4.6 Uji motil	28
3.5.4.7 Uji katalase	28
3.5.4.8 pH	28
3.5.4.9 Suhu	28
3.5.5 Analisis data	29

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji kualitatif bakteri	30
4.2 Uji kuantitatif aktivitas enzim.....	33
4.2.1 Kurva standar glukosa.....	34
4.2.2 Uji aktivitas enzim amilase dan selulase.....	34
4.3 Identifikasi bakteri amilolitik dan selulolitik	36
4.3.1 Pewarnaan Gram	36
4.3.2 Pewarnaan endospora.....	37
4.3.3 Fermentasi karbohidrat.....	39
4.3.4 Uji <i>methyl red</i>	40
4.3.5 Uji Voges-Proskeur.....	41
4.3.6 Uji motil	42
4.3.7 Uji katalase.....	43
4.2.8 pH.....	44
4.2.9 Suhu	45
4.4 Analisis data	46
4.4.1 Identifikasi secara manual menggunakan buku pedoman Bergey's Manual of Determinative Bacteriology	45
4.4.2 Klasifikasi fenotip dengan program MVSP	46
4.5 Identifikasi jenis bakteri dalam bekatul menurut pandangan Islam.....	48

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan53
5.2 Saran53

**DAFTAR PUSTAKA
LAMPIRAN**



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bentuk bekatul	7
Gambar 2.2 Struktur amilosa dan amilopektin	11
Gambar 2.3 Struktur Selulosa	12
Gambar 2.4 Gram positif dan negatif.....	14
Gambar 2.5 Reaksi uji katalase bakteri yang mengandung enzim katalase.....	18
Gambar 4.1 Bakteri amilolitik dan selulolitik.....	30
Gambar 4.2 Ikatan iodin dengan amilosa.....	32
Gambar 4.3 Dugaan ikatan hydrogen antara congo red dengan CMC	33
Gambar 4.4 Kurva standar glukosa.....	34
Gambar 4.5 Reaksi glukosa dengan DNS	35
Gambar 4.6 Pewarnaan Gram bakteri amilolitik dan selulolitik.....	36
Gambar 4.7 Pewarnaan endospora bakteri amilolitik dan selulolitik	37
Gambar 4.8 Proses pembentukan endospora	38
Gambar 4.9 Uji fermentasi karbohidrat	39
Gambar 4.10 Uji <i>methyl red</i>	40
Gambar 4.11 Uji Voges-Proskauer	41
Gambar 4.12 Uji motil bakteri	42
Gambar 4.13 Uji katalase.....	43
Gambar 4.14 Reaksi uji katalase yang mengandung enzim katalase.....	44
Gambar 4.15 Pertumbuhan pH optimum bakteri amilolitik dan selulolitik.....	44
Gambar 4.16 Pertumbuhan suhu optimum bakteri amilolitik dan selulolitik	45
Gambar 4.17 Dendogram yang menunjukkan hubungan antar bakteri dengan type strain berdasarkan indeks similaritas menggunakan cara simple matching coefficient bakteri amilolitik dan selulolitik.....	47

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Bakteri Selulolitik dari sampah sayuran dan buah-buahan	13
Tabel 2.2 Klasifikasi rasio enzim ekstraseluler.....	14
Tabel 2.3 Ciri-ciri bakteri gram positif dan negatif	15
Tabel 4.1 Hasil pengukuran zona bening	31
Tabel 4.2 Uji pewarnaan gram	36
Tabel 4.3 Hasil uji pewarnaan endospora	37
Tabel 4.4 Hasil fermentasi karbohidrat.....	39
Tabel 4.5 Hasil uji <i>methyl red</i>	40
Tabel 4.6 Hasil uji Voges-Proskauer	41
Tabel 4.7 Hasil uji motil.....	42
Tabel 4.8 Hasil uji katalase	43
Tabel 4.9 Uji fenotip hasil penelitian dengan Bergey's Manual of Determinative	46
Tabel 4.10 Matriks Similaritas simple matching coefficient bakteri amilolitik..	48
Tabel 4.11 Matriks Similaritas simple matching coefficient bakteri selulolitik..	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	61
Lampiran 2 Diagram Alir	62
Lampiran 3 Perhitungan	68
Lampiran 4 Fermentasi glukosa melalui jalur glikolisis	79
Lampiran 5 Karakter pada <i>Bergeys Manual of Determinative Bacteriolog</i>	80
Lampiran 6 Dokumentasi	82



ABSTRAK

Chasanah, E. 2018. **Identifikasi Fenotip Bakteri Amilolitik dan Selulolitik dari Isolat Bekatul dengan Metode Profile Matching berdasarkan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** Pembimbing I: Akyunul Jannah, S.Si. M.P; Pembimbing II: Ach. Nasichuddin, M.A; Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si.

Kata kunci: Bakteri amilolitik dan selulolitik, uji fenotipe, metode *profile matching*, *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*

Bakteri amilolitik dan selulolitik merupakan bakteri yang dapat memproduksi enzim amilase dan selulase. Penelitian pendahuluan telah berhasil mengisolasi bakteri amilolitik dan selulolitik dari bekatul. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi isolat bakteri amilolitik dan selulolitik dari bekatul berdasarkan karakter fenotip. Karakter fenotip isolat yang diuji meliputi morfologi koloni, morfologi sel, karakter biokimia, dan karakter fisiologis. Identifikasi dilakukan menggunakan metode profile matching dengan mengacu pada *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*. Klasifikasi isolat bakteri amilolitik dan selulolitik dilakukan menggunakan software program identifikasi yaitu MVSP (Multivariate Statistical Package) dengan algoritma pengklasteran UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages*). Berdasarkan hasil identifikasi bakteri amilolitik termasuk spesies *Bacillus subtilis* memiliki kemiripan 92% dan bakteri selulolitik termasuk spesies *neiseria mucosa* memiliki kemiripan sebesar 96%.

ABSTRACT

Chasanah, E. 2018. **Identification of Phenotype of amylolytic and cellulolytic Bacteria from Bran Isolates with the Profile Matching Method based on Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** Supervisor I: Akyunul Jannah, S.Si. M.P; Supervisor II: Ach. Nasichuddin, M.A; Consultant: Dewi Yuliani, M.Si.

Keywords: Bacteria amylolytic and cellulolytic, phenotype test, profile matching method, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

Amylolytic and cellulolytic bacteria are bacteria that can produce the amylase and cellulase enzymes. Preliminary research has managed to isolate amylolytic and cellulolytic bacteria from rice bran. The purpose of this study was to identify the amylolytic and cellulolytic bacterial isolate from bran based on phenotypic character. Phenotypic character of isolate that had been tested included of colony morphology, cell morphology, biochemistry characters, and physiological characteristics. Identification was done using the method of profile matching with reference to *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The classification of amylolytic and cellulolytic bacteria was performed using program software of identification; it was MVSP (Multivariate Statistical Package) with clustering algorithm of UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages). Based on identification amylolytic bacteria including *Bacillus subtilis* species had similarity of 92% and cellulolytic bacteria, including species of *Neisseria mucosa* had a similarity of 96%.

الملخص

حسنة، إ.2018. تحديد نمط الظاهري البكتيريا المحال النشا وسيلولوتيكنم العزلات النخالة معالأسلوب المطابقة الشخصية (*Profile Matching*) على أساس يدويرغى الجراثيم العزم (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*) المشرفة الأولى: أعين الجنة، الماجستير. المشرف الثاني: احمد نسخ الدين، الماجستير والمنتشرة: ديوى يولياني، الماجستير

كلمات الرئيسية: البكتيريا المحلل النشا و سيلولوتيكنم ، اختبار النمط الظاهري، طريقة المطابقة الشخصية ، يدويرغى الجراثيم العزم

البكتيريا المحلل النشا وسيلولوتيكنم البكتيريا التي تمكن أن تنتج الأميليز الانزيمات والسيلولوز. تمكنت البحث الأولية لعزل البكتيريا المحلل النشا وسيلولوتيكنم نخالة. وكان الغرض من هذه الدراسة هو تحديد العزلات البكتيرية المحلل النشا وسيلولوتيكنم نخالة على أساس الأحرف المظهرية. وتشمل الشخصيات النمط الظاهري العزلات مورفولوجيا مستعمرة، مورفولوجيا الخلايا، وشخصيات الكيمياء الحيوية، والخصائص الفسيولوجية. وتحديد باستخدام أسلوب مطابقة الشخصية مع الإشارة على يدويرغى الجراثيم العزم. تم إجراء تصنيف البكتيريا المحلل النشا و سيلولوتيكنم باستخدام برنامج تحديد يعني ((Statistical Package (Multivariate (MVSP)) مع تجميع خوارزمية UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages*). وبناء تحديد على البكتيريا المحلل النشا بما في ذلك الأنواع العصوية *Bacillus subtilis* لها مماثلة 96% والبكتيريا سيلولوتيكنم، بما في ذلك الأنواع *Neiseria mucosa* لها مماثلة 92%.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah SWT menciptakan alam semesta beserta isinya yang menunjukkan kekuasaan dan kebesaran-Nya. Allah SWT tidak hanya menciptakan sesuatu dengan ukuran yang sedang, melainkan Allah SWT juga menciptakan sesuatu yang besar dan yang kecil yang ada di langit maupun di bumi. Makhluk Allah SWT terkecil ini disebutkan Allah SWT dalam Al-Qur'an dengan kata *zarrah* sebagai zat atau substansi materi yang paling kecil, yang terdapat dalam Surat Yunus (10) ayat 61 yang berbunyi:

Al-Quran menjelaskan dalam Surat Yunus (10) ayat 61 yang berbunyi :

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦١﴾

Artinya: “Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. Tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarrah (atom) di bumi ataupun di langit. Tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)”.

Allah SWT memberitahukan kepada Nabi-Nya bahwa Dia Maha Mengetahui semua keadaan, keadaan umatnya dan keadaan semua makhluk dalam setiap saat, menit dan detik. Tafsir Ibnu katsir menjelaskan tidak ada sesuatupun yang

tersembunyi dari pengetahuannya meskipun atom sekecilpun yang ada di langit dan di bumi, dan tidak ada sesuatu pun yang lebih kecil atau lebih besar daripada itu, kecuali semuanya tercatat di dalam kitab yang nyata.

Berdasarkan ayat tersebut, terdapat kata *zarrah* yang dalam hal ini dapat diartikan sebagai sesuatu yang berukuran kecil. Organisme dalam golongan *zarrah* (berukuran kecil) adalah termasuk bakteri. Walaupun organisme ini berukuran kecil, akan tetapi memiliki manfaat di dalam kehidupan manusia. Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi ini dengan ukuran yang serapi-rapinya, termasuk di dalamnya adalah bakteri.

Bakteri adalah mikroorganisme yang termasuk prokariotik yang bersel satu. Bakteri ini dapat ditemukan di beberapa lingkungan seperti tanah, udara, air serta hidup di dalam tubuh tumbuhan misalnya bekatul. Bekatul merupakan salah satu hasil samping proses penggilingan padi. Pada proses penggilingan diperoleh hasil samping bekatul sebesar 2-3%. Bekatul ini kaya akan karbohidrat khususnya amilosa (25-32%), selulosa (32,8%) dan serat kasar (12%) (Ardiansyah, 2008). Hal ini memungkinkan bekatul menjadi sumber karbon khususnya bagi pertumbuhan bakteri amilolitik dan selulolitik (Hermanianto dkk, 2001).

Pada penelitian sebelumnya telah diisolasi bakteri amilolitik dan bakteri selulolitik dari bekatul. Bakteri amilolitik diperoleh 5 isolat bakteri yang mampu tumbuh pada media selektif agar (Asadullah, 2014). Bakteri amilolitik adalah bakteri penghasil enzim amilase yang memiliki kemampuan menghidrolisis pati menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti maltosa dan glukosa. Bakteri selulolitik didapatkan 7 isolat bakteri dan memiliki aktivitas selulolitik (Mimin, 2012). Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang menghasilkan enzim selulase

dapat menghidrolisis kompleks selulosa menjadi glukosa (Ibrahim, 2007). Bakteri yang tergolong amilolitik dan selulolitik adalah yaitu *Bacillus*, *Clostridium*, dan *Lactobacillus*. Kelompok bakteri amilolitik yang ditemukan adalah *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus alvei*, dan *Bacillus cereus* (Hastuti dan Khasanah, 2014). Golongan bakteri yang telah banyak dilaporkan sebagai kelompok bakteri selulolitik adalah *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus Subtilis* dan *Neiseria* (Lokhande dan Musaddiq, 2005)

Bakteri amilolitik dan selulolitik masing-masing menghasilkan enzim amilase dan selulase. Enzim amilase dan selulase banyak digunakan dalam industri makanan sebagai pengental dan pelapis makanan, industri tekstil untuk pelunakan katun dan denim, industri kertas untuk perbaikan dan modifikasi kertas (de Souza dan Magalhaes, 2010). Pada enzim amilase dapat digunakan untuk biokonversi amilum menjadi etanol (Bansode, 2010) sedangkan ezim selulase digunakan dalam fermentasi biomasa untuk produksi bioufel (Cherry dan Findats, 2003). Bakteri amilolitik dan selulolitik sebagai penghasil enzim banyak digunakan dalam bidang industri karena memiliki beberapa keuntungan antara lain biaya produksi murah, dapat diproduksi dalam waktu singkat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan apabila dikehendaki produksi yang lebih besar (Poernomo dan Purwanto, 2003).

Identifikasi bakteri perlu dilakukan karena dilihat dari fungsinya setiap spesies memiliki potensi yang berbeda. Identifikasi bakteri amilolitik dan selulolitik dilakukan secara fenotip untuk mengetahui spesies dari bakteri. Karakteristik secara fenotip adalah karakteristik secara fisiologi dan biokimiawi yang dapat diamati dari suatu organisme. Pengkarakterisasian bakteri meliputi pengamatan

mikroskopis dan pewarnaan bakteri yang bertujuan untuk mengetahui penampakan mikroskopik bakteri dan membedakan golongan-golongan mikroorganisme. Pengkarakterisasian menggunakan uji biokimia dapat mencerminkan aktivitas metabolisme enzimatik mikroorganisme (Gonzales dan Saiz, 2001). Proses identifikasi bakteri secara konvensional berdasarkan karakter fenotip dilakukan dengan metode *profile matching* yang mengacu pada pedoman identifikasi bakteri (Bergey's Manual Determinative Bacteriology 1984) dan dianalisis menggunakan statistika MVSP (*multivariate statistical package*).

Kaur, dkk., (2012) telah melakukan identifikasi secara fenotip bakteri amilolitik yang diisolasi dari tanah. Hasil pengamatan menunjukkan morfologi koloni berbentuk batang dan gram positif, uji biokimia dilakukan uji urease dan sitrat berdasarkan karakteristik tersebut termasuk dalam genus *Bacillus*. Sari dkk., (2011) melaporkan hasil isolasi bakteri amilolitik dari umbi singkong genus *Enterobacter Sp* dengan bentuk batang, termasuk bakteri gram negatif dan uji hidrolisis amilum menunjukkan hasil positif. Owalabi (2014) melakukan identifikasi bakteri amilolitik dari tanah telah mendapatkan berbagai macam bakteri yaitu *Bacillus alvei*, *Bacillus licheniformis*, dan *Bacillus brevis*.

Supriyatna, dkk., (2012) identifikasi bakteri selulolitik dari limbah sayuran organik dan buah-buahan memperoleh keanekaragaman bakteri dari genus *Bacillus*, *Azomonas*, *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Listeria* dan *Artobacter*. Shaikh, dkk., (2013) mengidentifikasi bakteri selulolitik dari tanah memperoleh jenis bakteri dari genus *Pseudomonas* dengan ciri Gram negatif, uji katalase, metil merah, voges-proskauer hasilnya positif. Singh dkk., (2013) telah melakukan isolasi bakteri selulolitik dari tanah

yang memiliki karakter Gram positif, endospora positif, uji katalase positif dan uji urease negatif menunjukkan *Bacillus amyloliquefaciens*.

Pada penelitian pendahuluan Asadullah (2014) telah mengisolasi bakteri amilolitik melaporkan bahwa bakteri amilolitik isolat bekatul termasuk bakteri gram positif dan berbentuk batang. Mimin (2012) telah mengisolasi bakteri selulolitik dengan karakter Gram negatif, aerob, dan endospora positif. Pada penelitian sebelumnya hanya diidentifikasi secara terbatas dan pada penelitian ini dilengkapi dengan metode identifikasi secara fenotip lainnya. Identifikasi fenotip berdasarkan pada pengamatan secara morfologi, fisiologi dan biokimia dapat mengetahui spesies bakteri.

1.2 Rumusan masalah

Bagaimana hasil identifikasi bakteri amilolitik dan bakteri selulolitik berdasarkan uji fenotip dengan metode *profile matching* ?

1.3 Tujuan

Untuk mengetahui hasil identifikasi bakteri amilolitik dan bakteri selulolitik berdasarkan uji fenotip dengan metode *profile matching* berdasarkan Bergey;s Manual of Determinative Bacteriology

1.4 Batasan Masalah

1. Bakteri amilolitik dan selulolitik didapatkan dari Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia UIN Malang
2. Bakteri amilolitik dan selulolitik diisolasi dari bekatul

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai keragaman bakteri amilolitik dan bakteri selulolitik
2. Memberikan informasi ilmiah dan pengetahuan dalam bidang industri bakteri yang mampu menghasilkan enzim amilase dan selulase

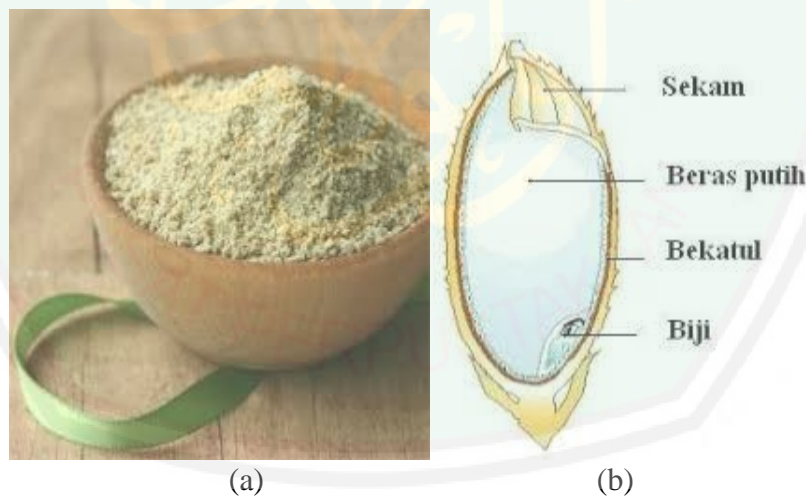


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bekatul

Bekatul merupakan hasil samping proses penggilingan padi berasal dari lapisan terluar beras yaitu bagian antara butir beras dan kulit padi. Pada proses penggilingan padi terjadi pemisahan endosperma beras (yang biasa kita makan sebagai nasi) dengan bekatul yang merupakan lapisan yang menyelimuti endosperma. Presentase bekatul dari gabah kering giling sekitar 10 % (Kuriyan, Gopinath, dan Kurpad, 2005). Bentuk bekatul dan letak bekatul dalam padi dapat dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 (a) Bentuk bekatul (b) Lapisan bekatul dalam butir padi (Swastika, 2009).

Berbagai penelitian menunjukkan bekatul memiliki komponen gizi. Bekatul mengandung karbohidrat cukup tinggi, yaitu 51-55 g/100g. Kandungan karbohidrat merupakan dari bagian endosperma beras yang menyatu karena kulit ari sangat tipis. Kandungan protein pada bekatul juga cukup baik, yaitu 11-13

g/100 g. Bekatul memiliki kandungan asam amino lisin yang tinggi dan nitrogen. Bekatul salah satunya memiliki sumber mineral yang sangat baik diantaranya yaitu fosfor, mangan, aluminium, besi, klor, silikon, kalsium, natrium, magnesium, kalium, potassium, dan seng (Astawan, 2009).

Bekatul mempunyai kandungan komponen-komponen nutrisi yang dibutuhkan bakteri. Bekatul memiliki sumber karbon dan nitrogen kandungan nutrisi tersebut pada media bekatul digunakan sebagai media pertumbuhan bagi bakteri (Retnaningtyas, dkk., 2004). Penelitian yang dilakukan (Asadullah, 2004) memperoleh bahwa bakteri dapat hidup pada bekatul.

2.2 Siklus Kehidupan dalam Al-Qu'an

Siklus kehidupan dan kematian merupakan rahasia keajaiban alam. Allah SWT mengeluarkan kehidupan dari kematian dan mengeluarkan kematian dari kehidupan di setiap saat .

﴿ إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۗ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَيُخْرِجُ الْمَيِّتَ مِنَ الْحَيِّ ۗ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ ۗ فَأَنَّىٰ تُؤْفَكُونَ ﴾

Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (Yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, maka mengapa kamu masih berpaling? (Al-An'am [6] : 95).

Maksud dari kalimat “(Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup)” adalah hanya Allah SWT yang dapat menciptakan kejadian ini. Hanya Allah SWT yang dapat menyiapkan makhluk hidup mengubah atom-atom mati menjadi sel-sel yang hidup. Hanya Allah SWT

yang mampu mengubah sel-sel hidup sekali lagi menjadi atom-atom mati. Hal itu merupakan keadaan siklus yang tidak ada orang yang mengetahuinya sejak kapan dan bagaimana bisa terjadi. Sementara yang dapat disimpulkan manusia hanyalah hipotesis, probabilitas semata, dan teori (Quthb, 2002).

Allah SWT menjelaskan bahwa semua kehidupan terjadi karena adanya penciptaan kehidupan itu, yaitu Allah SWT. Allah SWT mengembangbiakkan segala macam tumbuh-tumbuhan dari benih-benih kehidupan, baik yang berbentuk biji-bijian atau butiran-butiran. Hal itu diwujudkan adalah dengan tujuan agar lebih mudah dipahami oleh manusia, sesuai dengan pengetahuan mereka secara umum. Semua jenis kehidupan yang dalam ilmu pengetahuan digolongkan pada tumbuh-tumbuhan yang berkembangbiak dengan dengan pembelahan sel atau spora yang bisa diketahui oleh orang-orang tertentu. Kesemuanya itu berkembang biak karena hukum sebab dan akibat yang telah ditentukan oleh Allah SWT (Shabuni, 2000).

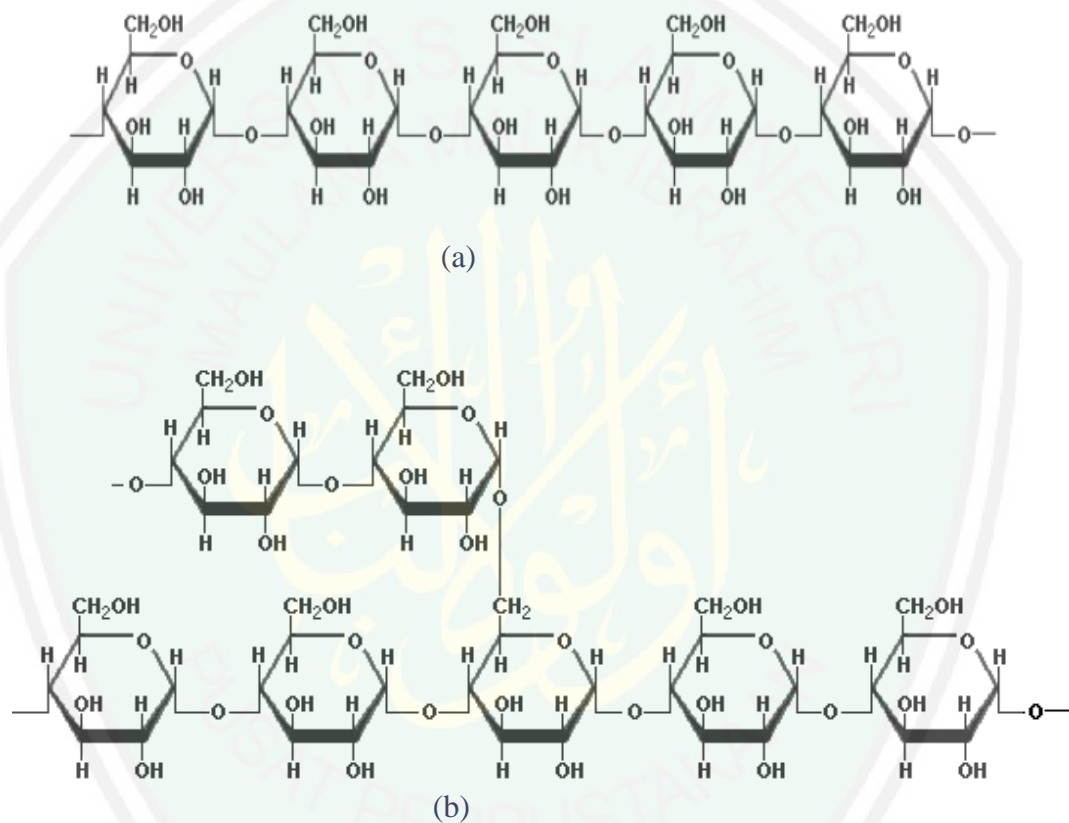
Allah SWT memberitahukan bahwa Dialah yang menumuhkan semua bibit tanaman dan membelah biji-bijian. Dia membelahnya di dalam tanah, kemudian menumbuhkan dari biji-bijian berbagai macam tanaman, sedangkan dari bibit tanaman Dia keluarkan pohon berbagai macam yang dihasilkan buah-buahan yang berbeda-beda rasa, warna dan bentuknya. Dia mengeluarkan tumbuh-tumbuhan yang hidup dari bibit tanaman dan biji yang termasuk benda mati. Allah SWT menjelaskan kekuasaanNya dalam menciptakan segala macam yang bertentangan dan berbeda-beda, semuanya itu merupakan kebesaran kekuasaanNya dan kesempurnaan dimilikiNya(Katsir, 2000).

Sesungguhnya Allah SWT menumbuhkan apa yang di tanam manusia yang berupa benih tanaman, biji buah dan membelahnya dengan kekuasaan dan perhitungannya, dengan mengaitkan sebab dan musabab, contohnya menjadikan benih dan biji di dalam tanah, serta menyirami tanah dengan air. Dia mengeluarkan tumbuh-tumbuhan yang berbatang ataupun yang tidak berbatang, sedangkan dia makan dan tumbuh dari yang mati, yaitu tidak makan dan tidak tumbuh, seperti benih, tanah, dan biji. Para ahli genetika berpendapat bahwa asal makhluk hidup ada kehidupan. Semua yang tumbuh, dari jenis benih ataupun biji-bijian mempunyai kehidupan yang tersimpan. Allah SWT tidak menjadikan makhluk hidup, kecuali tubuh yang tumbuh dan makan dengan sendirinya. Martabat kehidupan ini, menurut mereka paling rendah. Lebih tinggi dari martabat ini adalah makhluk yang mempunyai indra, kemampuan, kehendak, ilmu, akal, kebijaksanaan dan aturan. Martabat kehidupan yang paling tinggi adalah kehidupan Al-Khaliq, sumber segala kehidupan kebijaksanaan dan aturan di dalam alam ini (Maraghi, 1992).

2.3 Bakteri Amilolitik

Bakteri amilolitik adalah bakteri yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim amilase. Enzim ini menghidrolisis amilum menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti maltosa dan glukosa (Nangin dan Sutrisno, 2015). Amilum disusun oleh dua kelompok polisakarida yaitu amilosa 20-28% dan sisanya amilopektin (Aiyer dan College, 2005). Amilosa dan amilopektin memiliki monomer yang sama yaitu molekul glukopiranososa. Amilosa merupakan polimer linier yang tersusun atas homoglukan D-glukosa dengan ikatan α -1,4

glikosida dari struktur cincin piranosa. Amilopektin merupakan rantai molekul polisakarida yang memiliki banyak percabangan. Molekul D-glukopiranososa yang menjadi unit monomernya berikatan dengan ikatan α -1,4 glikosida (Rohman, 2013).

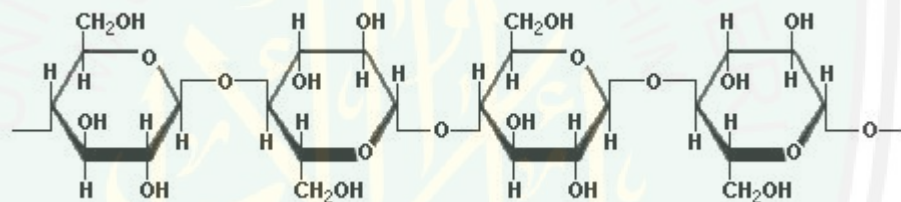


Gambar 2.2 (a) Struktur amilosa (b) Struktur amilopektin (Eliasson, 2004)

Bakteri yang tergolong amilolitik antara lain yaitu *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus polymixa*, *Clostridium butyricum*, *Staphylococcus aureus*, , dan *Bacillus subtilis* yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim amilase (Fardiaz, 1992). Bakteri amilolitik didominasi oleh bakteri Gram positif terutama *Bacillus sp.* (Bansode, 2010). Bakteri lain yang mempunyai potensi menghasilkan enzim amilase adalah *Klebsiella sp.* (Ari dan Subagiyo, 2012).

2.4 Bakteri Selulolitik

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase dapat menghidrolisis kompleks selulosa menjadi oligosakarida yang lebih kecil seperti glukosa (Ibrahim dan El-Diwany, 2007). Degradasi selulosa menjadi glukosa memerlukan 3 enzim, yaitu endoglukanase yang memecah selulosa menjadi lebih pendek (oligosakarida), eksoglukanase memotong oligosakarida menjadi selobiosa (disakarida) dari ujung non reduksi dan β -glukosidase memecah selobiosa menjadi β -glukosa (Purwoko, 2007).



Gambar 2.3 Struktur selulosa (Fitriani, 2003)

Bakteri selulolitik dapat bersifat aerob dan anaerob. Pada kondisi aerobik degradasi selulosa akan menghasilkan CO₂ dan air (Perez dkk, 2002), sedangkan dalam kondisi anaerobik akan menghasilkan etanol dan CO₂ (Rachman, 1989). Bakteri selulolitik yang bersifat aerob antara lain berasal dari genus *Cellulomonas*, *Cellovibrio*, *Pseudomonas*, *Serratia*, dan *Streptomyces*. Bakteri yang bersifat anaerob antara lain berasal dari genus *Bacteroides*, *Clostridium*, dan *Ruminococcus* (Coughlan dan Hazlewood, 2001).

Tabel 2.1 Bakteri selulolitik dari sampah sayuran dan buah-buahan

No	Genus bakteri selulolitik	Karakteristik
1	<i>Bacillus</i> (B1,B8,B9,B12)	Gram positif, berspora, sel batang, katalase positif, motil, glukosa positif
2	<i>Cellulomonas</i> (B2)	Gram positif, tidak berspora, sel kokus katalase positif, motil, glukosa positif
3	<i>Microbacterium</i> (B4)	Gram positif, berspora, sel batang, katalase positif, non motil, glukosa positif
4	<i>Neisseria</i> (B5)	Gram negatif, tidak berspora, sel kokus, katalase positif, non motil, glukosa positif
5	<i>Streptococcus</i> (B6)	Gram positif, tidak berspora, sel kokus, katalase negatif, motil, glukosa negative
6	<i>Streptomyces</i> (B7)	Gram positif, berspora, sel batang, katalase positif, motil, glukosa positif

Sumber : Supriyatna (2012)

2.5 Uji Kualitatif Bakteri

Uji bakteri amilolitik dan selulolitik secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim amilase dan selulase. Isolat yang dihasilkan enzim ekstraseluler dapat dilihat dari pembentukan zona bening disekitar koloni bakteri. Pembentukan zona bening menunjukkan bahwa amilosa dan selulosa yang terdapat pada media terhidrolisis menjadi senyawa yang sederhana seperti glukosa, maltosa dan dekstrin (Poedjiadi, 2006).

Pada bakteri amilolitik diuji secara kualitatif menggunakan media pati. Pengujian aktivitas enzim amilase ditunjukkan dengan terdapatnya zona bening pada media pati setelah diberi pewarna iodine (Sudiana, dkk., 2002). Pada bakteri selulolitik menggunakan media CMC. Pengujian aktivitas enzim selulase ditunjukkan dengan adanya zona bening pada media CMC setelah ditambahkan congo red (Zhang, dkk., 2006).

Aktivitas enzim amilase dan selulase ekstraseluler diukur secara kuantitatif berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk disekitar koloni. Tinggi

rendahnya aktivitas enzim disebabkan karena perbedaan kemampuan masing-masing bakteri dalam mendegradasi amilosa dan selulosa (Rosyada, 2015). Menurut Choi, dkk., 2005 rasio ekstraseluler dengan nilai indeks aktivitas enzim ekstraseluler ditampilkan pada Tabel 2.2

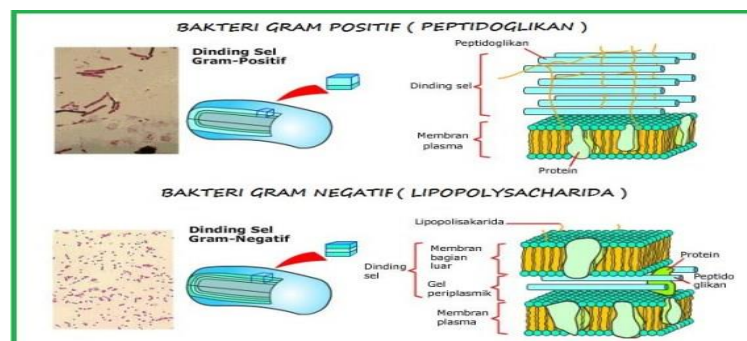
Tabel 2.2 Klasifikasi rasio enzim ekstraseluler (Choi *et al.*, 2005)

Rasio Enzim Ekstraseluler	Reaksi
Tidak ada zona bening	Negatif
≤ 1	Rendah
1-2	Sedang
≥ 2	Tinggi

2.6 Karakterisasi bakteri secara fenotip

2.6.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram digunakan untuk mengetahui morfologi bakteri dan membedakan antara bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan kandungan lipid yang rendah sedangkan bakteri Gram negatif mengandung banyak lipid (Cappucino dan Sherman, 2005). Pewarnaan Gram hasil yang didapat ditentukan dari komposisi dinding sel pada bakteri. Bakteri Gram positif mempertahankan warna ungu sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah (Pratita, 2012).



Gambar 2.4 Gram positif dan Gram negatif (Pelczar, 1998)

Tabel 2.3 Ciri-ciri bakteri Gram positif dan negatif

Ciri	Gram Positif	Gram Negatif
Struktur dinding sel	Tebal (15-80 nm)	Tipis (10-15 nm)
Komposisi dinding sel	Kandungan lipid rendah (1-4%) Peptidoglikan ada sebagai lapisan tunggal terdapat asam tekoat	Kandungan lipid tinggi (11-12%) Peptidoglikan di dalam lapisan kaku
Kerentanan terhadap penisilin Persyaratan nutrisi	Relatif rumit	Sederhana
Resistensi terhadap gangguan fisik	Resistensi	Kurang resistensi
Kerentanan terhadap penisilin	Lebih rentan	Kurang rentan
Pertumbuhan oleh zat-zat warna dasar (ungu kristal)	Pertumbuhan dihambat dengan nyata	Tidak begitu dihambat

Sumber : Dwidjoseputro(1994)

Prinsip dasar pada pewarnaan Gram yaitu terdapat ikatan ion antara komponen seluler dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarna. Zat pewarna yang digunakan kristal violet. Kristal violet merupakan pewarna yang bersifat basa, muatan positif zat warna basa akan berikatan dengan muatan negatif dalam dinding sel sehingga mikroorganisme terlihat jelas (Hadiotomo, 2001).

2.6.2 Pembentukan Endospora

Endospora merupakan struktur yang rentan terhadap keadaan lingkungan yang ekstrim seperti pemanasan, kering dan keadaan asam. Endospora berbentuk menggumpal atau sangat padat dikarenakan memiliki kandungan air yang sangat rendah. Bakteri jenis tertentu membentuk suatu struktur di dalam sel pada tempat-tempat yang khas disebut endospora. Ada dua genus bakteri yang dapat membentuk endospora, yaitu genus *Bacillus* dan genus *Clostridium* (Pratita, 2012).

Endospora mempunyai kemampuan adaptasi yang tinggi sehingga untuk mengamatinya dibutuhkan perlakuan khusus untuk mewarnai agar dapat menembus dinding tebal spora (Hadiotomo,2001). Metode Schaeffer-Fulton digunakan dalam pengecatan endospora yaitu endospora di warnai dengan malachit green dengan proses pemanasan. Larutan ini adalah pewarna yang kuat dan dapat berpenetrasi ke dalam endospora. Pada teknik ini akan menghasilkan warna hijau pada endospora positif (Fitrah, Darmawi, dan Rasmaidar, 2013).

2.6.3 Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat digunakan untuk mengetahui bakteri yang dapat menfermentasi karbohidrat jenis tertentu dan dapat menghasilkan asam serta gas. Uji fermentasi karbohidrat menggunakan media cair yang mengandung karbohidrat tertentu (glukosa, laktosa, sukrosa, dan maltosa) serta indikator fenol merah (Norman, 2005). Pada saat proses fermentasi karbohidrat akan diubah bakteri menjadi asam organik, seperti asam asetat, asam laktat atau asam asetat. Suasana asam dalam media cair akan mengubah warna indikator fenol merah menjadi kuning tua. Beberapa bakteri dalam proses fermentasi menghasilkan asam dan gas (CO_2) (Cappucino dan Sherman, 2005).

2.6.4 Uji MR (*Methyl Red*)

Uji *methyl red* digunakan untuk mengetahui adanya fermentasi asam campuran. Beberapa bakteri menfermentasi glukosa dan menghasilkan berbagai produk yang bersifat asam. Penambahan indikator *methyl red* dapat menunjukkan adanya perubahan pH menjadi asam. pH 4,4 berwarna merah dan pH 6,2 (sedikit

mendekati basa) berwarna kuning. Jika hasilnya positif dapat menfermentasi asam campuran, maka biakan akan berwarna merah (asam) sedangkan apabila tidak terjadi fermentasi maka biakan akan berubah warna menjadi kuning (basa) (Sariani, dkk., 2005).

2.6.5 Uji Voges-Proskauer

Uji voges-proskauer digunakan mengidentifikasi mikroorganisme yang dapat menfermentasi karbohidrat menjadi 2,3-butanadiol. Uji ini menentukan adanya asetoin karena asetoin merupakan senyawa awal dalam sintesis 2,3-butanadiol. Asetoin ditunjukkan oleh perubahan warna menjadi lembayung (Lay, 1994). Kandungan asetoin yang dihasilkan dalam larutan ditandai dengan perubahan warna larutan dari bening menjadi lembayung (Irawati, 2005).

2.6.7 Uji Motil

Motil adalah salah satu dari ciri mikroorganisme yang memiliki alat gerak sederhana berupa flagella. Aktivitas motil dapat diamati pada daerah goresan media yang telah diinokulasi bakteri. Uji bakteri diinokulasikan dengan menggunakan suatu jarum ose melalui pusat media. Bakteri non motil hanya tumbuh pada garis inokulum, sedangkan organisme yang motil tumbuh keluar dari media dan tampak keruh (Brooks, Butel, dan Morse, 2008).

2.6.8 Uji Katalase

Uji katalase merupakan uji untuk mengetahui bakteri tersebut merupakan bakteri aerob, anaerob fakultatif atau anaerob. Bakteri aerob menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang beracun bagi bakteri sendiri (Sariani, dkk., 2015). Bakteri tertentu untuk menjaga kelangsungan hidupnya, maka bakteri

tersebut menghasilkan enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen sehingga sifat toksiknya hilang (Neliyani, 2014). Bakteri aerobik dan anaerobik fakultatif akan memproduksi H_2O_2 yang bersifat racun terhadap bakteri yang masih hidup. Bakteri anaerob akan mengalami kematian bila ada oksigen, disebabkan karena tidak adanya pembentukan enzim katalase sehingga H_2O_2 meracuni bakteri itu sendiri (Hadiotomo, 2001). Persamaan reaksi yang terjadi pada uji katalase sebagai berikut:



Gambar 2.5 Reaksi uji katalase bakteri yang mengandung enzim katalase (Hadiotomo, 2001)

2.7 Penentuan Aktivitas Enzim dengan metode DNS

Metode kuantitatif dalam uji aktivitas enzim adalah dengan mengetahui kadar gula tereduksi yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim terhadap substrat. Uji aktivitas enzim yang digunakan dalam adalah dengan menggunakan metode dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) atau Somogy-Nelson (Somogy, 1952). Reaksi DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehyd gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk 3-amino dan asam 5-nitrosalisilat.

DNS adalah senyawa aromatis yang dapat bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya untuk membentuk asam 3-amino 5-nitrosalisilat (Laila, dkk., 2007). DNS merupakan suatu senyawa yang dapat menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada 540 nm. Apabila komponen pereduksi yang terdapat dalam sampel semakin banyak, maka semakin banyak

asam 3-amino 5-nitrosalisilat yang terbentuk dan mengakibatkan serapan pada spektrofotometer semakin tinggi. Pada reaksi DNS berjalan dalam suasana basa dengan penambahan NaOH yang berfungsi penstabilkan warna pada saat terjadi reaksi. Apabila adanya gula reduksi pada sampel, pada larutan DNS yang kondisi awalnya berwarna kuning berubah menjadi warna jingga kemerahan (Nelson dan Cox, 2005).

2.8 Identifikasi bakteri secara fenotip menggunakan metode *profile matching* berdasarkan *bergey's manual of determinative bacteriology*

Bergey's manual of determinative bacteriology merupakan panduan untuk menentukan identitas bakteri dengan memanfaatkan setiap karakter yang ada. Bakteri merupakan kelompok organisme yang beragam dan untuk memudahkan mempelajarinya diperlukan suatu cara pengelompokan. Keanekaragaman bakteri dapat dieksplorasi dengan karakterisasi pada fenotipnya, yaitu karakter morfologis, fisiologis, dan biokimia (Waluyo, 2010).

Pendekatan umum yang digunakan dalam penggunaan Bergey's manual of determinative bacteriology yaitu membuat skema ciri-ciri bakteri. Bakteri dibedakan berbagai organisme berdasarkan susunan dasar organisme dalam kelompok taksonomik. Bakteri tergolong kategori Gram negatif atau positif dibagi menjadi 4 kategori yakni eubacteria Gram negatif berdinding sel, eubacteria Gram positif berdinding sel, eubacteria dengan sedikit dinding sel, archaeobacteria.

Bakteri ditentukan termasuk dalam kelompok mana, buku ini tersedia masing-masing kategori dan ciri-ciri mendetail dari dari setiap kelompok.

Kelompok genus bakteri tersaji dalam tabel untuk petunjuk karakteristik yang digunakan membedakan genera dalam kelompok. Kelompok spesies apa, dari deskripsi genus disertai oleh satu atau lebih tabel mengikuti perbedaan spesies yang terdapat dalam genus (Waluyo, 2010)



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-September 2016 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik (Kenko), gelas arloji, pengaduk gelas, beaker glass, erlenmeyer, autoclave, hot plate. Uji kuantitatif menggunakan tabung reaksi, rak tabung reaksi, shaker, pipet volume, pipet ukur, mikropipet, *vortex*, kertas pH, laminar air flow, lemari asam dan spektrofotometer. Karakteristik bakteri menggunakan jarum ose, bunsen, korek api, tabung durham.

3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri amilolitik dan selulolitik dari isolat bekatul yang diperoleh dari Laboratorium biokimia UIN Maliki Malang. Media yang digunakan adalah media nutrient agar, media pati, media CMC, media voges-proskeur, media agar semisolid, media nutrient broth, media *methyl red*, media *phenol red*. Bahan-bahan larutan yang digunakan adalah larutan iodin, larutan congo red, reagen DNS (asam 3,5-Dinitrosalicylic acid,

fenol, sodium sulfit dan natrium hidroksida), KNa-Tartrat 40%, glukosa, sukrosa, laktosa, aquades, kristal violet, safranin, alkohol 96%, NaCl, *malachit green*, KOH 40%, α -naftol, H₂O₂. Buffer yang digunakan adalah buffer sitrat (pH 4 dan 5), buffer fosfat (pH 6 dan 7), buffer tris-HCl (pH 8).

3.3 Rancangan penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif yang bertujuan untuk eksplorasi. Adapun tahap penelitian yang dilakukan adalah peremajaan bakteri, uji kualitatif bakteri amilolitik dan selulolitik, identifikasi bakteri. Identifikasi dilakukan uji biokimia yang meliputi fermentasi karbohidrat, motil, *methyl red* (MR), Voges – Proskauer, katalase, pH dan suhu. Identifikasi bakteri secara konvensional berdasarkan karakter fenotip dilakukan dengan metode *profile matching* yang mengacu pada pedoman identifikasi bakteri (*Bergey's Manual Determinative Bacteriology 1984*).

3.4 Tahap Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Peremajaan bakteri
2. Uji kualitatif bakteri
3. Uji kuantitatif bakteri
4. Identifikasi bakteri amilolitik dan selulolitik
 - A. Morfologi Bakteri (Pewarnaan Gram dan endospora)
 - B. Uji Biokimia (fermentasi karbohidrat, *methyl red* (MR), Voges-Proskauer (VP), motil, katalase)

C. pH

D. Suhu

5. Analisis data

3.5 Cara kerja

3.5.1 Peremajaan Bakteri

Bakteri dikultur pada media nutrient agar (NA) dengan cara koloni diambil dari stok bakteri yang telah tersedia. Koloni bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose steril dan digoreskan pada media NA. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Nurchayanti, 2011).

3.5.2 Uji Kualitatif Bakteri

3.5.2.1 Bakteri amilolitik

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media pati dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam kemudian ditetesi dengan larutan iodin pada permukaan media. Isolat bakteri yang mampu membentuk zona bening di sekeliling koloninya merupakan bakteri amilolitik (Apun, dkk., 2000).

3.5.2.2 Bakteri selulolitik

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media CMC dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Hidrolisis selulosa dideteksi dengan meneteskan larutan congo red pada permukaan media. Zona bening yang terbentuk di sekeliling koloni bakteri menunjukkan adanya aktivitas selulolitik (Apun, dkk, 2000).

3.5.3 Uji kuantitatif

3.5.3.1 Ekstraksi enzim amilase dan selulase

Bakteri diambil 1 ose dan masukkan ke dalam 25 mL media cair. Kultur bakteri diinkubasi pada shaker inkubator selama 18 jam pada suhu 37°C. Kultur disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar amilase dan selulase (Jennifer dan Thiruneelakandan, 2015).

3.5.3.2 Uji aktivitas amilase

Penentuan aktivitas amilase dilakukan secara kuantitatif dengan metode DNS. Ekstrak kasar amilase sebanyak 1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL media pati terlarut (telah dilarutkan dalam bufer fosfat). Mulut tabung ditutup dengan aluminium foil. Tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. DNS 1 mL ditambahkan dan kocok menggunakan vortex. Tabung reaksi dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit hingga larutan berwarna merah kecoklatan. KNa-Tartrat 40% sebanyak 1 mL ditambahkan. Tabung reaksi dan ditambahkan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Larutan sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Apriani, 2014).

3.5.3.3 Uji aktivitas enzim selulase

Media CMC 1% sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL ekstrak kasar enzim selulase dan dimasukkan ke dalam tabung dan dikocok menggunakan vortex. Diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C. Larutan tersebut diambil

sebanyak 1 mL dan ditambahkan dengan 1 mL DNS, dipanaskan di air mendidih selama 15 menit. Ditambahkan dengan 1 mL KNa-tartrat. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Absorbansi diukur pada 540 nm dengan menggunakan spektrofotometer (Maranatha, 2008).

3.5.3.4 Pembuatan kurva standar glukosa

Tabung reaksi sebanyak 7 disiapkan, masing-masing diisi dengan larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 25, 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm. Larutan glukosa diambil 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Reagen DNS ditambahkan 1 mL ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan. Tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Larutan KNa-Tartrat 40% ditambahkan 1 mL. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Rosyada, 2015).

Aktivitas enzim amilase dapat dihitung menggunakan rumus persamaan berikut ini (Kombong, 2004) :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa}(\mu\text{mol/mL}) \times (\text{volume total enzim-substrat})}{\text{volume enzim} \times \text{waktu inkubasi}} \dots(1)$$

3.5.4 Identifikasi dan karakterisasi isolat bakteri

3.5.4.1 Pewarnaan Gram

Bakteri amilolitik diambil satu jarum ose dan dioleskan dengan aquades di atas preparat lalu diletakkan di atas api bunsen sampai kering. Preparat ditetesi dengan kristal violet dan biarkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir. Larutan iodin ditambahkan 1 tetes dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat dibilas dengan alkohol 96% sampai semua zat warna luntur kemudian dicuci dengan air. Safranin sebanyak 1 tetes ditambahkan ke di atas preparat dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan minyak imersi, dan diamati dengan mikroskop. Uji Gram positif jika berwarna ungu dan negatif jika berwarna merah (Hadioetomo, 1993).

3.5.4.2 Pewarnaan Endospora

Biakan murni bakteri amilolitik diambil satu jarum ose dan disuspensikan dengan aquades yang ada di gelas obyek. Preparat difiksasi di atas api bunsen. Preparat ditetesi *malachit green*, dibiarkan selama 10 menit di atas penangas air. Preparat diangkat dan dibiarkan dingin, selanjutnya dibilas dengan air mengalir. Safranin ditambahkan sebanyak 1 tetes dibiarkan selama 30 detik kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Preparat diamati dengan mikroskop, uji positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau (Lay, 1994).

3.5.4.3 Uji fermentasi karbohidrat

Isolat bakteri diinokulasikan pada media *phenol red* yang mengandung nutrient broth, indikator *phenol red* dan dibagi menjadi 3 tabung yang masing-masing ditambahkan glukosa, sukrosa, dan laktosa. Tabung Durham dimasukkan tanpa adanya gelembung ke masing-masing media. Isolat bakteri diinkubasi dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Uji fermentasi karbohidrat positif berubah menjadi kuning dan menghasilkan gas CO₂ berarti bakteri tersebut menfermentasi gula dan menghasilkan asam (Pratita, 2012).

3.5.4.4 Uji *methyl red* (MR)

Isolat bakteri sebanyak 1 ose diambil dari stok kultur dan diinokulasikan pada media *methyl red* dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 5 x 24 jam pada suhu 37°C. *Methyl red* sebanyak 5 tetes ditambahkan ke dalam isolat bakteri. Hasil positif apabila terbentuk kompleks berwarna merah yang menandakan bahwa mikroba tersebut menghasilkan asam (Hadioetomo, 1993).

3.5.4.5 Uji Voges – Proskauer (VP)

Isolat bakteri diinokulasikan pada media Voges-Proskauer cair dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 3 x 24 jam pada suhu 37°C. Media Voges-Proskauer ditambahkan 0,2 mL KOH 40% dan 0,6 mL α -naftol dikocok selama 30 detik. Hasil positif jika medium berubah warna lembayung (Hadioetomo, 1993).

3.5.4.6 Uji Motil

Isolat bakteri sebanyak satu ose diinokulasikan kedalam media agar semisolid dengan cara ditusukkan secara tegak. Media tersebut diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam dan diamati perubahan yang terjadi. Hasil positif menunjukkan media menjadi keruh seluruhnya dan negatif apabila keruh hanya pada daerah tusukan (Hadioetomo, 1993).

3.5.4.7 Uji katalase

Isolat bakteri diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi media nutrient broth sebanyak 5 ml dan ditetaskan H₂O₂ ke dalamnya. Bila terbentuk gelembung gas O₂ berarti katalase positif, sedangkan bila tidak ada gelembung berarti katalase negatif (Hadioetomo, 1993).

3.5.4.8 pH

Media nutrient broth (NB) diatur pada pH 4, 5, 6, 7, dan 8. Buffer yang digunakan, yaitu bufer sitrat (pH 4 dan 5), bufer fosfat (pH 6 dan 7), bufer tris-HCl (pH 8). Perlakuan masing-masing diinokulasi kultur isolat bakteri dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C. Pertumbuhan sel ditentukan berdasarkan absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm (Pakpahan, dkk 2013).

3.5.4.9 Suhu

Isolat bakteri diinokulasikan pada pH optimum pertumbuhan bakteri. Kultur diinkubasi pada variasi suhu 20, 30, 40, 50, dan 60°C selama 24 jam.

Pertumbuhan sel ditentukan berdasarkan absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm (Pakpahan, dkk., 2013).

3.5.5 Analisis data

Data yang dihasilkan dari uji morfologi dan uji biokimia dalam bentuk tabel dan digunakan untuk menentukan spesies bakteri berdasarkan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt, dkk., 1994). Jenis bakteri yang telah diidentifikasi secara molekuler gen 16 S rRNA juga digunakan sebagai acuan yang memiliki kedekatan antara bakteri yang satu dengan bakteri yang lainnya. Sifat fenotipik yang diperoleh dari uji tiap karakter yang telah dikonversikan dengan nilai positif dan negatif kemudian disajikan dalam bentuk matriks $n \times t$, dan n adalah sifat fenotipik sedangkan t adalah jumlah isolat dan strain acuan yang dianalisis. Data ini diatur pada Microsoft excel selanjutnya dilakukan analisis menggunakan program Multivariate Statistical Package (MVSP). Menentukan similaritas di antara isolat-isolat menggunakan koefisien Simple Matching Coefficient (SSM). Pengelompokan dilakukan dengan algoritma UPGMA dan hasilnya disajikan dalam bentuk dendogram (Sembiring, 2002).

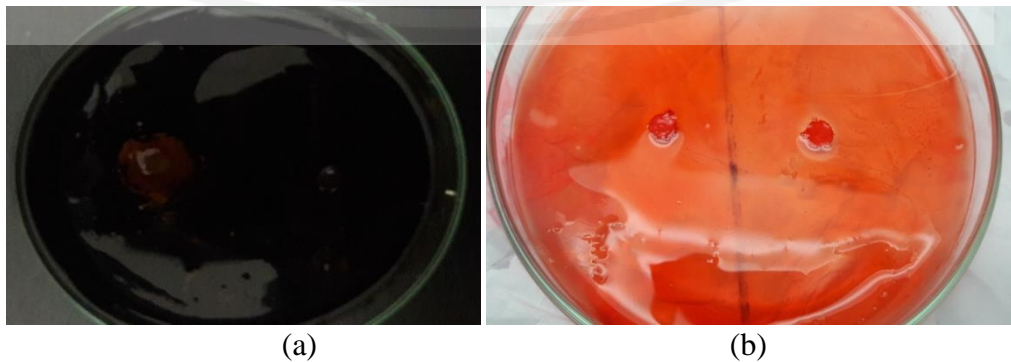
BAB IV

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan proses identifikasi bakteri amilolitik dan selulolitik untuk mengetahui spesies dari bakteri tersebut. Penelitian ini meliputi beberapa tahapan diantaranya, uji kualitatif bakteri, uji kuantitatif bakteri, uji biokimia, uji pH, uji suhu. Proses berikutnya dianalisis menggunakan *Bergey's manual of determinative* dan menggunakan statistika MVSP (*multivariate statistical package*).

4.1 Uji Kualitatif Bakteri

Uji kualitatif bakteri amilolitik dan selulolitik dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim amilase dan selulase. Aktivitas enzim diketahui dengan cara mengamati zona bening yang dihasilkan pada media. Zona bening mengidentifikasi bahwa amilosa dan selulosa telah terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu monosakarida (Rahayu, dkk 2014).



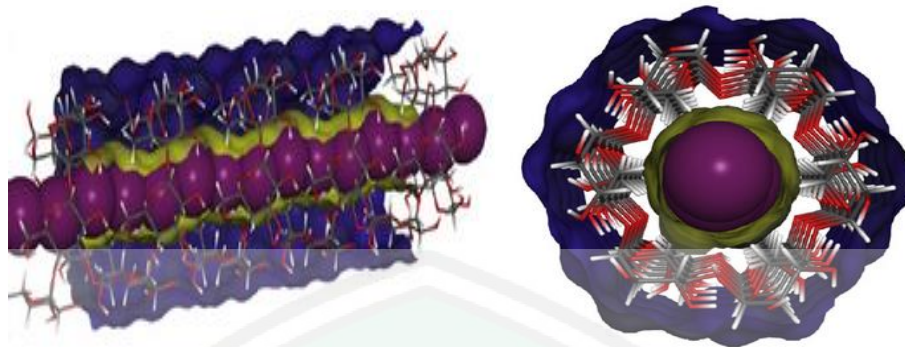
(a) (b)
Gambar 4.1 (a) Bakteri amilolitik dan (b) bakteri selulolitik

Tabel 4.1 Hasil Pengukuran zona bening

No	Bakteri	Indeks Aktivitas	Rasio Enzim
1	Amilolitik	1,85	Sedang
2	Selulolitik	0,66	Rendah

Hasil uji kualitatif pada Gambar 4.1 memperlihatkan adanya zona bening di sekitaran biakan yang menunjukkan bahwa bakteri amilolitik dan selulolitik mampu menghasilkan enzim. Hasil pengukuran zona bening ditampilkan pada Tabel 4.1 menghasilkan indeks amilolitik sebesar 1,85 dan selulolitik sebesar 0,66 dengan rasio sedang dan rendah yang merujuk pada Tabel 2.2. Aktivitas enzim ekstraseluler diukur secara semi kuantitatif berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk disekitar koloni. Pada bakteri amilolitik terdapat zona bening yang lebih besar daripada zona bening bakteri selulolitik. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim bakteri amilolitik lebih besar daripada aktivitas enzim selulolitik. Menurut Apun dkk (2000), semakin besar zona bening yang terbentuk disekitar koloni isolat, maka semakin besar aktivitas amilolitik dan selulolitik yang dihasilkan.

Potensi amilolitik dapat diukur dari kemampuan isolat bakteri dalam mensekresikan enzim amilase. Bakteri yang memiliki aktivitas enzim amilase menghidrolisis pati yang terkandung pada media sehingga menghasilkan zona bening. Pati yang tidak terhidrolisis akan berwarna biru kehitaman (Zahidah, 2013).



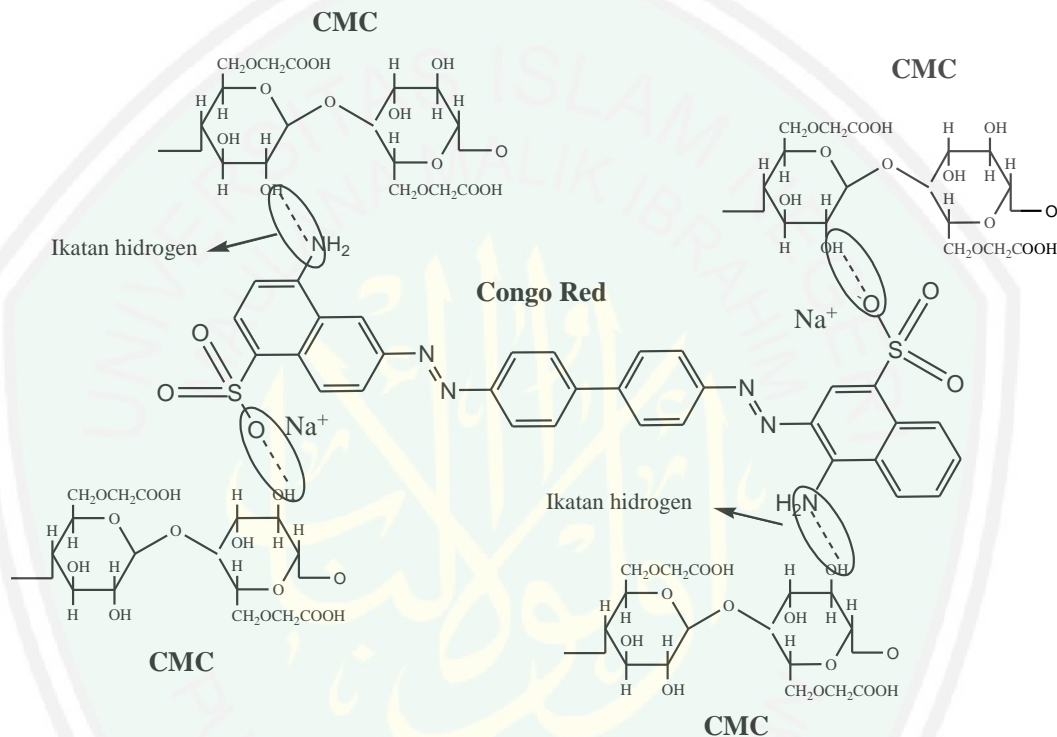
Gambar 4.2 Kompleks iodin dengan amilosa (Mottiar dan Altosaar, 2011)
(warna ungu = iodin dan warna merah = amilosa)

Pati merupakan polimer dari glukosa yang terdiri dari dua komponen utama yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa umumnya cenderung membentuk heliks tunggal dan atom oksigen di posisi 2 dan 6 dari monomer glukosa terletak pada permukaan heliks dengan oksigen cincin menunjuk ke dalam. Amilosa membentuk struktur heliks yang dapat membentuk kompleks dengan iodin. Molekul iodin masuk ke dalam pusat rantai heliks dan kompleks yang dihasilkan berwarna biru tua (Bernazzani, dkk 2008). Menurut Yu Xiaochun, dkk., (1996) rongga heliks nonpolar amilosa berfungsi sebagai pelarut nonpolar. Molekul iodin kemudian larut dalam interior hidrofobik. Kompleks amilosa dengan iodin ditunjukkan pada Gambar 4.2

Potensi selulolitik diukur berdasarkan kemampuan isolat bakteri dalam mensekresikan enzim selulase. Bakteri yang memiliki aktivitas enzim selulase dapat menghidrolisis media CMC yang mengandung selulosa sehingga menghasilkan zona bening. Media CMC agar yang tidak terhidrolisis berwarna merah.

Adapun dugaan interaksi antara *congo red* dengan CMC yang ditunjukkan pada Gambar 4.3. Dugaan interaksi antara *congo red* dengan CMC dapat

diprediksikan yaitu ikatan hidrogen. Ada kemungkinan interaksi yang terjadi yaitu ikatan hidrogen antara atom oksigen bermuatan negatif dari sulfonat dengan atom hidrogen bermuatan positif dari gugus hidroksil CMC. Ikatan hidrogen yang terjadi antara atom hidrogen dari CMC dengan atom nitrogen dari *congo red* (Prameswari, 2014).



Keterangan : ----- = Ikatan hidrogen

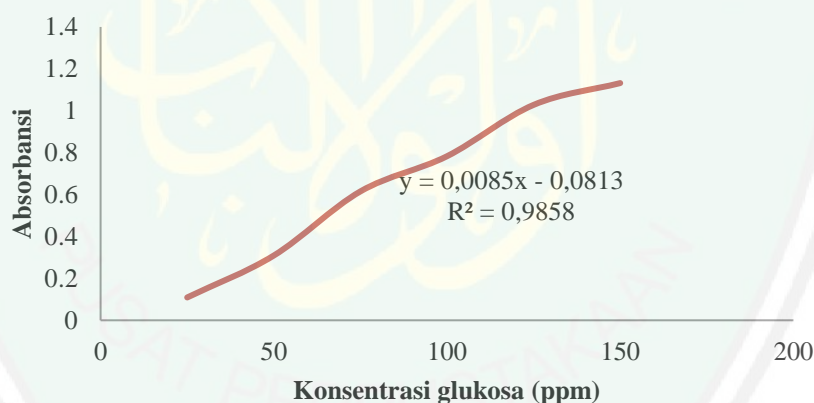
Gambar 4.3 Dugaan ikatan hidrogen antara Congo Red dengan CMC (Mazeau dan Wyszomirski, 2012)

4.2 Uji Kuantitatif aktivitas enzim amilase dan selulase dengan metode DNS

Pada penelitian ini dilakukan uji kuantitatif aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh bakteri amilolitik dan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik. Pada uji ini dilakukan dengan menggunakan metode DNS (asam dinitro salisilat). Aktivitas enzim amilase dan selulase diperoleh dengan absorbansi enzim dari uji DNS terhadap persamaan kurva standar glukosa.

4.2.1 Kurva standar glukosa

Kurva standart berfungsi untuk mengetahui konsentrasi larutan glukosa berdasarkan nilai absorbansinya. Kurva standart dalam penelitian ini menggunakan larutan glukosa karena glukosa merupakan gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis amilosa dan selulosa oleh enzim amilase dan selulase. Kurva standar dibuat dengan variasi konsentrasi glukosa 0, 25, 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm. Larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 540 nm. Absorbansi larutan standar glukosa yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 4.4. Hasil kurva standar glukosa memiliki persamaan linier linier $y = 0,0085x - 0,0813$ dengan nilai korelasi (R^2) sebesar 0,985.

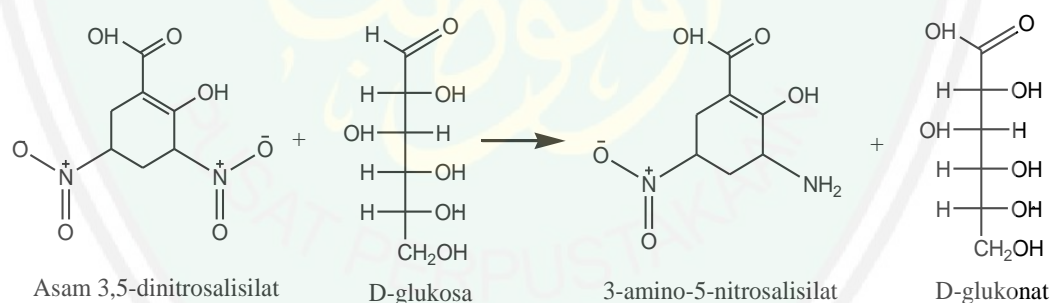


Gambar 4.4 Kurva standar glukosa

4.2.2 Uji Aktivitas Enzim amilase dan selulase dengan metode DNS

Uji aktivitas enzim amilase dan selulase adalah mengetahui kadar glukosa yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim terhadap substrat. Uji ini dilakukan dengan menggunakan metode DNS. DNS merupakan senyawa aromatis yang dapat bereaksi dengan gula reduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat (Oktavia, 2014). Senyawa ini dapat menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada

panjang gelombang 540 nm. DNS yang berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan. Kadar glukosa yang terdapat dalam sampel semakin tinggi maka absorbansi sampel akan semakin tinggi. Hal ini mengindikasikan bahwa semakin banyak molekul asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk (Rahmansyah dan Sudiana, 2003). Reaksi DNS dengan glukosa merupakan reaksi reduksi-oksidasi dimana gugus aldehid (glukosa) teroksidasi menjadi gugus karboksil (D-glukonat). Kelompok aldehid glukosa $-CHO$ teroksidasi menjadi gugus asam karboksilat $-COOH$ mengubah molekul glukosa menjadi asam glukonat. Kelompok $-NO_2$ dari asam 3,5-dinitrosalisilat tereduksi menjadi $-NH_2$ dari 3-amino-5-nitrosalisilat. Reaksi ini berlangsung dalam suasana basa dengan adanya penambahan NaOH (Taherzadeh, 2007).



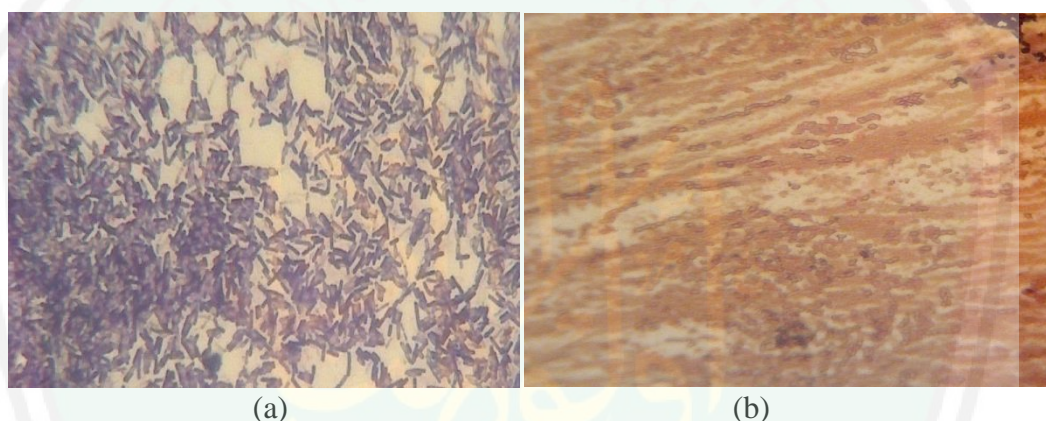
Gambar 4.5 Reaksi Glukosa dengan DNS (Kusmiati, 2010)

Hasil pengukuran aktivitas amilase sebesar 0,037 Unit/mL dan aktivitas enzim selulase sebesar 0,0022 Unit/mL (Lampiran 3.16). Kadar glukosa yang diperoleh menunjukkan aktivitas enzim amilase dan selulase dalam menghasilkan glukosa. Aktivitas enzim amilase dan selulase besar kecilnya akan mempengaruhi kadar gula pereduksi (glukosa) yang dihasilkan.

4.3 Identifikasi bakteri amilolitik dan selulolitik

4.3.1 Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan Gram bertujuan untuk membedakan antara bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif dapat mempertahankan warna ungu dari kristal violet ketika diamati mikroskop akan menunjukkan warna ungu. Bakteri Gram negatif mengikat zat warna safranin yang terserap pada dinding sel sehingga diamati menggunakan mikroskop berwarna merah.



Gambar 4.6 Pewarnaan Gram (a) Bakteri Amilolitik (b) bakteri selulolitik (Perbesaran 400x)

Tabel 4.2 Hasil uji pewarnaan Gram

No	Bakteri	Gram	Bentuk
1	Amilolitik	Positif	Basil
2	Selulolitik	Negatif	Kokus

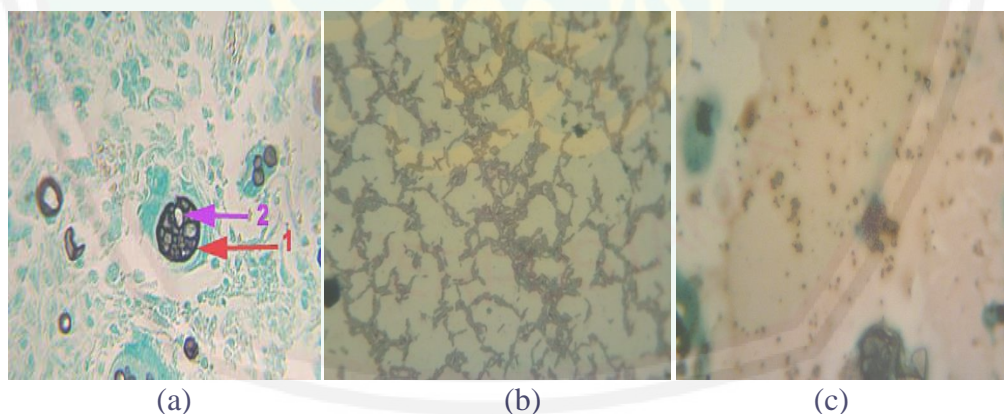
Keterangan : Positif = menghasilkan Gram positif
Negatif = menghasilkan Gram negatif

Hasil uji pewarnaan Gram yang ditunjukkan pada Gambar 4.6 dan Tabel 4.2 isolat bakteri amilolitik menunjukkan bahwa bakteri bersifat Gram positif dan berbentuk basil yang ditandai dengan warna ungu. Struktur dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari dua lapisan yaitu peptidoglikan yang tebal dan membran luar. Lapisan peptidoglikan yang mengikat zat warna kristal violet (Ernawati,

2010). Hasil pengujian pewarnaan pada Gambar 4.6 isolat bakteri selulolitik menunjukkan Gram negatif dan berbentuk kokus yang ditandai dengan warna merah pada sel bakteri. Pada bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis (satu sampai dua lapis) dan kadar lipid yang tinggi (20%) sehingga pewarna lebih cenderung mengikat safranin.

4.3.2 Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora dilakukan untuk mengetahui bahwa bakteri dapat menghasilkan endospora. Spora bakteri diamati dengan pewarna spesifik yaitu *malachite green* dan safranin. Fungsi dari penggunaan pewarna *malachite green* adalah untuk mewarnai endospora yang ada dalam sel bakteri. Safranin agar dapat memperjelas pengamatan sel vegetatif (Zahidah, 2013).



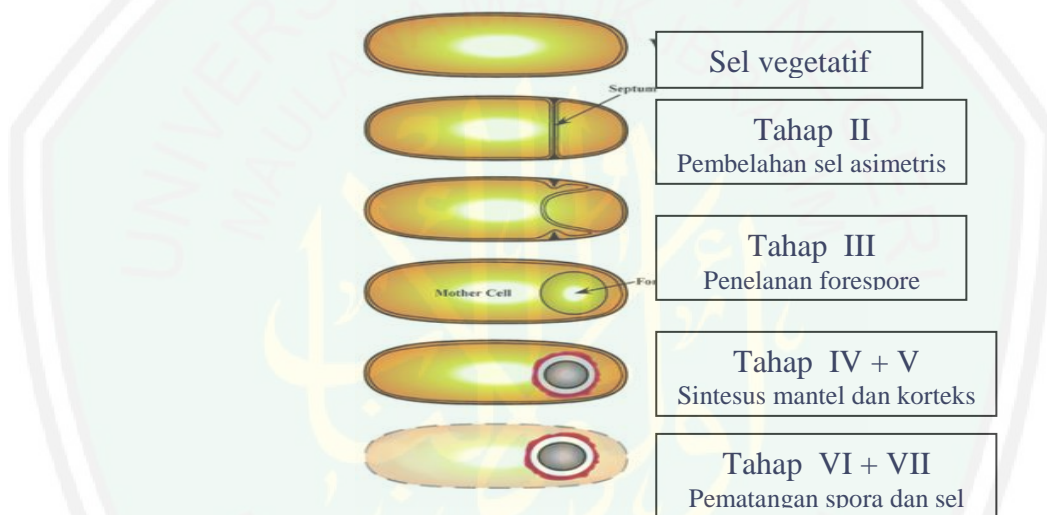
Gambar 4.7 Pewarnaan endospora (a) *Bacillus* sp.(Yusra, 2014) (b) Bakteri amilolitik (c) Bakteri selulolitik (Pebesaran 400x)

Tabel 4.3 Hasil uji pewarnaan endospora

No	Bakteri	Endospora
1	Amilolitik	Positif
2	Selulolitik	Positif

Keterangan : Positif = mampu menghasilkan endospora
Negatif = tidak mampu menghasilkan endospora

Hasil pewarnaan endospora pada bakteri amilolitik dan selulolitik pada Gambar 4.7 dan Tabel 4.3 menunjukkan bahwa isolat bakteri mampu menghasilkan endospora. Bakteri dapat menghasilkan endospora berwarna hijau dan sel vegetatif berwarna merah. Endospora berfungsi untuk melindungi tubuh bakteri dari lingkungan yang kurang menguntungkan. Adapun proses pembentukan endospora yang ditunjukkan pada Gambar 4.8

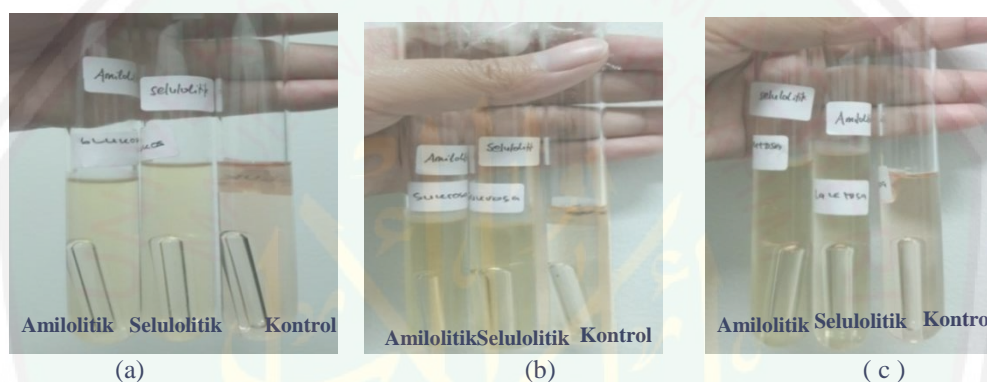


Gambar 4.8 Proses pembentukan endospora (Tortota, 2010)

Proses terbentuknya endospora tahap pertama bakteri membentuk filament aksial yang tidak berlangsung lama. Tahap kedua pembelahan sel asimetris yang menghasilkan sel induk. Tahap ketiga perkembangan spora-awal (forespore) yang tidak beraturan karena belum terbentuknya peptidoglikan. Pada tahap keempat dan kelima pembentukan korteks yang disebut juga pembentukan peptidoglikan spora-awal. Tahap terakhir adalah pematangan spora dan sel, spora akan terlepas dan terjadi lisis sel induk (Tortora, 2010).

4.3.3 Fermentasi Karbohidrat

Fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menfermentasi karbohidrat. Fermentasi karbohidrat menggunakan tiga jenis gula yaitu glukosa, sukrosa, dan laktosa. Karbohidrat yang dapat menfermentasi glukosa, sukrosa, dan laktosa akan menghasilkan asam yang berwarna kuning dan terjadi pembentukan gas dalam tabung durham.



Gambar 4.9 Uji fermentasi karbohidrat (a) glukosa (b) sukrosa (c) laktosa

Tabel 4.4 Hasil fermentasi karbohidrat

No	Fermentasi karbohidrat	Bakteri Amilolitik	Bakteri Selulolitik
1	Glukosa	Positif	Positif
2	Sukrosa	Positif	Positif
3	Laktosa	Positif	Positif

Keterangan : Positif = Dapat menfermentasi karbohidrat (Glukosa, sukrosa, laktosa)

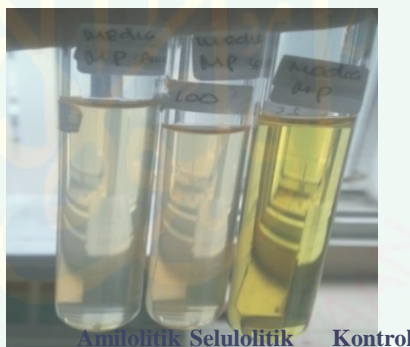
Negatif = Tidak dapat menfermentasi karbohidrat (Glukosa, sukrosa, laktosa)

Hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 4.9 diperoleh bakteri amilolitik dan selulolitik dapat menfermentasi karbohidrat jenis glukosa, sukrosa, dan laktosa. Hal ini ditunjukkan dengan perubahan warna dari merah menjadi kuning akan tetapi tidak menghasilkan gas. Hasil fermentasi karbohidrat bakteri amilolitik dan selulolitik pada jenis glukosa dapat langsung menfermentasi. Proses fermentasi glukosa ditunjukkan pada Lampiran 4. Pada sukrosa dan laktosa

dihidrolisis terlebih dahulu menjadi monosakarida. Mikroorganisme yang positif dapat menfermentasi glukosa, sukrosa dan laktosa menggunakan jenis karbohidrat tersebut sebagai sumber energi.

4.3.4 Uji MR (*Methyl red*)

Uji *methyl red* digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi asam campuran hasil metabolisme glukosa. Beberapa bakteri menghasilkan berbagai produk yang bersifat asam sehingga dapat menurunkan pH media pertumbuhan menjadi 5,0. Pada penambahan indikator pH *methyl red* dapat menunjukkan terdapat perubahan pH menjadi asam.



Gambar 4.10 Uji *methyl red*

Tabel 4.5 Uji *methyl red*

No	Jenis bakteri	Hasil
1	Bakteri amilolitik	Positif
2	Bakteri selulolitik	Positif

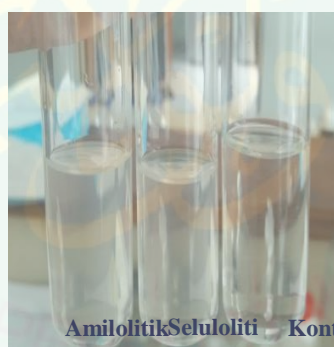
Keterangan : Positif = menghasilkan asam campuran
Negatif = tidak menghasilkan asam campuran

Bakteri amilolitik dan selulolitik dari fermentasi glukosa menghasilkan asam campuran (asam laktat, asam sitrat, dan asam asetat) ditandai dengan perubahan warna dari kuning menjadi merah (Gambar 4.10 dan Tabel 4.5). Perubahan warna

menjadi merah menunjukkan suasana asam sedangkan warna tetap kuning menunjukkan suasana basa (Cappucino dan Sherman, 2005). Fermentasi berawal dari glukosa yang dipecah menjadi senyawa asam melalui jalur glikolisis dengan menghasilkan asam piruvat. Asam piruvat akan diubah oleh bakteri menjadi asam organik (Winarno, 2000).

4.3.5 Uji VP (*Voges-proskeur*)

Uji VP digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi 2,3-butanadiol dari hasil fermentasi glukosa. Uji ini menentukan adanya asetoin yang merupakan senyawa awal dalam sintesis 2,3-butanadiol. Asetoin dapat ditunjukkan oleh perubahan warna menjadi lembayung (Lay, 1994).



Gambar 4.11 Uji Voges-proskeur

Tabel 4.6 Hasil uji voges-proskeur

No	Jenis bakteri	Hasil
1	Bakteri amilolitik	Positif
2	Bakteri selulolitik	Positif

Keterangan: Positif = Dapat menfermentasi karbohidrat menjadi 2,3-butanadiol
Negatif = Tidak dapat menfermentasi karbohidrat menjadi 2,3-butanadiol

Berdasarkan Gambar 4.11 dan Tabel 4.6, bakteri amilolitik dan selulolitik dapat menfermentasi karbohidrat menjadi 2,3-butanadiol yang ditandai dengan

perubahan warna dari bening menjadi lembayung. Penambahan KOH 40% dapat menentukan adanya asetoin suatu senyawa dalam sintesis 2,3-butanadiol (Cappucino dan Sherman, 2005).

4.3.6 Uji Motil

Uji motil bertujuan untuk menentukan pergerakan bakteri atau organisme yang berflagella. Uji ini menggunakan metode tusukan pada media semi padat agar yang bertujuan untuk mempersulit pergerakan bakteri. Hasil positif terlihat adanya penyebaran yang berwarna putih disekitar inokulasi yang menunjukkan bahwa bakteri ini memiliki flagella. Hasil negatif menunjukkan adanya pertumbuhan hanya pada garis inokulasi (Pattuju, 2014). Pada Gambar 4.12 dan Tabel 4.7 menunjukkan bahwa bakteri amilolitik dan selulolitik bersifat non motil karena tidak terdapat adanya pertumbuhan koloni bakteri yang menyebar. Organisme-organisme non motil hanya tumbuh pada garis inokulum.

Tabel 4.7 Hasil uji motil

No	Jenis bakteri	Hasil
1	Bakteri amilolitik	Negatif
2	Bakteri selulolitik	Negatif

Keterangan : Positif = bakteri yang berflagella
Negatif = bakteri yang tidak berflagella



(a)



(b)

Gambar 4.12 Uji motil bakteri (a) bakteri amilolitik (b) bakteri selulolitik

4.3.7 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu menghasilkan enzim katalase. Enzim katalase dapat memecah H_2O_2 yang terbentuk dari proses respirasi aerob dan bersifat racun terhadap bakteri menjadi H_2O dan O_2 . Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena dapat menginaktivasikan enzim dalam sel (Istiqomah, 2015).



Gambar 4.13 Uji katalase

Tabel 4.8 Hasil uji katalase

No	Jenis bakteri	Hasil
1	Bakteri amilolitik	Positif
2	Bakteri selulolitik	Positif

Keterangan : Positif = dapat menghasilkan enzim katalase

Negatif = tidak dapat menghasilkan enzim katalase

Berdasarkan Gambar 4.13 dan Tabel 4.8, bakteri amilolitik dan selulolitik dapat menghasilkan enzim katalase yang ditandai dengan adanya gelembung yang mengindikasikan terbentuknya gas O_2 . Bakteri ini mempunyai enzim superoksida dismutase yang memecah radikal bebas dan enzim katalase yang memecah H_2O_2

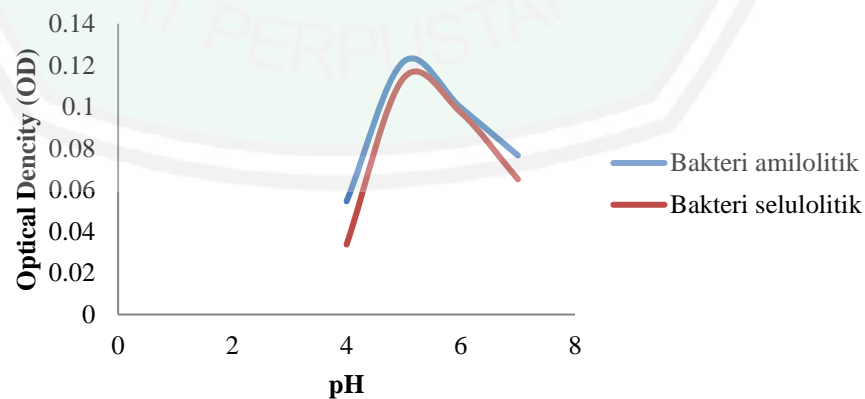
sehingga menghasilkan senyawa yang tidak beracun (Volk dan Wheeler, 1988).
Reaksi yang terjadi bakteri menghasilkan enzim dilihat pada Gambar 4.14.



Gambar 4.14 Reaksi uji katalase bakteri yang mengandung enzim katalase (Pelczar, 1998)

4.3.8 pH

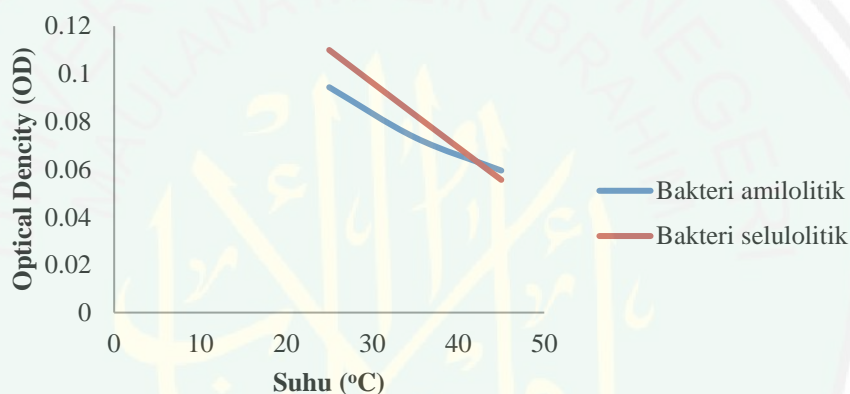
Untuk mengetahui pH optimum dalam bakteri dengan cara menghitung kuantitas sel bakteri pada kultur cair menggunakan nilai kekeruhan. Bakteri amilolitik dan selulolitik diuji menggunakan pH dengan variasi 4, 5, 6 dan 7. Nilai pH berpengaruh pada pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan isolat bakteri amilolitik dan selulolitik ditunjukkan pada Gambar 4.15 pH optimum terdapat pada pH 5. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri bersifat asam dan tidak mampu hidup dalam kondisi basa.



Gambar 4.15 Pertumbuhan pH optimum bakteri amilolitik dan bakteri selulolitik

4.3.9 Suhu

Suhu optimum bakteri ditentukan dengan cara menghitung kuantitas sel bakteri pada kultur cair menggunakan nilai kekeruhan. Bakteri amilolitik dan selulolitik diuji menggunakan suhu dengan variasi 25, 35 dan 45°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri tumbuh optimal pada suhu 25°C. yang ditunjukkan pada Gambar 4.16.



Gambar 4.16 Pertumbuhan suhu optimum bakteri amilolitik dan selulolitik

4.4 Identifikasi secara manual menggunakan buku pedoman *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* dan klasifikasi fenotip dengan program MVSP (*multivariate statistical package*)

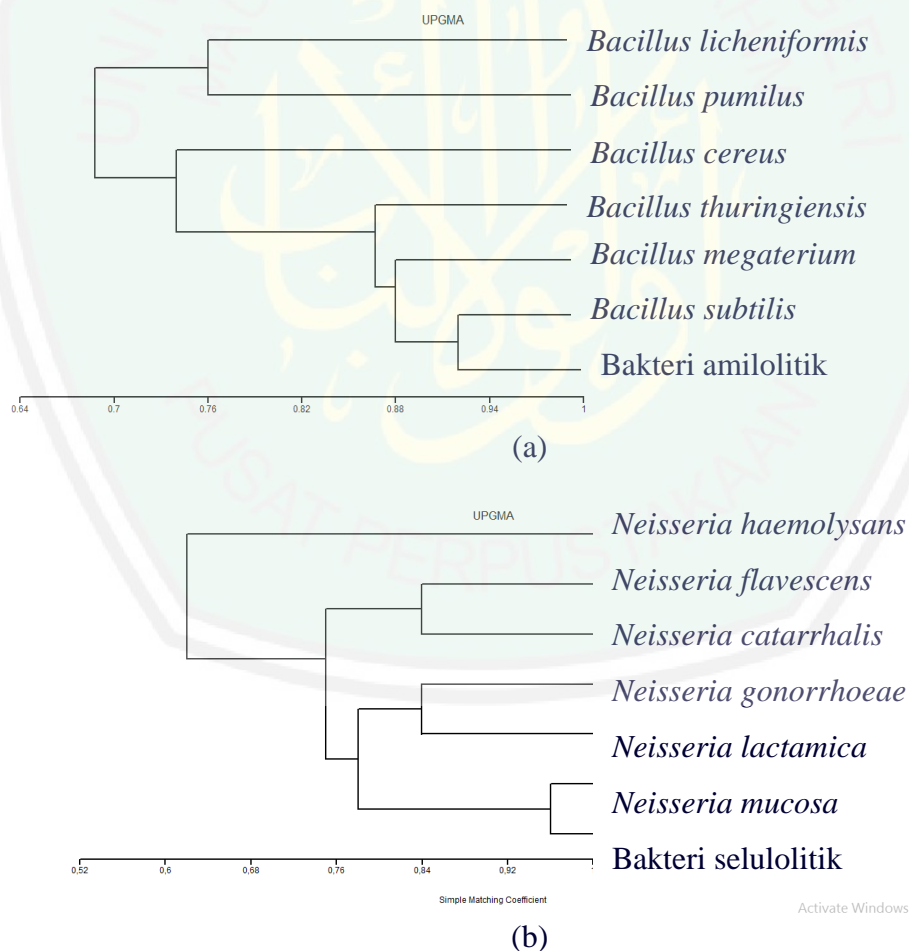
Bakteri amilolitik dan selulolitik diidentifikasi berdasarkan karakter pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Bakteri merupakan kelompok organisme yang beragam dan untuk memudahkan mempelajarinya dilakukan suatu pengelompokan atau pengklasifikasian. Metode klasifikasi fenotip dengan program MVSP (*multivariate statistical package*) bertujuan mengelompokkan bakteri ke dalam kelompok takson berdasarkan sejumlah data fenotip. Hasil *Bergey's manual of determinative* menunjukkan bahwa bakteri amilolitik yang

dalam penelitian ini memiliki kemiripan dengan *Bacillus subtilis*, sedangkan bakteri selulolitik mirip dengan *Neisseria mucosa*. Karakter fenotip dari *Bergey's manual of determinative* dan hasil dari penelitian selanjutnya disusun dalam matriks nxt. Hasil pengamatan morfologi koloni, sifat Gram dan uji biokimia ditunjukkan pada Tabel 4.9 dan karakter pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* pada Lampiran 5.1 dan 5.2.

Tabel.4.9 Uji fenotip hasil penelitian dengan *Bergey's Manual of Determinative*

Karakter	Bakteri Amilolitik	Bakteri selulolitik	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neiseria mucosa</i>
A. Morfologi koloni				
Bentuk koloni	Bulat	Bulat	+	+
Warna koloni	Krem	Krem	+	+
Elevasi	Datar	Datar	+	+
Tepian	Halus	Halus	+	+
B. Morfologi sel				
Bentuk sel	Bacil	coccus	+	-
Sifat gram	(+)	(-)	+	-
Endospora	(+)	(+)	+	+
C. Karakter biokimia				
Fermentasi Karbohidrat				
• Glukosa	(+)	(+)	+	+
• Sukrosa	(+)	(+)	+	+
• Laktosa	(+)	(+)	+	+
Urease	(-)	(-)	-	-
Katalase	(+)	(+)	+	+
Motil	(-)	(-)	+	-
Mp	(-)	(+)	-	-
Vp	(+)	(+)	+	+
D. Hidrolisis				
Pati	(+)	(-)	+	-
Selulosa	(-)	(+)	-	+
E. Uji Fisiologis				
Pertumbuhan pada pH:				
4	(+)	(+)	+	+
5	(+)	(+)	+	+
6	(+)	(+)	+	+
7	(+)	(+)	+	+
8	(+)	(+)	+	+
Pertumbuhan pada suhu:				
25°C	(+)	(+)	+	+
35°C	(+)	(+)	+	+
45°C	(+)	(+)	+	+

Berdasarkan data dari uji fenotip dilakukan perhitungan nilai similaritas antar isolat. Analisis data menghasilkan matriks similaritas yang menunjukkan besarnya karakter yang dimiliki oleh suatu strain dengan dibandingkan dengan strain lain (Darmawati, 2011). Berdasarkan nilai matriks similaritas tersebut dilakukan konstruksi dendrogram dengan menggunakan algoritma UPGMA yang ditunjukkan pada Gambar 4.17. Dendrogram merupakan pohon yang mengekspresikan hubungan fenotip suatu spesies dengan spesies lain dengan membandingkan ciri morfologi yang dimiliki spesies.



Gambar 4.17 Dendrogram yang menunjukkan hubungan antar bakteri dengan type strain berdasarkan indeks similaritas menggunakan cara *Simple Matching Coefficient* (a) bakteri amilolitik (b) bakteri selulolitik

Tabel 4.10 Matriks similaritas *Simple matching coefficient* bakteri amilolitik

	Bakteri	Similaritas
1	<i>Bacillus subtilis</i>	92%
2	<i>Bacillus megaterium</i>	88%
3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	84%
4	<i>Bacillus cereus</i>	80%
5	<i>Bacillus pumilis</i>	76%
6	<i>Bacillus licheniformis</i>	68%

Tabel 4.11 Matriks similaritas *Simple matching coefficient* bakteri selulolitik

	Bakteri	Similaritas
1	<i>Neisseria mucosa</i>	96%
2	<i>Neisseria lactamica</i>	84%
3	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	76%
4	<i>Neisseria catarrhalis</i>	76%
5	<i>Neisseria flavescens</i>	72%
6	<i>Neisseria haemolysans</i>	68%

Dendogram yang menunjukkan hubungan antara bakteri dengan type strain berdasarkan indeks similaritas menggunakan cara *Simple Matching Coefficient*. *Simple Matching Coefficient* menunjukkan strain yang memiliki kemiripan semakin besar kesamaan yang dimiliki suatu strain maka semakin dekat hubungan kekerabatannya. Berdasarkan Tabel 4.11 dan 4.12 bahwa isolat bakteri amilolitik dan *Bacillus subtilis* memiliki kemiripan 92%, isolat bakteri selulolitik dan *Neisseria mucosa* memiliki indeks similaritas sebesar 96%.

4.5 Identifikasi jenis bakteri dalam bekatul menurut pandangan Islam

Didalam Al-Qur'an Allah SWT menjelaskan bagaimana proses dapat menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji-bijian dalam surat Al-An'am ayat 95. Firman Allah *فالق الحب والنوى* "Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji-bijian. Ditafsirkan dengan firmanNya *ومخرج الميت من الحييخرج الحي من الميت* "Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang

hidup. Menurut pendapat beberapa ulama hanya Allah yang dapat menciptakan keadaan ini mengubah atom-atom mati menjadi sel-sel yang hidup dan mengubah sel-sel hidup menjadi atom-atom mati. Semuanya itu mempunyai hukum sebab dan akibat yang telah ditentukan oleh Allah SWT tidak ada orang yang mengetahuinya kapan terjadi dan bagaimana bisa terjadi. Allah SWT menciptakan segala sesuatu dengan rancangan dan fungsi yang tepat, tidak ada satupun didunia ini yang diciptakan tanpa manfaat.

Bekatul merupakan hasil samping proses penggilingan padi berasal dari lapisan terluar beras yaitu bagian antara butir beras dan kulit padi. Bekatul ini sebelumnya menempel pada padi yang bisa tumbuh hidup, akan tetapi setelah terjadi proses pemisahan bekatul tidak dapat berfungsi dan dapat dikatakan zat yang sudah mati. Bekatul ini merupakan zat yang sudah mati akan tetapi dalam bekatul mengandung zat kimia yang berpotensi bagi berlangsungnya kehidupan bakteri. Zat yang mati itu terdapat sel bakteri yang hidup dan memiliki berbagai manfaat bagi kehidupan manusia. Kapanpun Allah SWT mengeluarkan kehidupan dari sesuatu yang mati dan mengeluarkan kematian dari sesuatu yang hidup. Siklus yang terjadi merupakan secara berulang-ulang dapat terjadi hanya pada makhluk yang dititipi rahasia kehidupan oleh Allah. Semua itu tidak dapat dikendalikan oleh manusia atau terjadi secara kebetulan tanpa perencanaannya.

Makhluk hidup yang diciptakan oleh Allah SWT mempunyai bermacam-macam ukuran dan bentuk. Begitu halnya dengan bakteri yang mempunyai bentuk dan ukuran yang beragam. Keanekaragaman jenis bakteri juga diikuti dengan manfaatnya bagi kehidupan manusia, seperti bakteri amilolitik dan selulolitik sebagai penghasil enzim banyak digunakan dalam bidang industri sebagai

pengental dan pelapis makanan, industri tekstil untuk pelunakan katun dan denim, industri kertas untuk perbaikan dan modifikasi kertas. Untuk menentukan peran bakteri yang menguntungkan adalah melalui proses identifikasi bakteri. Identifikasi bakteri didasarkan pada berbagai macam sifat bakteri seperti sifat biokimia, morfologi koloni dan morfologi selnya. Setiap bakteri memiliki manfaat yang berbeda-beda tergantung jenis bakteri. Allah menyediakan semua itu untuk kesenangan manusia. Hal ini menunjukkan betapa makhluk ciptaan Allah selalu mempunyai manfaat, walau sekecil dan sehinia apapun makhluk tersebut. Allah Swt. menjelaskan kekuasaanNya dalam menciptakan berbagai macam hal yang bertentangan lagi berbeda-beda, semuanya itu menunjukkan kebesaran, kesempurnaan dan kekuasaan yang dimilikiNya

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil identifikasi fenotip bakteri amilolitik dan selulolitik berdasarkan karakter morfologi sel, biokimiawi dan fisiologis yang dianalisis menggunakan metode *profile matching* yang mengacu pada *Bergey's Manual Determinative Bacteriology* menunjukkan bahwa bakteri amilolitik termasuk dalam *Bacillus subtilis* sedangkan bakteri selulolitik termasuk *Neiseria mucosa*. Dianalisis menggunakan statistika MVSP (*multivariate statistical package*) *Bacillus subtilis* memiliki kemiripan 92%, dan bakteri selulolitik dan *Neiseria mucosa* memiliki indeks similaritas sebesar 96%.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya dilakukan identifikasi secara molecular dengan metode sekuen gen 16S rRNA untuk mengetahui secara akurat spesies dari bakteri amilolitik dan selulolitik. Identifikasi secara molekuler memiliki beberapa tahapan yaitu isolasi DNA, amplifikasi DNA, sikuensing DNA, dan analisis bioinformatika.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiyer, P. (2005). Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*, 4(13): 1525-1529.
- Apriani, K., Haryani, Y., Kartika, G. (2014). Produksi dan uji aktivitas amilase dari isolat bakteri amilase sungai Indragari. *Jurnal Online Mahasiswa FMIPA*. 1(2): 261-267.
- Ardiansyah. (2008). Proses ekstrusi untuk pengolahan hasil samping penggilingan padi (menir dan bekatul). *Prosiding Seminar Teknologi Pangan IPB*, 567-585.
- Ari, W., dan Subagiyo. (2012). Isolasi dan seleksi bakteri penghasil enzim ekstraseluler (proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik) yang berasal dari sedimen kawasan Mangrove. *Ilmu Kelautan*, 7: 164-168.
- Asadullah, M. (2014). Isolasi bakteri amilolitik dari bekatul dan uji kemampuan untuk produksi enzim amilase kasar pada berbagai jenis media produksi. *Skripsi*. Malang: UIN Maliki Malang.
- Astawan, M. (2009). *Bekatul gizinya kaya betul*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Apun, K., Jong, B.C., dan Salleh, M.D. (2000). Screening and isolation of a cellulolytic and amylolytic *Bacillus* from sago pith waste. *Journal of General and Applied Microbiology*, 46 : 263-267.
- Bansode, S. D. (2010). Screening of nutritional components for amylase production in submerged fermentation by bacteria isolated from soil using plackett-burman design. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(1): 93-98.
- Bernazzani, P., Pandi, H.K., dan Peyyavula, V.K. (2008). Structural changes associated with interaction between starch and oarticles of TiO₂ or ZnSe. *Journal of Chemistry, Biochemistry and Molecular Biology*, 2(1): 1-13.
- Bergeys, D.H., dan Boone, D.R. (1984). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. New York . Springer Scince-Business Media.
- Brooks, G.F, Butel J.S, Morse S.A. (2008). *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan mikrobiologi FK Unair. Jakarta. Salemba medika.
- Cappucino, J.G., dan Sherman, N. (2005). *Microbiology : A Laboratory manual*. California. Bejamin/Cummings Science Publishing.
- Cherry, J., dan Findats. (2003). Proggess and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances Biochemical Engineering*, 108: 95-120.

- Choi, Y.W., Hodgkiss, I.J., dan Hyde, K.D. (2005). Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal Agricultural Technology*, 29: 55-66.
- Coughlan, M.P., dan Hazlewood. G.P. (2001). β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology, and applications. *Journal Biotechnology Applied Biochem*, 17: 259-289.
- Darmawati, S., Sembiring, L., dan Asmara, W. (2011). Klasifikasi numerik-fenetik *Salmonella typhi* asal Jawa Tengah dan Daerah Istimewa Yogyakarta berdasarkan hasil karakterisasi fenotipik. *Jurnal Biota*, 16(1): 128-132.
- De Souza, P.M., dan Magalhaes, P.D.O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry. *Brazilian Journal Microbiology*, 41: 850-861.
- Dwidjoseputro, D. (1994). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta. Djambatan.
- Eliasson, A. C. (2004). *Strach in food : structure, function, and application*. England. Woodhead Publishing Limited.
- Ernawati. (2010). Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat pada susu kambing segar. *Skripsi*. Malang: UIN Maliki Malang.
- Fardiaz, S. (1992). *Mikrobiologi Dasar 1*. Jakarta. PT Gramedia.
- Fitrah, I. D., Darmawi, dan Rasmaidar. (2013). Isolasi *Pasteurella multocida* pada kuda dan sensitivitasnya terhadap antibiotik. *Jurnal Medika Veterinaria*, 7: 121-125.
- Fitriani, E. (2003). Aktivitas enzim karboksimetil selulase *Bacillus pumilus* galur 55 pada berbagai suhu inkubasi. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Gonzales, J.M., dan Saiz, J. (2001). A simple method for the estimation of DNA relatedness between closely related microorganism by thermal denaturation Temperature. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 9: 75-79.
- Hastuti, U.S., Yakub, P., dan Khasanah, H.N. (2014). Biodiversity of indigenous amyolytic and cellulolytic bacteria in sago waste product at susupu, North Moluccas. *Journal of Life Sciences*, 8: 920-940.
- Hadioetomo, R.S. (1993). *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta. PT Gramedia pustaka utama.
- Hadiotomo, (2001). Identifikasi bakteri dari tinja pasien diare di rumah sakit islam Klaten. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

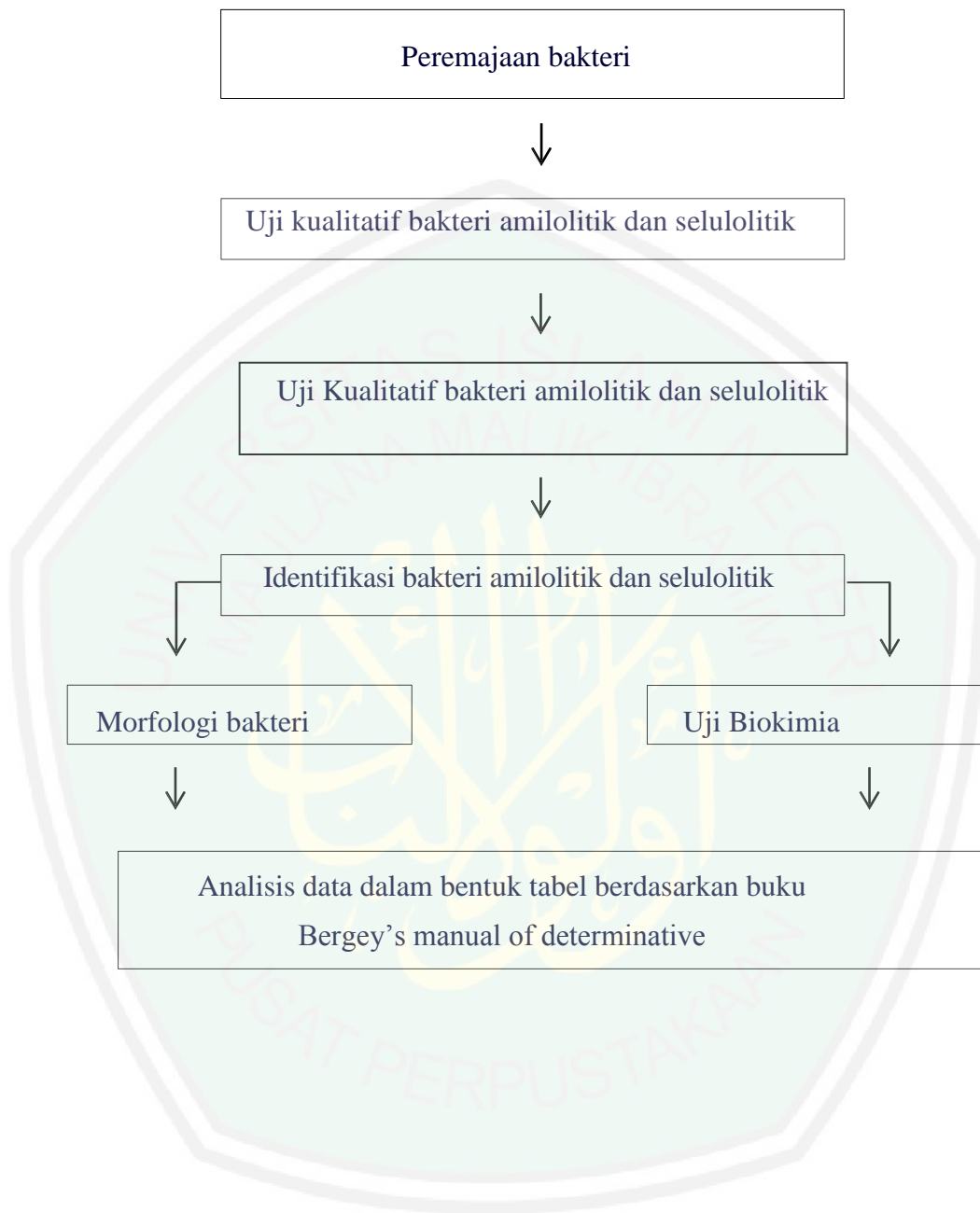
- Hermanianto, J., Nurmata, B., Hariyadi, P., Widowati, S., dan Sukarno, L. (2001). Proses ekstruksi untuk pengolahan dan pengawetan hasil samping industri penggilingan padi. *Prosiding Seminar Teknologi Pangan*, 9: 567-582.
- Ibrahim, A.S.S., dan El-diwany, A.I. (2007). Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Journal Applied Science*, 1: 473-478.
- Irawati, T. (2005). Bioremediasi tanah terkontaminasi minyak bumi dengan menggunakan *Bacillus popillia*. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Istiqomah, L. (2015). Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat penghasil fitase dari saluran pencernaan unggas serta karakterisasi fitasnya. *Tesis*. Yogyakarta: Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada.
- Jennifer, V., dan Thiruneelakandan, G. (2015). Enzymatic activity of marine *Lactobacillus* species from south east coast of India. *International Journal of Innovative Science*, 2(1): 542-546.
- Katsir, I. (2000). *Tafsir Ibnu Katsir*. Bandung. Sinar baru algensindo.
- Kaur, A., Kaur, M., Samyal, M. L., dan Ahmed, Z. (2012). Isolation, characterization and identification of bacterial strain producing amylase. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(4): 573-579.
- Kombong, H. (2004). Evaluasi daya hidrolitik enzim glukoamilase dari filtrat kultur *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Dasar*, 5: 16-20.
- Kuriyan, R., Gopinath, N., Vaz, M., dan Kurpad, A. V. (2005). Use of rice brand oil in patients with hyperlipidaemia. *National Medical Journal of India*, 18(6): 292-296.
- Kusmiati dan Agustini, N.W.S. (2010). Pemanfaatan limbah onggok untuk produksi asam sitrat dengan penambahan mineral Fe dan Mg pada substrat menggunakan kapang *Trichoderma* sp. dan *Aspergillus niger*. *Seminar Nasional Biologi*, 856-866.
- Laila, A., Fetra, A., Hendri, J., dan Suka, G. (2007). Peningkatan stabilitas enzim amilase melalui amobilisasi pada polimer kitosan. *Journal Sains MIPA*, 13(2): 119-126.
- Lokhande, S. dan Musaddiq M. (2005). Isolation of cellulolytic bacterial strain for bioconversion of municipal solid waste. *International Journal of Applied Research*, 1(11): 902-905.
- Lay, B. W. (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta. PT Raja grafindo persada.
- Maraghi, A.M. (1992). *Tafsir Al-Maraghi*. Semarang: CV.Toha Putra

- Maranatha, B. (2008). Aktivitas enzim selulase isolat asal Indonesia pada berbagai substrat limbah pertanian. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Mazeau, K., dan Wyszomirski, M. (2012). Modelling of congo red adsorption on the hydrophobic surface of cellulose using molecular dynamics. *Original Paper*, 19:1495–1506. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9757-6>.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalisilyc acid reagent for determination of reducing sugar. *Journal Analytical Cheistry*, 31: 426-428.
- Mottiar, Y., dan Altosaar, I. (2011). Iodine sequestration by amylase to combat iodine deficiency disorders. *Journal Food Science and Technology*, 22: 335-340.
- Nangin, D., dan Sutrisno, A. (2015). Enzim amilase pemecah pati mentah dari mikroba. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(3): 1032–1039.
- Neliyani, N. (2014). Identifikasi dan karakteristik *Staphylococcus sp.* dan *Streptococcus sp.* dari infeksi ovarium pada ayam petelur komersial. *Jurnal Ilmu Ternak*, 1(7): 32–37.
- Nelson, D.L., dan Cox, M.M. (2005). *Principles of Biochemistry*. Ed ke-4. New York: Worth Publisher.
- Nurchayanti, Agustina. D.R., Lusiawati, D., dan Kris H.T (2011). Aktivitas antioksidan dan antibakteri ekstrak polar dan non polar biji selasih. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 9: 1-6.
- Norman, S.J., Edward, S.A., Boris, E.V., Yuri, K.N., Larisa, V.I., dan Vladimir, P.V.(2005). *Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control campylobacter jejuni in Chickens. *Journal of Food Protection*, (7): 1450-1453
- Oktavia, F. I., Argo, B. D., Lutfi, M., (2014). Hidrolisis enzimatik ampas tebu (*Bagasse*) memanfaatkan enzim selulase dari mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* sebagai katalisator dengan pretreatment microwave enzymatic hydrolysis of bagasse. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*, 2(3): 256–262.
- Owalabi, O.O., Kolawole, B.M., Olusanjo, A.I., dan Olaoluwa, O. (2014). Molecular identification and amylolytic potential of a thermophilic bacteria species from refuse dump in Ile-Ife Nigeria. *International Journal of Biological Research*, 2(2): 134–139.

- Pakpahan, Rahel A., Khotimah, S., dan Masnur. (2013). Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (Molasses) of sugar Industry. *International Journal Bioscience*, 6(3): 230-238.
- Pattuju, S. M., Fatimawali, dan Menampiring, A. (2014). Identifikasi bakteri resisten merkuri pada urine, feses dan kalkulus gigi pada individu di kecamatan Malang raya, Manado, Sulawesi utara. *Jurnal e-Biomedik*, 2: 532-540.
- Perez, J., Munoz Dorado, J., Rubia, T., dan Martinez. J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: overview. *International Microbiology*, 5: 53-63.
- Pelczar, A.D dan Clark, E.R.(1998). *Dasar-Dasar Mikrobiologi 2*. Jakarta. Angka Penerbit Universitas Indonesia.
- Poedjiadi, A. (2006). *Dasar-Dasar Biokimia*. Edisi Revisi. Jakarta. Universitas Indonesia.
- Poernomo, A. T., dan Purwanto, D. A. (2003). Uji aktifitas crude enzim proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 hasil fermentasi curah. *Jurnal Farmasi Airlangga*, 3: 103-107.
- Prameswari, T., Budi, E., dan Tri, A. (2014). Sintesis membran kitosan-silika abu sekam padi untuk dekolorisasi zat warna congo red. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 3: 50-57.
- Pratita, M. Y., dan Putra, S. R. (2012). Isolasi dan identifikasi bakteri termofilik dari sumber mata air panas di songgoriti setelah dua hari inkubasi. *Jurnal Teknik Pomits*, 1: 1-5.
- Purwoko, Tjahjadi. (2007). *Fisiologi Mikroba*. Jakarta. Bumi aksara.
- Quthb, S. (2002). *Tafsir Fi Zhilal Al-Qur'an dibawah naungan Al-Qur'an jilid 30, terj, As'ad Yasin*. Jakarta. Gema insani.
- Rahayu, A. G., Puspita, F., Haryani, Y. (2014). Uji aktivitas selulolitik dari tiga isolat bakteri *Bacillus sp.* galur lokal Riau. *Journal online mahasiswa FMIPA*, 2(2): 319-327.
- Rahmansyah, M., dan Sudiana, M. (2003). Optimasi analisis amilase dan glukonase yang diekstrak dari *Miselim Pleurotus ostreatus* dengan Asam 3,5 Dinitrosalisilat. *Journal Biological Researches*, 9: 7-12.
- Rachman, A. (1989). *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Bogor. Institut Pertanian Bogor.

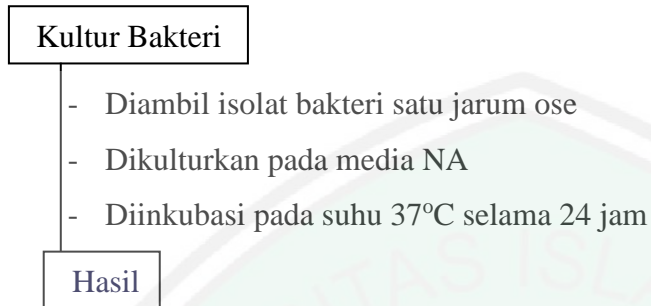
- Retnaningtyas, E., Retno, S., Sudibyso, dan Jenie U.A. (2004). Pemanfaatan bekatul untuk meningkatkan produksi eritromisin dari biakan *Saccaromyces erythraea* ATCC 11635. *Journal Sains dan Sibernatika*, 17(3): 343-361.
- Rohman, M. (2013). Kajian kandungan pati, amilosa dan amilopektin tepung dan pati pada beberapa kultivar pisang (*Musa sp*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, 223–227.
- Rosyada, N. (2015). Isolasi bakteri asam laktat dengan aktivitas selulolitik pada saluran pencernaan mentok (*Cairina moschata*). *Skripsi*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Sari, N., Wahyudi, P., dan Rachmania, R.S. (2011). Isolasi, karakterisasi, dan identifikasi molekuler bakteri amilolitik umbi singkong. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 9(1): 795-799.
- Sariani, N., Litaay, M., Budji, R., dan Priosambodo, D. (2015). Potensi tunika *Rhopaleaea sp* sebagai sumber inokulum bakteri endosimbion penghasil antibakteri. *Jurnal Alam Dan Lingkungan*, 6: 47-66.
- Shabuni, M.A. (2000). Shafiwah al-Tafsir: Tafsir li al-Quran al-karim. Dar al-kutub al-islamiyyah: Jakarta. PT Karya toha putra.
- Sembiring, L. (2002). Identifikasi bakteri batang Gram negatif pada darah widal positif berdasarkan karakter fenotipik. *Journal University Research Colloquium*, 3(1): 89-96.
- Shaikh, N. M., Pantel, A.A., Mehta, S.A., dan Pantel, N.D. (2013). Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. *Journal of Environmental Research and Technology*, 3(1): 39–49.
- Singh, S., Moholkar, V.S., dan Goyal, A. (2013). Isolation, identification, and characterization of a cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain SS35 from Rhinoceros dung. *International Scholarly Research Notice Microbiology*, 7(1): 72-81.
- Somogyi, M. (1952). Determination of Reducing Sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 6: 200-245.
- Sudiana, I.M., Kanti, A., Rahmansyah, M., Widawati, S., Suliasih, Rahayu R.W., dan Imanuddin, H. (2002). Populasi dan karakterisasi bakteri selulolitik yang diisolasi berbagai ketinggian lokasi di taman nasional gunung Halimun. *Laporan Teknik Proyek Inventarisasi dan Karakterisasi Sumberdaya hayati*. Indonesia. Pusat penelitian biologi-LIPI.
- Supriyatna, A., Rohimah, I., Suryani, Y., dan Sa'adah, S. (2012). Isolation and identification of cellulolytic bacteria from waste organic vegetables and fruits for role in making materials biogas, (12), 10–20.

- Swastika, N.D. (2009). Stabilisasi tepung bekatul melalui metode pengukusan dan pengeringsan RAK serta pendugaan umur simpannya. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Taherzadeh, M.J., dan Karimi, K. (2007). Acid-based hydrolysis processes for Ethanol From Lignocellulosic Materials. *Journal Bioresources*, 2(4): 707-738.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., dan Case, C. L., (2010). *Microbiology an introduction* . San Francisco. Publishing as Pearson Benjamins Cummings.
- Waluyo, L. (2004). *Mikrobiologi Umum*. Malang. Universitas Muhammadiyah Malang
- Winarno, F.G. (2000). *Kimia Pangan Dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia pustaka utama.
- Volk, W.A., dan Wheeler, M.F. (1988). *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Erlangga.
- Yusra, Azima, F., Novelina, Periadnadi. Isolasi dan identifikasi mikroflora indigenous dalam budu. *AGRITECH*, 34(2): 316-121
- Zahidah, D., Shovitri, M., dan Domestik, A.L. (2013). Isolasi, karakterisasi dan potensi bakteri aerob. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 2(1): 12–15.
- Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., Mielenz J.R. (2006) Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24:452-481.

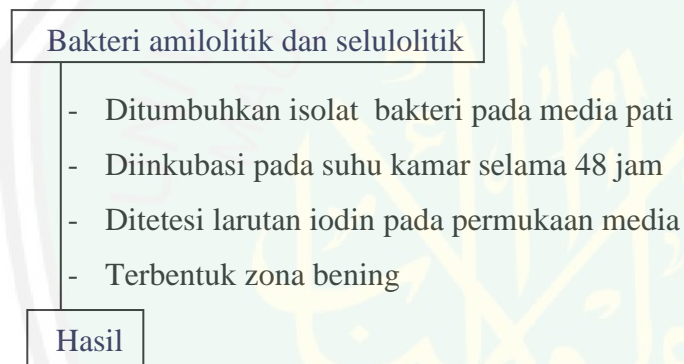
Lampiran 1. Rancangan Penelitian

Lampiran 2. Diagram alir

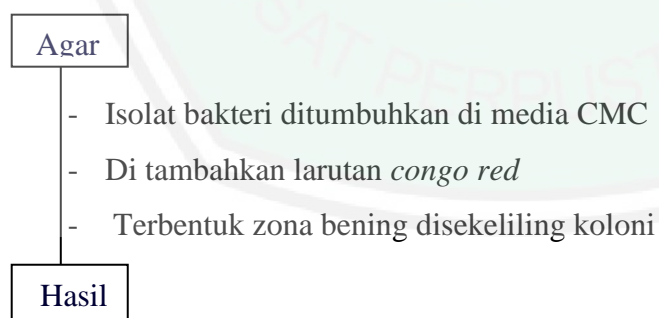
a. Peremajaan Bakteri



b. Uji kualitatif Bakteri Amilolitik



c. Uji kualitatif bakteri selulolitik



d. Kurva standar glukosa**Larutan glukosa**

- Disiapkan 7 tabung reaksi, masing-masing diisi dengan larutan glukosa dengan konsentrasi 25, 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm
- Diambil 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan 1 mL reagen DNS
- Di tutup mulut tabung dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat.
- Ditambahkan 1 mL larutan KNa-Tartrat 40%.
- Ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Hasil**e. Ekstraksi enzim****Bakteri**

- Diambil 1 ose bakteri dan masukkan ke dalam 25 mL media cair.
- Kultur bakteri diinkubasi pada shaker inkubator selama 18 jam pada suhu 37°C.
- Kultur disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit.
- Diperoleh filtrat ekstrak kasar enzim.

Hasil

f. Uji aktivitas enzim amilase**Ekstrak kasar enzim**

- Dimasukkan ekstrak kasar enzim sebanyak 1 mL dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL pati terlarut (telah dilarutkan dalam buffer fosfat)
- Ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.
- Ditambahkan 1 mL reagen DNS dan kocok menggunakan vortex
- Dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat.
- Ditambahkan 1 mL larutan KNa-Tartrat 40%.
- Ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Hasil**g. Uji aktivitas enzim selulase****Ekstrak kasar enzim**

- Dimasukkan ekstrak kasar enzim sebanyak 1 mL dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL substrat (1% selulosa CMC)
- ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.
- Ditambahkan 1 mL reagen DNS dan kocok menggunakan vortex
- Dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat.
- .Ditambahkan 1 mL larutan KNa Tartrat 40%.
- Ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm

Hasil

h. Pewarnaan Gram

Bakteri

- Diambil satu jarum ose bakteri dan disuspensikan dengan akuades diatas preparat lalu difiksasi diatas api bunsen sampai kering
- Preparat ditetesi kristal violet, dibiarkan selama 1 menit setelah itu dicuci dengan air mengalir
- Ditambahkan larutan iodin sebanyak satu tetes, didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan
- Preparat dibilas dengan alkohol 96% sampai semua zat warna luntur
- Ditetaskan safranin sebanyak 1 tetes selama 30 detik lalu dicuci dengan air mengalir
- Diamati dibawah mikroskop

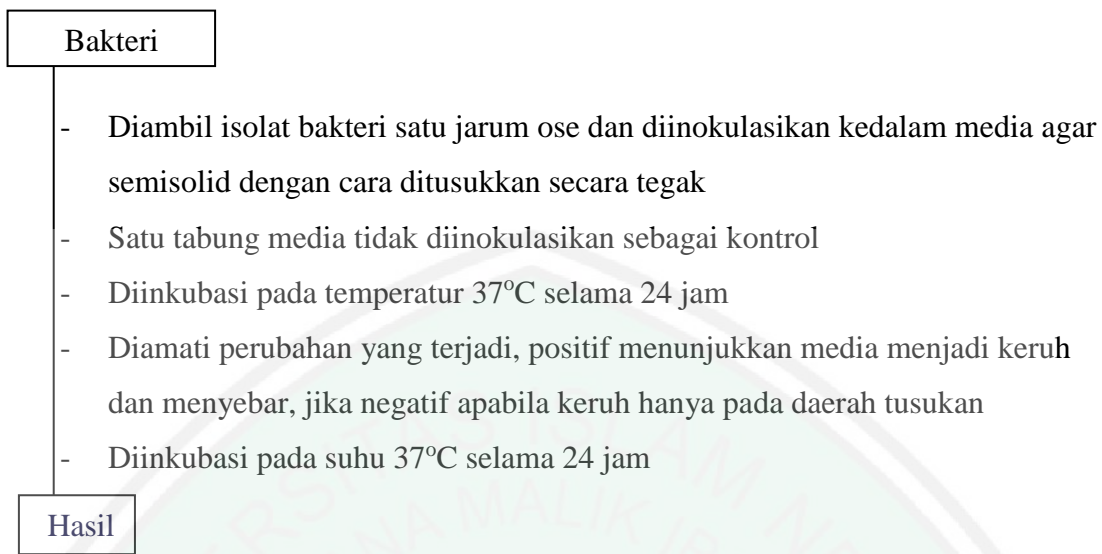
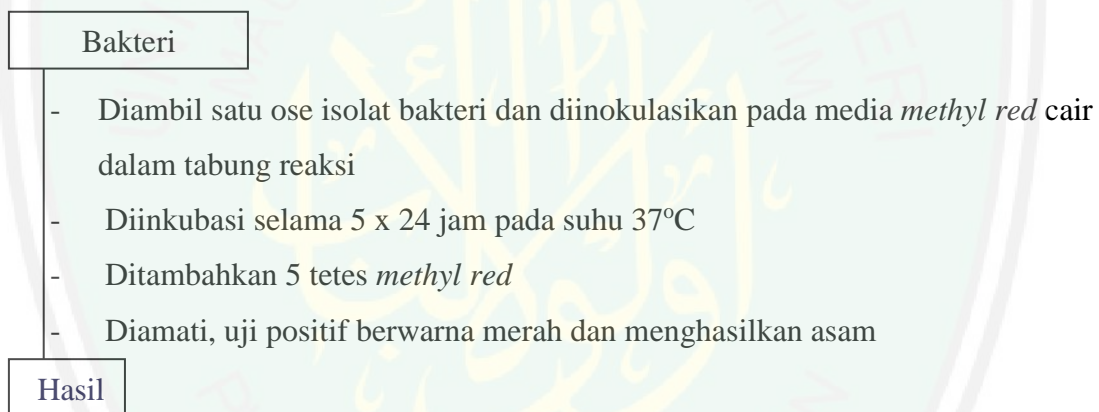
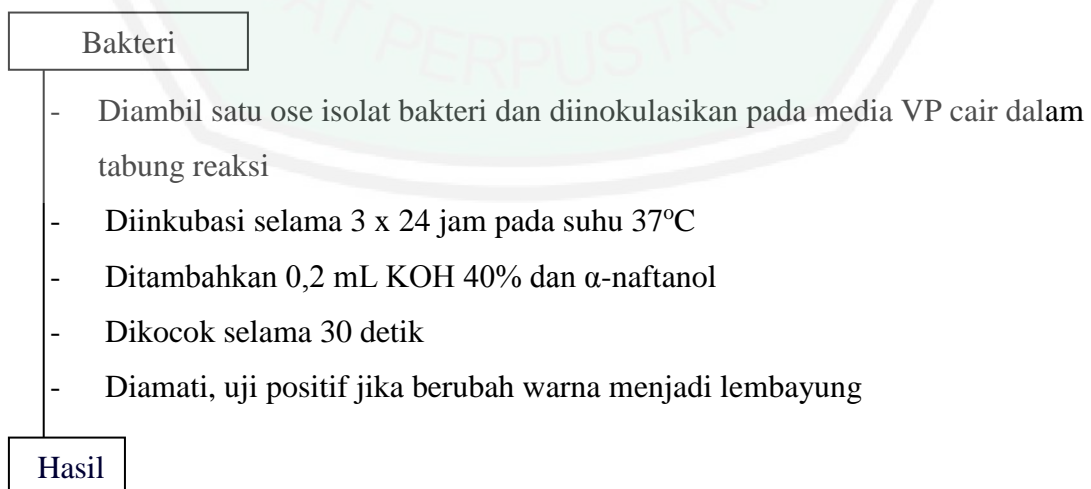
Hasil

i. Pewarnaan Endospora

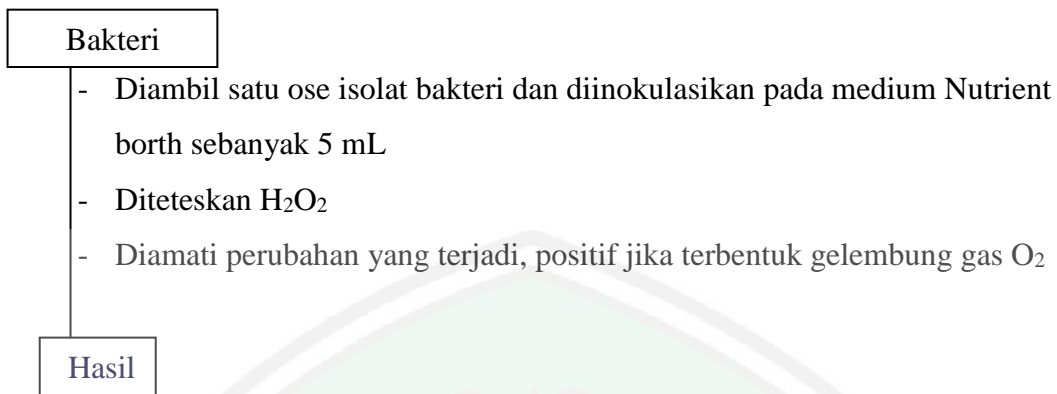
Bakteri

- Diambil satu jarum ose bakteri dan disuspensikan dengan akuades yang ada digelas obyek
- Preparat difiksasi diatas Bunsen
- Ditetesi *malachite green*, dibiarkan selama 10 menit diatas penangas air
- Diangkat dan dibiarkan dingin selanjutnya dibilas dengan air mengalir
- Ditambahkan safranin sebanyak satu tetes kemudian dicuci menggunakan air mengalir
- Diamati dengan mikroskop, positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau

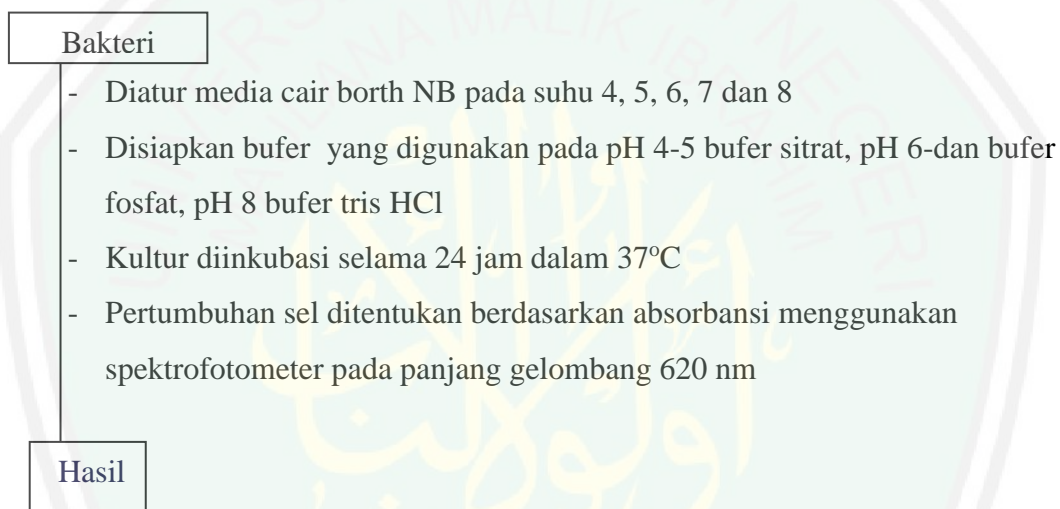
Hasil

i. Uji motil**j. Uji Methyl red****k. Uji Voges-Proskauer**

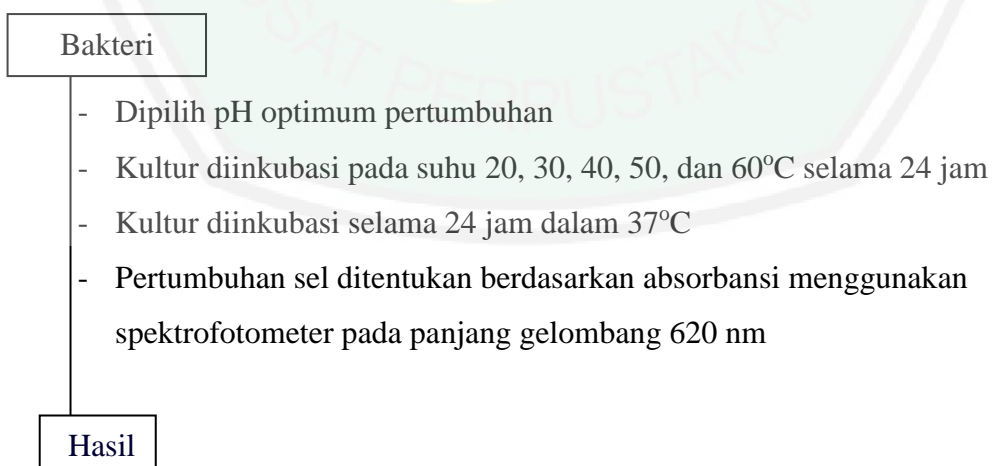
I. Uji Katalase



m. pH



n. Suhu



Lampiran 3. Pembuatan media dan reagen

1. Pembuatan Media CMC Agar dan Broth (Rosyada, 2015)

Media CMC agar dan broth ditimbang dengan komposisi yaitu 1 g CMC; 0,02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,075 g KNO_3 ; 0,05 g K_2HPO_4 ; 0,002 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,004 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,2 g ekstrak khamir, 1,5 g agar-agar bakto dan 0,1 g glukosa. Aquades sebanyak 100 mL ditambahkan dan dipanaskan sampai mendidih di atas *hot plate* kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Media disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media CMC Broth komposisi media sama dengan media CMC Agar tanpa penambahan agar-agar bakto.

2. Pembuatan Media Pati Agar dan Broth (Rosyada, 2015)

Media pati agar dan broth ditimbang dengan komposisi yaitu 0,2 g yeast ekstrak; 0,5 g pepton; 0,05 NaCl; 0,05 g MgSO_4 ; 0,015 g CaCl_2 ; 2 g agar-agar bakto dan 1 g soluble starch. Aquades sebanyak 100 mL ditambahkan dan dipanaskan sampai mendidih di atas *hot plate* kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Media disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media Pati Broth komposisi media sama dengan media pati Agar tanpa penambahan agar-agar bakto.

3. Pembuatan Media Fermentasi karbohidrat (Rosyada, 2015)

Media fermentasi karbohidrat ditimbang dengan komposisi yaitu 0,25 g karbohidrat (glukosa, sukrosa, dan laktosa); 0,65 g Nutrient broth; 2 tetes indikator *phenol red*. Aquades sebanyak 50 mL ditambahkan dan dipanaskan

sampai mendidih di atas *hot plate* kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Media disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121⁰C selama 30 menit.

4. Pembuatan Media Voges-Proskauer (Rosyada, 2015)

Media Voges-Proskauer ditimbang dengan komposisi yaitu 0,025 g glukosa; 0,025 K₂HPO₄; 0,025 g pepton. Aquades sebanyak 50 mL ditambahkan dan dipanaskan sampai mendidih di atas *hot plate* kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Media disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121⁰C selama 30 menit.

5. Pembuatan Media Methyl red (Rosyada, 2015)

Media *methyl red* ditimbang dengan komposisi yaitu 0,025 g glukosa; 0,025 K₂HPO₄; 0,025 g pepton. Aquades sebanyak 50 mL ditambahkan dan dipanaskan sampai mendidih di atas *hot plate* kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Media disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121⁰C selama 30 menit.

6. Pembuatan Media Motil (Rosyada, 2015)

Media motil ditimbang dengan komposisi yaitu 0,25 g NaCl; 0,15 beef ekstrak; 0,5 g pepton; 0,2 g agar; 4 g gelatin. Aquades sebanyak 50 mL ditambahkan dan dipanaskan sampai mendidih di atas *hot plate* kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Media disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121⁰C selama 30 menit.

7. Pembuatan media semisolid agar

Media semisolid agar ditimbang dengan komposisi yaitu 0,5 g pepton, 0,15 g meat ekstrak, 0,25 g NaCl, 0,20 g agar, 4 g gelatin. Aquades 50 mL ditambahkan dipanaskan sampai mendidih di atas *hot plate* kemudian

dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Media disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan selama 30 menit.

8. Pembuatan Reagen DNS

Reagen DNS ditimbang asam 3,5-*Dinitrosalicylic acid* sebanyak 1 g; 0,2 g fenol; 0,05 g sodium sulfid dan 1 g natrium hidroksida. Bahan dilarutkan dengan aquades dalam labu takar 100 mL.

9. Pembuatan Reagen KNa-Tartrat 40% (Miller, 1959)

KNa-Tartrat ditimbang sebanyak 20 g kemudian dilarutkan dengan aquades 50 mL dalam erlenmeyer 250 mL. Simpan dalam botol berwarna gelap.

10. Pembuatan Buffer Sitrat (Gomori, 2004)

Buffer sitrat dibuat larutan A (2,1 g asam sitrat dalam 100 mL aquades) dan larutan B (2,1 g sodium sitrat dalam 100 mL aquades). pH 4 dibutuhkan larutan A sebanyak 33 mL dan larutan B sebanyak 17 mL ditambahkan aquades sampai 100 mL. pH 5 dibutuhkan larutan A sebanyak 20,5 mL dan larutan B sebanyak 29,5 mL ditambahkan aquades sampai 100 mL. pH 6 dibutuhkan larutan A sebanyak 9,5 mL dan larutan B sebanyak 41,5 mL ditambahkan aquades sampai 100 mL.

11. Pembuatan Buffer Tris-HCl pH 8,0 (Kuhlmann, 2006)

Buffer Tris-HCl dibuat larutan A 0,2 M Tris (2,4 gram Tris dalam 100 mL aquades) dan larutan B HCl (0,84 mL HCl dalam 100 mL aquades). ditambahkan aquades sampai 100 mL. pH 9,0 dibutuhkan 50 mL larutan A dan 10,6 mL larutan B ditambahkan aquades sampai 200 mL.

12. Pembuatan Substrat CMC 1%

Substrat CMC 1% ditimbang sebanyak 1 g CMC dan dilarutkan dalam 100 ml buffer fosfat 0,2 M pH 7

13. Pembuatan Substrat Pati 1%

Substrat pati 1% ditimbang sebanyak 1 g soluble starch dan dilarutkan dalam 100 ml buffer fosfat 0,2 M pH 7

14. Penentuan indeks Aktivitas amilase dan selulase secara kualitatif

14.1 Tabel Hasil Pengukuran Zona Bening

Bakteri	Diameter luar (cm)	Diameter dalam (cm)	IAS(A-B)/B
Amilolitik	2	0,7	1,85
Selulolitik	0,5	0,3	0,66

14.2 Cara Perhitungan Indeks Aktivitas enzim

Rumus :

$$\text{Indeks selulolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

Perhitungan :

$$\text{Hasil pengamatan bakteri amilolitik } IAE = \frac{(2-0,7)}{0,7} = 1,85 \text{ (Sedang)}$$

$$\text{Hasil pengamatan bakteri selulolitik } IAE = \frac{0,5-0,3}{0,3} = 0,66 \text{ (Rendah)}$$

14.3 Tabel Klasifikasi Rasio Enzim Ekstraseluler (Choi *et al.*, 2005)

Rasio Enzim Ekstraseluler	Reaksi
Tidak ada zona bening	Negatif
≤ 1	Rendah
1-2	Sedang
≥ 2	Tinggi

15. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

15.1 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Cara membuat larutan stok glukosa standar 2000 ppm adalah :

$$2000\text{ppm} = \frac{2000\text{mg}}{1\text{L}} = \frac{2\text{g}}{1\text{L}} = \frac{0,2\text{g}}{100\text{ mL}}$$

Untuk membuat larutan standar 2000 ppm dibutuhkan 0,2 g glukosa, dilarutkan dengan aquades sebanyak 100 mL. Larutan glukosa dibuat dengan konsentrasi 0, 25, 50, 75, 100, 125, dan 150 ppm sebanyak 100 mL dengan perhitungan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut :

➤ Konsentrasi 25 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 2000 \text{ ppm} = 100 \times 25 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1,25 \text{ mL larutan stok glukosa} + 8,75 \text{ mL aquades}$$

15.2 Hasil perhitungan pengenceran konsentrasi glukosa

No.	Konsentrasi glukosa (ppm)	Volume glukosa(mL)	Volume aquades (mL)
1	25	1,25	8,75
2	50	2,5	7,5
3	75	3,75	6,25
4	100	5	5
5	125	6,25	3,25
6	150	7,5	2,5

15.3 Data Hasil Absorbansi

Konsentrasi glukosa (ppm)	Absorbansi			
	I	II	III	Rata-Rata
0	0,000	0,000	0,000	0,000
25	0,093	0,120	0,116	0,109
50	0,377	0,396	0,399	0,390
75	0,627	0,618	0,602	0,615
100	0,761	0,786	0,804	0,783
125	1,008	1,030	1,047	1,028
150	1,125	1,134	1,139	1,132

16. Penentuan Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS

Persamaan regresi linier $y = bx + a$ Aktivitas enzim(U/mL) =

$$\frac{\text{konsentrasi produk glukosa (ppm)} \times H}{E \times \text{waktu inkubasi}}$$

Contoh perhitungan :

Absorbansi terkoreksi Amilolitik = 0,775

Selulolitik = 0,005

Persamaan regresi linier $y = 0,008x - 0,043$

Waktu inkubasi : 30 menit

Berat molekul glukosa : 180

H (Volume total enzim-substrat) : 2 mL

E (Volume enzim) : 1 mL

Konsentrasi glukosa :

$$y = 0,0085x - 0,0813$$

y = absorbansi

x = konsentrasi glukosa

maka :

$$0,775 = 0,008x - 0,0813$$

$$x = 102 \text{ ppm}$$

$$102 \text{ mg/L} = \frac{102 \mu\text{g} \times 10^{-3} \mu\text{g}}{10^{-3} \text{ ml}} = 102 \mu\text{g/ml}$$

$$M = \frac{n}{V} = \frac{102 \times 10^{-6} \text{ gr}}{180 \text{ gr/mol}} = 0,567 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

$$M = \frac{0,567 \times 10^{-6} \text{ mol}}{10^{-3} \text{ L}} = 0,567 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

$$= 0,567 \text{ mmol/L}$$

$$= \frac{0,567 \times 10^{-3} \mu\text{mol}}{10^{-3} \text{ ml}}$$

$$= 0,567 \mu\text{mol/ml}$$

$$\text{Aktivitas Amilase} = \frac{0,567 \mu\text{mol/ml} \times 2 \text{ mL}}{1 \text{ mL} \times 30 \text{ menit}}$$

$$= 0,037 \mu\text{mol/menit. ml}$$

$$= 0,037 \text{ U/ml}$$

Konsentrasi glukosa :

$$y = 0,0085 x - 0,0813$$

y = absorbansi

x = konsentrasi glukosa

maka :

$$0,005 = 0,008 x - 0,0813$$

$$x = 6 \text{ ppm}$$

$$6 \text{ mg/L} = \frac{6 \mu\text{g} \times 10^{-3} \mu\text{g}}{10^{-3} \text{ ml}} = 6 \mu\text{g/ml}$$

$$M = \frac{n}{V} = \frac{6 \times 10^{-6} \text{ gr}}{180 \text{ gr/mol}} = 0,034 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

$$M = \frac{0,034 \times 10^{-6} \text{ mol}}{10^{-3} \text{ L}} = 0,034 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

$$10^{-3} \text{ L}$$

$$= 0,034 \text{ mmol/L}$$

$$= \frac{0,034 \times 10^{-3} \mu\text{mol}}{10^{-3} \text{ ml}}$$

$$10^{-3} \text{ ml}$$

$$= 0,034 \mu\text{mol/ml}$$

$$\text{Aktivitas Selulase} = \frac{0,034 \mu\text{mol/ml} \times 2 \text{ mL}}{1 \text{ mL} \times 30 \text{ menit}}$$

$$1 \text{ mL} \times 30 \text{ menit}$$

$$= 0,0022 \mu\text{mol/menit. ml}$$

$$= 0,0022 \text{ U/ml}$$

17. Hasil absorbansi laju pertumbuhan bakteri dengan variasi pH

- **Bakteri Amilolitik (Xo)**

pH	Absorbansi			Rata-rata
	I	II	III	
pH 4	0,329	0,324	0,330	0,331
pH 5	0,387	0,379	0,385	0,383
pH 6	0,452	0,447	0,445	0,448
pH 7	0,385	0,393	0,387	0,388
pH 8	0,426	0,432	0,436	0,431

- **Bakteri Amilolitik (Xt)**

pH	Absorbansi			Rata-rata
	I	II	III	
pH 4	0,812	0,825	0,827	0,821
pH 5	2,907	2,920	2,911	2,912
pH 6	2,415	2,340	2,309	2,354
pH 7	1,487	1,636	1,524	1,524
pH 8	-0,032	-0,039	-0,027	-0,027

- **Bakteri Selulolitik (Xo)**

pH	Absorbansi			
	I	II	III	Rata-rata
pH 4	0,432	0,423	0,438	0,431
pH 5	0,345	0,337	0,348	0,343
pH 6	0,351	0,357	0,354	0,354
pH7	0,406	0,412	0,418	0,412
pH 8	0,435	0,439	0,445	0,439

- **Bakteri Selulolitik (Xt)**

pH	Absorbansi			
	I	II	III	Rata-rata
pH 4	0,742	0,756	0,771	0,756
pH 5	2,275	2,301	2,287	2,287
pH 6	1,802	1,787	1,775	1,788
pH7	0,989	0,978	0,976	0,981
pH 8	-0,030	-0,027	-0,010	-0,022

Perhitungan laju pertumbuhan bakteri dengan variasi pH

Rumus :

$$\text{Laju pertumbuhan bakteri} = \frac{\text{Log } X_t - \text{Log } X_o}{0,301 \times t}$$

Keterangan : X_t = Absorbansi pertumbuhan bakteri akhir

X_o = Absorbansi pertumbuhan bakteri awal

t = waktu inkubasi

17.1 Hasil laju pertumbuhan isolat bakteri amilolitik dengan variasi pH

pH	X_o	X_t	$\text{Log } X_t - \text{Log } X_o / 0,301 \cdot t$
pH 4	0,331	0,821	0,0545
pH 5	0,383	2,912	0,121
pH 6	0,448	2,354	0,0996
pH7	0,432	1,549	0,0766

17.2 Hasil laju pertumbuhan isolat bakteri selulolitik dengan variasi pH

pH	X_o	X_t	$\text{Log } X_t - \text{Log } X_o / 0,301 \cdot t$
pH 4	0,431	0,756	0,0337
pH 5	0,343	2,287	0,1139
pH 6	0,354	1,788	0,0973
pH7	0,331	0,981	0,0651

18. Hasil absorbansi laju pertumbuhan bakteri dengan variasi suhu

- **Bakteri Amilolitik (Xo)**

Suhu	Absorbansi			Rata-rata
	I	II	III	
25°C	0,463	0,475	0,477	0,471
35°C	0,542	0,531	0,535	0,536
45°C	0,518	0,521	0,528	0,522

- **Bakteri Amilolitik (Xt)**

Suhu	Absorbansi			Rata-rata
	I	II	III	
25°C	2,266	2,279	2,254	2,266
35°C	1,812	1,804	1,818	1,8113
45°C	1,414	1,399	1,406	1,4063

- **Bakteri selulolitik (Xo)**

Suhu	Absorbansi			Rata-rata
	I	II	III	
25°C	0,325	0,331	0,328	0,328
35°C	0,434	0,437	0,429	0,433
45°C	0,382	0,374	0,385	0,380

- **Bakteri selulolitik (Xt)**

Suhu	Absorbansi			Rata-rata
	I	II	III	
25°C	2,078	2,080	2,067	2,075
35°C	1,726	1,714	1,719	1,719
45°C	0,954	0,962	0,959	0,958

Perhitungan laju pertumbuhan bakteri dengan variasi suhu

Rumus :

$$\text{Laju pertumbuhan bakteri} = \frac{\text{Log } X_t - \text{Log } X_o}{0,301 \times t}$$

Keterangan : X_t = Absorbansi pertumbuhan bakteri akhir

X_o = Absorbansi pertumbuhan bakteri awal

t = waktu inkubasi

18.1 Hasil laju pertumbuhan isolat bakteri amilolitik dengan variasi suhu

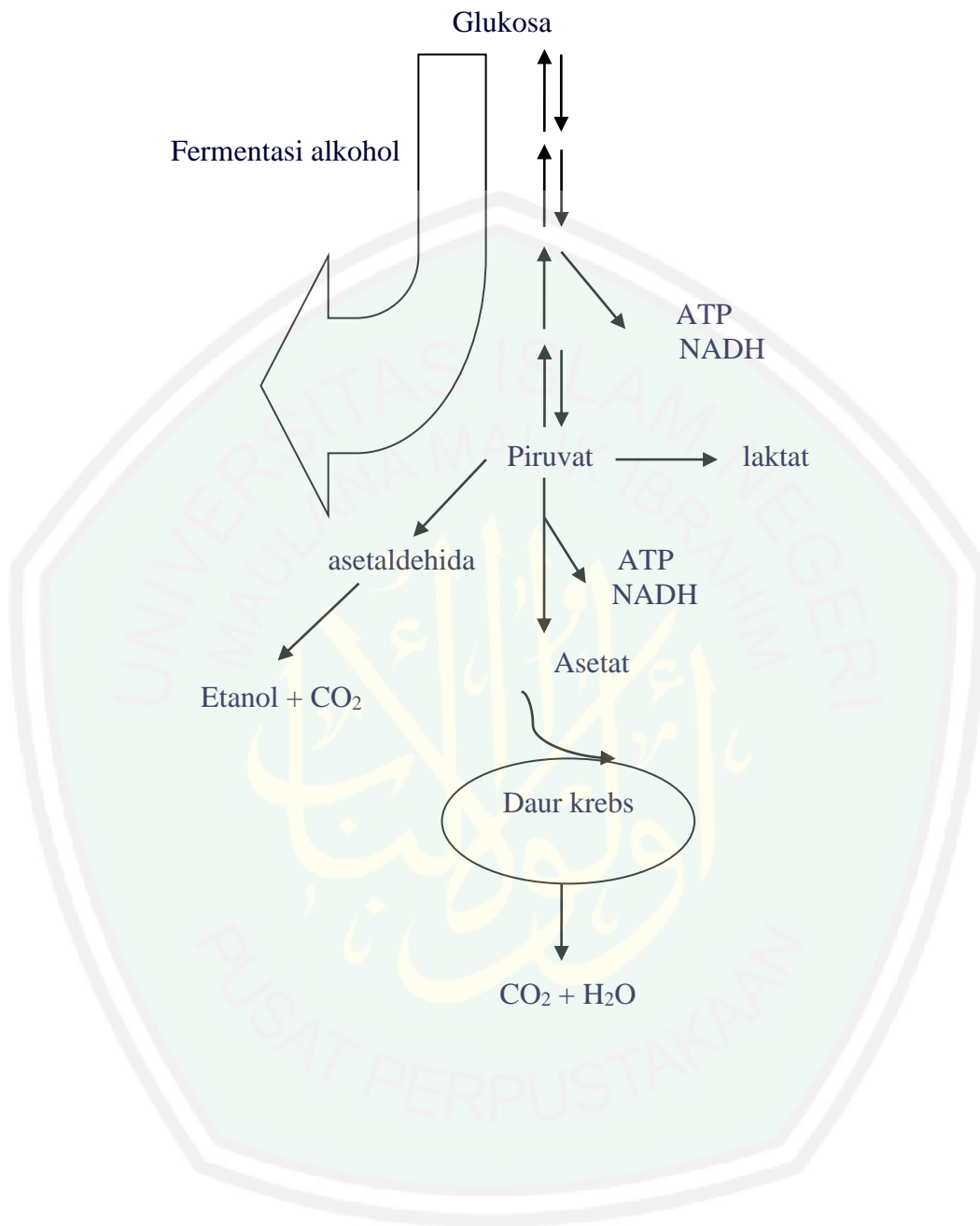
Suhu	X ₀	X _t	Log X _t - Log X ₀ / 0,301 . t
25°C	0,471	2,266	0,0944
35°C	0,536	1,818	0,0733
45°C	0,522	1,406	0,0595

18.2 Hasil laju pertumbuhan isolat bakteri amilolitik dengan variasi pH

Suhu	X ₀	X _t	Log X _t - Log X ₀ / 0,301 . t
25°C	0,328	2,067	0,110
35°C	0,433	1,719	0,0827
45°C	0,380	0,959	0,0556



Lampiran 4. Proses fermentasi glukosa



Lampiran 5. Karakter pada *Bergeys Manual of Determinative Bacteriolog*

L. 5. 1 Hasil perbandingan identifikasi isolat bakteri dengan informasi dari *Bergeys Manual of Determinative Bacteriolog*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Gram reaction	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	d	d	d	-	d	+	-	-	d	+	d	d	d
Chains of cells	+	+	+	+	d	d	+	+	d	d	d	d	d	d	-	d	-	-	-	+	+	d	-	d
Motility	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cell length > 3µm	+	+	+	+	-	-	d	-	-	-	-	+	-	+	d	d	d	d	d	+	+	-	-	-
Growth at 50°C	-	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	-	+	d	-	+	-	+	d	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	d	-	-
Carbohydrates																								
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Cellobiose	-	d	d	d	-	d	+	+	+	+	+	d	-	+	-	+	d	+	+	+	-	d	d	d
Galactose	-	-	d	-	-	d	+	+	d	+	d	d	-	d	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Meilibiose	-	-	-	-	-	d	+	d	d	d	d	+	-	d	-	+	-	+	+	+	-	d	-	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	+	+	d	+	d	d	-	-	-	+	-	+	+	+	-	d	+	-
Urease	-	d	-	-	-	+	d	-	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	-	-	-	+	+	d	+	d	d	+	-	d	+	d	+	+	-	d	+	d
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	+	d	d	-	d	d	+	+	+	+	-	+	-	d
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
oxidase	d	d	d	d	-	+	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	+	-	+	D	-	-	-

1. Bacillus anthracis	9. Bacillus subtilis	17. Bacillus laterosporus
2. Bacillus cereus	10. Bacillus licheniformis	18. Bacillus macerans
3. Bacillus mycoides	11. Bacillus amyloliquefaciens	19. Bacillus polymyxa
4. Bacillus thuringiensis	12. Bacillus coagulans	20. Bacillus sphaericus
5. Bacillus firmus	13. Bacillus pantothenicus	21. Bacillus badius
6. Bacillus lentus	14. Bacillus alvei	22. Bacillus stearothermophilus
7. Bacillus megaterium	15. Bacillus brevis	23. Bacillus stearothermophilus
8. Bacillus pumilus	16. Bacillus circulans	24. Bacillus stearothermophilus

L. 5.2 Hasil perbandingan identifikasi isolat bakteri dengan informasi dari *Bergeys Manual of Determinative Bacteriologi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Gram reaction	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aerobic growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Catalase	+	+	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+	D
Oxidase	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Growth at 25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth on Nutrient agar	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Carbohidrat, acid from :													
Glukose	+	d	-	+	-	d	-	+	+	+	+	+	-
Lactose	d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Sucrose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	d	-
Nitrate reduced	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

1. Acinetobacter calcoaceticus ; <i>Acinetobacter anitratus</i> ; <i>Moraxella Iwoffii</i> var, <i>glucidolytica</i> ; <i>M. glucidolytica</i>	7. Neisseria flavescens
2. Acinetobacter iwoffii ; <i>Moraxella Iwoffii</i>	8. Neisseria gonorrhoeae ; <i>gonococcus</i>
3. Branhamella catarrhalis <i>Neisseria catarrhalis</i>	9. Neisseria lactamica
4. Gemella haemolysans <i>Neisseria haemolysans</i>	10. Neisseria meningitis <i>N.intracellularis</i> ; <i>meningococcus</i>
5. Neisseria cinerea	11. Neisseria mucosa ;
6. Neisseria elongate	12. Neisseria subflava
	13. Vellonella spp

Lampiran 4. Dokumentasi

Peremajaan bakteri



Gambar 1. Hasil peremajaan bakteri selama 18 jam

Uji kualitatif



Gambar 2. Bakteri amilolitik



Gambar 3. Bakteri selulolitik

Uji Kuantitatif

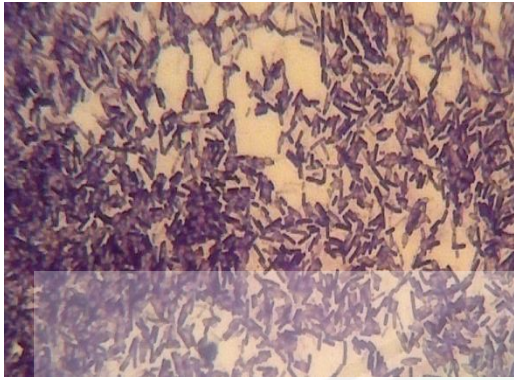


Gambar 4. Pembuatan kurva standar

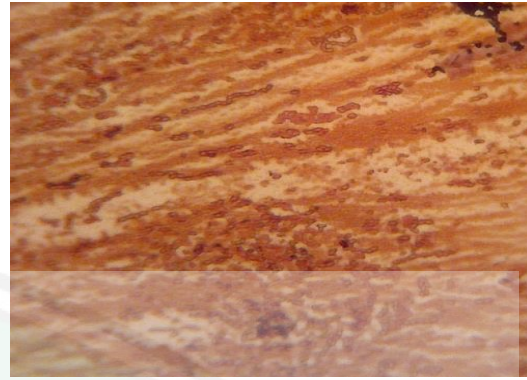


Gambar 5. Aktivitas enzim

Uji Pewarnaan gram

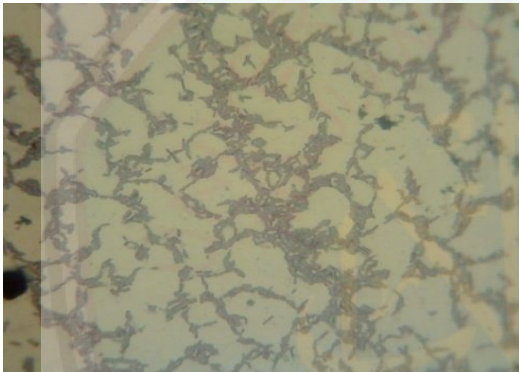


Gambar 6. Bakteri amilolitik

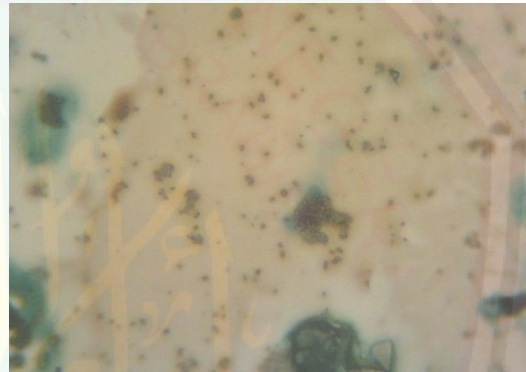


Gambar 7. Bakteri selulolitik

Uji pewarnaan endospora



Gambar 8. Bakteri Amilolitik

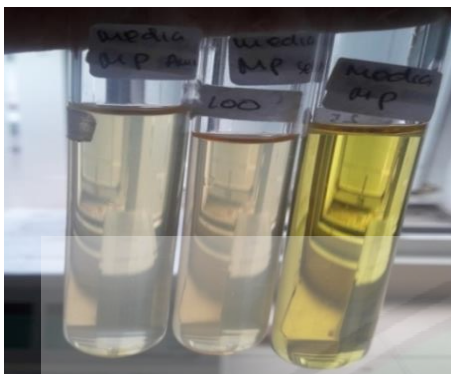


Gambar 9. Bakteri Selulolitik

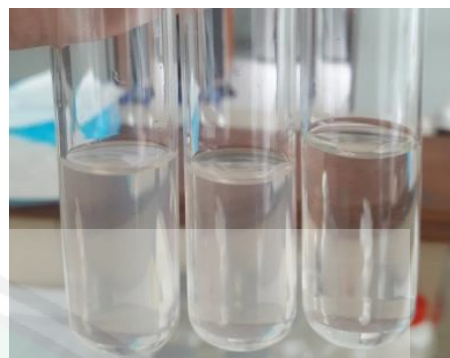
Uji Biokimia



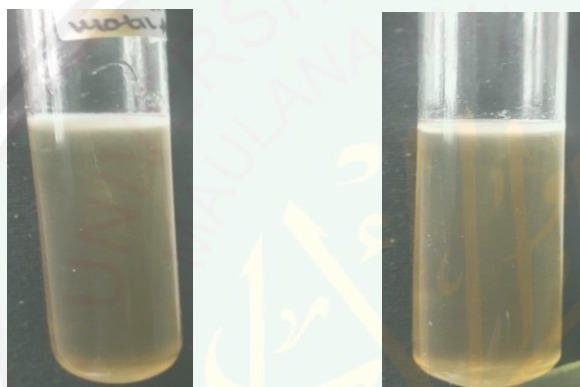
Gambar 10. Fermentasi karbohidrat



Gambar 11. Uji metil red



Gambar 12. Uji voges-proskeur



Gambar 13. Uji Motilitas



Gambar 14. Uji katalase