

**ANALISIS SUHU DAN pH TERHADAP ENZIM SELULASE KASAR
DARI *Bacillus subtilis* DALAM HIDROLISIS KERTAS HVS (*Houtvrij
schrijfpapier*) BEKAS SEBAGAI BAHAN BAKU PEMBUATAN
BIOETANOL**

SKRIPSI

Oleh:
ZULFA HIDAYATUL LAILA
NIM. 15620095



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**ANALISIS SUHU DAN pH TERHADAP ENZIM SELULASE KASAR
DARI *Bacillus subtilis* DALAM HIDROLISIS KERTAS HVS (*Houtvrij
schrijfpapier*) BEKAS SEBAGAI BAHAN BAKU PEMBUATAN
BIOETANOL**

SKRIPSI

Oleh:
ZULFA HIDAYATUL LAILA
NIM. 15620095



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**ANALISIS SUHU DAN pH TERHADAP ENZIM SELULASE KASAR
DARI *Bacillus subtilis* DALAM HIDROLISIS KERTAS HVS (*Houtvrij
schrijfpapier*) BEKAS SEBAGAI BAHAN BAKU PEMBUATAN
BIOETANOL**

SKRIPSI

Oleh:
ZULFA HIDAYATUL LAILA
NIM. 15620095

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)

PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020

**ANALISIS SUHU DAN pH TERHADAP ENZIM SELULASE KASAR
DARI *Bacillus subtilis* DALAM HIDROLISIS KERTAS HVS (*Houtvrij
schrijfpapier*) BEKAS SEBAGAI BAHAN BAKU PEMBUATAN
BIOETANOL**

SKRIPSI


Oleh:
ZULFA HIDAYATUL LAILA
NIM. 15620095

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
tanggal 04 Desember 2020

Dosen Pembimbing I


Ir. Liliek Harianie, AR,MP
NIP. 19620901 199803 2 001

Dosen Pembimbing II


Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.
NIP. 19731212 199803 1008

Mengetahui,
Ketua Program Studi



Dr. Evika Sandi Safitri, M.P.
NIP. 19741018 20031 2 2002

**ANALISIS SUHU DAN pH TERHADAP ENZIM SELULASE KASAR
DARI *Bacillus subtilis* DALAM HIDROLISIS KERTAS HVS (*Houtvrij
schrijfpapier*) BEKAS SEBAGAI BAHAN BAKU PEMBUATAN
BIOETANOL**

SKRIPSI

Oleh:
ZULFA HIDAYATUL LAILA
NIM. 15620095

telah dipertahankan
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai
salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 22 Desember 2020

Penguji Utama : Dr. Ulfah Utami, S.Si
NIP. 19650509 199903 2 002
Ketua Penguji : Dr. Nur Kusmiyati, M.Si
NIP. 18890816 2016010 8 2061
Sekretaris Penguji : Ir. Liliek Harianie, AR,MP
NIP. 19620901 199803 2 001
Anggota Penguji : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.
NIP. 19731212 19980 3 1008

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)



Mengesahkan,
Ketua Program Studi Biologi

Dr. Lutha Sandi Safitri, M.P.
NIP. 19741018 20031 2 2002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Zulfa Hidayatul Laila
NIM : 15620095
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Analisis Suhu dan pH terhadap Enzim
Selulase Kasar dari *Bacillus subtilis*
dalam Hidrolisis Kertas HVS (*Houtvrij*
Schrijfpapier) Bekas sebagai Bahan
Baku Pembuatan Bioetanol

menyatakan bahwa hasil penelitian saya ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data dan tidak terdapat unsure-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan dan 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 unsur unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, Desember 2020

..... membuat pernyataan



Zulfa Hidayatul Laila
NIM. 15620095

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



MOTTO

***“Waktu bagaikan pedang. Jika kamu tidak memanfaatkannya dengan baik,
maka ia akan memanfaatkanmu ”***

(HR. Muslim)

***“Lakukan yang terbaik yang kamu bisa sesuai porsimu, sisanya serahkan
kepada Allah SWT. Percayalah kepada Allah karena Allah pasti memiliki
rencana yang paling baik untukmu ”***



HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya ini saya persembahkan untuk:

Almarhum ayah saya tercinta Bapak Mohammad Ghufron, yang selalu menjadi tujuan saya berdoa, yang selalu saya sebut namanya ketika selesai sholat, yang saya harapkan ridhonya, dan saya jadikan sebagai motivator untuk segera menyelesaikan pendidikan ini.

Ibu saya Ibu Suprihatin, surga saya, yang selalu memberikan doanya untuk anak-anak tercinta, yang selalu saya harap ridhonya. Selalu memberikan kasih sayang serta dukungan moril dan materiil dalam menyelesaikan studi ini.

Saudara saya, Mbak Fida dan keluarga serta adek kembar saya Dek Eli yang selalu memberikan dukungan dan motivasinya untuk saya. Selalu menemani apapun kondisi saya dan menerima segala hal tentang saya.

Sahabat-sahabat Genetist 2015, yang selama ini menjadi teman berjuang menyelesaikan studi ini. Doa dan dukungan kalian sangat berharga.

Teman-teman di pondok Pesantren Sabilurrosyad Gasek, yang selalu kebersamai hari-hari saya, memberikan saran dan dukungannya yang luar biasa.

Ustadz/Ustadzah TPQ Hidayatul Khoir, yang menjadi wadah belajar saya mengabdikan, terima kasih atas motivasi dan pengalamannya.

Bunda-bunda daycare Paramulya yang menjadi tempat saya belajar, terima kasih atas dukungan dan pengalamannya.

Dan semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini

Analisis Suhu dan pH terhadap Enzim Selulase Kasar dari *Bacillus Subtilis* dalam Hidrolisis Kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) Bekas sebagai Bahan Baku Pembuatan Bioetanol

Laila, Zulfa Hidayatul, Liliek Harianie, Ahmad Barizi

ABSTRAK

Kertas merupakan limbah yang memiliki konsumsi tinggi di Indonesia dengan kandungan selulosa tinggi yaitu sekitar 80-90%. Kandungan selulosa dalam kertas ini dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Proses hidrolisis kertas dalam penelitian ini menggunakan enzim selulase untuk memecah selulosa menjadi glukosa. *Bacillus subtilis* merupakan mikroorganisme penghasil enzim selulase. Aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan jenis *Bacillus* lainnya. Faktor yang digunakan dalam penelitian ini yaitu suhu dan pH. Dua faktor ini sangat berpengaruh penting dalam menentukan aktivitas enzim selulase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu dan pH optimum enzim selulase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* dalam menghidrolisis kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) bekas. Variasi suhu yang digunakan yakni 30 °C, 35°C, 40 °C, dan 45 °C. Sedangkan untuk variasi pH yakni 6, 7, dan 8. Metode yang digunakan yaitu metode DNS (asam 2,3-dinitrosalisilat). Data aktivitas enzim selulase yang didapat pada masing-masing perlakuan kemudian dianalisis statistik dengan menggunakan uji ANOVA untuk mengetahui pengaruh dan beda nyata. Berdasarkan data hasil penelitian, secara kualitatif *Bacillus subtilis* mampu memproduksi enzim selulase yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Indek Aktivitas Selulase dari *Bacillus subtilis* memiliki nilai sebesar 1,039 mm. Secara kuantitatif, hasil ekstrak kasar enzim selulase dari *Bacillus subtilis* dapat bekerja secara optimal pada suhu 35 °C dengan nilai aktivitas enzim sebesar 1,309 U/ml. Sedangkan lingkungan pH optimal untuk aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* adalah pH 7 dengan nilai aktivitas selulase sebesar 2,069 U/ml.

Kata Kunci: *Bacillus subtilis*, aktivitas enzim selulase, kertas HVS bekas (*Houtvrij schrijfpapier*)

Analysis of Temperature and pH of Crude Cellulase Enzymes from *Bacillus Subtilis* in the Hydrolysis of Used HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) Paper as Raw Materials for Making Bioethanol

Laila, Zulfa Hidayatul, Liliek Harianie, Ahmad Barizi

ABSTRACT

Paper is a waste that has high consumption in Indonesia with a high cellulose content of around 80-90%. The cellulose content in this paper can be used as a raw material for making bioethanol. This paper hydrolysis process requires cellulase enzymes to break down cellulose into glucose. *Bacillus subtilis* is a cellulase enzyme-producing microorganism. The cellulase enzyme activity of *Bacillus subtilis* has higher activity compared to other types of *Bacillus*. The factors used in this study were temperature and pH. These two factors are very important in determining the activity of the cellulase enzyme. This study aims to determine the optimum temperature and pH cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* in hydrolyzing used HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) paper. The temperature variations used were 30 °C, 35 °C, 40 °C, and 45 °C. As for the pH variations, namely 6, 7, and 8. The method used was the DNS method (2,3-dinitrosalicylic acid). The cellulase enzyme activity data obtained in each treatment were then statistically analyzed using the ANOVA test to determine the effect and significant difference. Based on the research data, qualitatively *Bacillus subtilis* is able to produce cellulase enzymes which are characterized by the formation of a clear zone around the colony. The cellulase activity index of *Bacillus subtilis* had a value of 1.039 mm. Quantitatively, the crude extract of the cellulase enzyme from *Bacillus subtilis* can work optimally at 35 °C with an enzyme activity value of 1.309 U / ml. Meanwhile, the optimal pH environment for cellulase enzyme activity from *Bacillus subtilis* is pH 7 with a cellulase activity value of 2.069 U / ml.

Keywords: *Bacillus subtilis*, cellulase enzyme activity, used HVS paper (*Houtvrij schrijfpapier*)

تحليل درجة الحرارة ودرجة الحموضة في سلولاز الانزيمات وقح آري العصوية الرقيقة طبيعة التحلل المستخدمة ق سا الإيثانول الخام تحضير المواد هاوتفريج فافير ورقة

ليلى ، زلفى هداية ، ليليك حريري ، أحمد باريزي

نبذة مختصرة

الورق عبارة عن نفايات ذات استهلاك مرتفع في إندونيسيا حيث يحتوي على نسبة عالية من السليلوز حوالي ٨٠-٩٠٪. تتطلب عملية التحلل. يمكن استخدام محتوى السليلوز في هذه الورقة كمادة خام لصنع الإيثانول الحيوي ٨٠-٩٠٪. **آري العصوية الرقيقة** هو كائن حي دقيق ينتج إنزيم. المائي للورق إنزيمات السليلوز لتفكيك السليلوز إلى جلوكوز كانت العوامل. نشاط إنزيم السليلاز **لعصيات الرقيقة** له نشاط أعلى مقارنة بأنواع **العصيات** الأخرى. السليلولاز هذان العاملان مهمان للغاية في تحديد نشاط إنزيم. المستخدمة في هذه الدراسة هي درجة الحرارة ودرجة الحموضة **العصوية** وتهدف هذه الدراسة إلى تحديد درجة الحرارة المثلى ودرجة الحموضة لإنزيم السليلاز الذي تنتجه. السليلاز كانت التغيرات في درجات الحرارة المستخدمة ٣ درجة. في التحليل المائي المستخدم في ورق هاوتفريج فافير **الرقيقة** أما بالنسبة لتغيرات الأس الهيدروجيني، فقد كانت ٤ و ٧ و ٨. مئوية، ٣٥ درجة مئوية، ٦٠ درجة مئوية، ٦٥ درجة مئوية تم بعد ذلك تحليل بيانات نشاط إنزيم السليلاز. (ثنائي نيتروساليسيليك حامض-٢٢) الطريقة المستخدمة كانت طريقة بناءً على البيانات البحثية. لتحديد التأثير والفرق الكبير التي تم الحصول عليها في كل علاج إحصائياً باستخدام اختبار كانت. فإن **العصوية الرقيقة** قادر على إنتاج إنزيمات السليلولاز التي تتميز بتكوين منطقة واضحة حول المستعمرة من الناحية الكمية، يمكن أن يعمل المستخلص الخام من إنزيم. قيمة مؤشر نشاط السليلاز **لعصيات الرقيقة** ١٠٣٩ مل وفي الوقت. السليلاز من **العصوية الرقيقة** على النحو الأمثل عند ٣٥ درجة مئوية مع قيمة نشاط الإنزيم ١٠٣٩ وحدة / مل نفسه، فإن بيئة الأس الهيدروجيني المثالية لنشاط إنزيم السليلاز من **العصوية الرقيقة** هي الرقم الهيدروجيني ٧ مع قيمة نشاط السليلاز ٢٠٦٨

المستخدم هاوتفريج فافير، نشاط إنزيم السليلاز، ورق **العصوية الرقيقة**: الكلمات المفتاحية

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

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 “Analisis Suhu dan pH terhadap Enzim Selulase Kasar dari *Bacillus Subtilis* dalam Hidrolisis Kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) Bekas sebagai Bahan Baku Pembuatan Bioetanol” ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana dalam bidang Biologi 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. Prof. Dr. H. Abdul Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P, selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ir. Hj. Liliék Harianie A.R, M.P dan Dr. Ahmad Barizi, M.A. selaku dosen pembimbing yang dengan penuh keikhlasan serta kesabaran telah memberikan bimbingan, pengarahan dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini.
5. Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si dan Nur Kusmiyati, M.Si, selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritik yang membangun sehingga membantu terselesainya skripsi ini.
6. Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc. selaku dosen wali yang telah memberikan dukungan dan semangat sehingga penulisan skripsi dapat terselesaikan.
7. Seluruh dosen, Laboran Jurusan Biologi dan Staf Administrasi yang telah membantu dan memberikan kemudahan, terimakasih atas semua ilmu dan bimbingannya.
8. Peneduh jiwaku Bapak (Alm) Mohammad Ghufron, yang selalu menjadi tujuan doaku, yang secara tidak langsung telah menjadi motivatorku dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Surgaku, Ibu Suprihatin yang sudah mendidik, membimbing, memberi doa yang tiada putus dan motivator sampai saat ini.
10. Keluargaku tercinta, kakak, adik kembarku, yang sudah kebersamai dan memberi dukungan tiada putus dalam menyelesaikan skripsi ini.
11. Seluruh teman-teman Jurusan Biologi angkatan 2015, yang berjuang bersama-sama menyelesaikan studi sampai memperoleh gelar S.Si.

12. Seluruh teman-teman santri Sabilurrosyad Gasek yang sudah menjadi teman hidup dan selalu memberi motivasi dalam penyelesaian skripsi ini.
13. Semua pihak yang ikut membantu dan memberikan dukungan baik moril maupun materiil dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi penulis khususnya, dan bagi para pembaca pada umumnya. Semoga Allah senantiasa memberikan ilmu yang bermanfaat dan melimpahkan Rahmat dan Ridho-Nya. Aamiin.

Wassalamu 'alaikum Wr. Wb.

Malang, Desember 2020

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEDOMAN	vi
HALAMAN MOTTO	vii
HALAMAN PERSEMBAHAN	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
KATA PENGANTAR.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	8
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.4 Manfaat	8
1.5 Hipotesis	9

1.6	Batasan Masalah	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....		10
2.1	Kajian Penelitian dalam Perspektif Islam	10
2.1.1	Pemanfaatan Limbah dalam Islam	10
2.1.2	Bakteri dalam Islam	11
2.2	Selulosa.....	13
2.3	Enzim Selulase.....	15
2.4	Mekanisme Kerja Enzim Selulase	17
2.5	Faktor-Faktor yang Berpengaruh pada Aktivitas Enzim Selulase.....	19
2.6	<i>Bacillus subtilis</i>	22
2.7	Aktivitas Enzim Selulase <i>Bacillus subtilis</i>	24
2.8	Limbah Kertas HVS (<i>Houtvrij schrijfpapier</i>).....	28
BAB III METODE PENELITIAN		32
3.1	Rancangan Penelitian.....	32
3.2	Waktu dan Tempat.....	32
3.3	Variabel Penelitian.....	33
3.3.1	Variabel Bebas	33
3.3.2	Variabel Terikat	33
3.3.3	Variabel Kontrol.....	33
3.4	Alat dan Bahan.....	33
3.4.1	Alat.....	33
3.4.2	Bahan	34
3.5	Prosedur Penelitian	34

3.5.1 Uji Konfirmasi Isolat <i>Bacillus subtilis</i>	34
3.5.2 Uji Konfirmasi terhadap produksi Enzim Selulase.....	37
3.5.3 Pembuatan Ekstrak Kertas HVS (<i>Houtvrij Schrijfpapier</i>) Bekas .	38
3.5.4 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase	38
3.5.5 Metode DNS (asam 2,3-dinitrosalisilat)	39
3.5.6 Uji Aktivitas Enzim Selulase	42
3.5.7 Analisis Data	43
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	44
4.1 Aktivitas Enzim Selulase dalam Hidrolisis Kertas HVS (<i>Hourvrij Schrijfpapier</i>) Bekas berdasarkan Variasi Suhu	44
4.1.1 Uji Konfirmasi <i>Bacillus subtilis</i>	44
4.1.2 Uji Konfirmasi Aktivitas Enzim Selulase oleh <i>Bacillus subtilis</i> ..	51
4.1.3 Uji Aktivitas Enzim Selulase Berdasarkan Variasi Suhu	53
4.2 Aktivitas Enzim Selulase dalam Hidrolisis Kertas HVS (<i>HourVrij Schrijfpapier</i>) Bekas berdasarkan Variasi pH.....	58
BAB V.....	63
PENUTUP.....	63
5.1 Kesimpulan.....	63
5.2 Saran.....	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN.....	71

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Produksi Selulase Isolat Bacillus Media CMC	25
Tabel 2. 2 Produksi Selulase Isolat Bacillus Media Limbah Kertas	26
Tabel 2. 3 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Selulase <i>Bacillus subtilis</i>	27
Tabel 2. 4 Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Selulase <i>Bacillus subtilis</i>	27
Tabel 2. 5 Komposisi Lignoselulosa dalam Beberapa Sumber.....	30
Tabel 2. 6 Analisa Lignin pada Berbagai Jenis Kertas	31



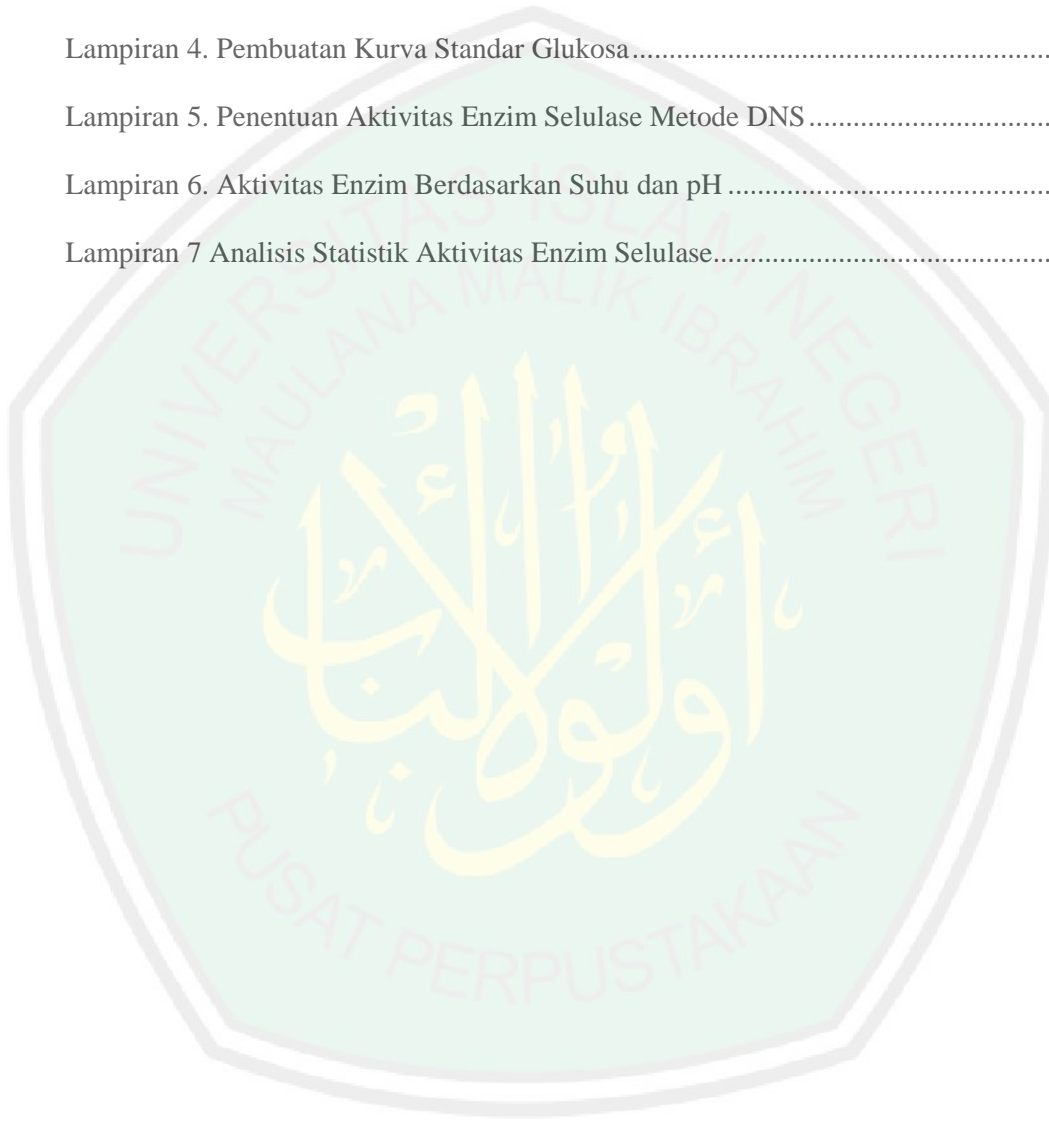
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Selulosa	13
Gambar 2.2 Skema tahap hidrolisis enzimatis	18
Gambar 4.1.1 Hasil Pengamatan Morfologi <i>Bacillus subtilis</i>	44
Gambar 4.1.2 Hasil Uji Pewarnaan Gram <i>Bacillus subtilis</i>	46
Gambar 4.1.3 Hasil Pengamatan Endospora <i>Bacillus subtilis</i>	48
Gambar 4.1.4 Visualisasi Zona Bening pada Uji Produksi Enzim Selulase.....	51
Gambar 4.1.5 Aktivitas Enzim Selulase berdasarkan Variasi Suhu	54
Gambar 4.2.1 Aktivitas Enzim Selulase berdasarkan Variasi pH.....	59



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Identifikasi <i>Bacillus subtilis</i>	71
Lampiran 2. Gambar Pengamatan <i>Bacillus subtilis</i> Secara Mikroskopis	72
Lampiran 3. Penentuan Indeks Aktivitas Selulase.....	73
Lampiran 4. Pembuatan Kurva Standar Glukosa.....	74
Lampiran 5. Penentuan Aktivitas Enzim Selulase Metode DNS	77
Lampiran 6. Aktivitas Enzim Berdasarkan Suhu dan pH	78
Lampiran 7 Analisis Statistik Aktivitas Enzim Selulase.....	79



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim selulase merupakan enzim hidrolase yang berperan dalam substrat selulosa. Enzim selulase menghidrolisis selulosa pada ikatan β -1,4-glikosida menghasilkan glukosa (Murashima *et al*, 2002). Selulosa adalah polimer glukosa yang berbentuk rantai linier dan dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glikosidik. Struktur yang linier menyebabkan selulosa bersifat kristal dan tidak mudah larut. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis (Holtzapple *et al*, 2003). Tiga tipe enzim yang menyusun enzim selulase adalah *endoglucanase* (endo-1,4- β -D-glukanase), *eksoglucanase* (ekso-1,4- β -D-glukanase) dan *selobiase* (β -D-glukosidase) (Murashima *et al.*, 2002). Enzim ini saling bekerja sama satu sama lain dalam proses degradasi selulosa menjadi glukosa (Fikrinda, 2000).

Enzim selulase memiliki peranan yang sangat banyak dalam dunia industri. Dalam industri pakan ternak, enzim ini digunakan untuk meningkatkan kualitas gizi dan pencernaan hewan. Pada industri tekstil, enzim ini dimanfaatkan dalam *biopolishing* kain untuk meningkatkan kelembutan dan kecerahan kain. Selain itu, enzim selulase juga berfungsi dalam usaha peningkatan produksi etanol (Sholihati, 2015).

Bioetanol merupakan bahan bakar alternatif yang berasal dari proses fermentasi gula dari substrat karbohidrat menggunakan bantuan mikroorganisme. Bioetanol memiliki manfaat dalam menurunkan emisi CO₂ sampai 18% (Fauzi, 2011). Biasanya, bioetanol terbuat dari bahan pangan atau pakan yang mengandung gula dan pati-patian. Hal ini sangat mempengaruhi harga bahan

pangan yang semakin melonjak di masyarakat dan dinilai kurang ekonomis. Sehingga dibutuhkan bahan lignoselulosa sebagai alternatif dalam pembuatan bioetanol. Menurut Soerawidjaja dan Amiruddin (2007) lignoselulosa adalah bagian dari tanaman yang tersusun atas hemiselulosa, selulosa, lignin, dan sedikit kandungan ekstraktif. Pembuatan bioetanol dari senyawa lignoselulosa diharapkan mampu mengganti bahan baku bioetanol yang biasanya menggunakan bahan pangan atau pakan yang mengandung gula atau pati langsung menjadi bahan-bahan yang mengandung lignoselulosa.

Lignoselulosa merupakan komponen organik yang dapat diperoleh dari jerami, rumput, kayu, kertas, atau bahan berserat yang lain. Lignoselulosa terdiri dari hemiselulosa, selulosa dan juga lignin (Anindyawati, 2009). Selulosa tidak bisa langsung digunakan sebagai bahan dalam pembuatan bioetanol karena masih dalam bentuk polisakarida. Sehingga, perlu proses hidrolisis oleh enzim selulase untuk mengubah senyawa selulosa menjadi glukosa agar dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol.

Kertas merupakan limbah yang memiliki kandungan selulosa tinggi yaitu sekitar 80-90%. Kandungan ini lebih tinggi dibandingkan dengan bahan lignoselulosa yang lain (Hermawan, 2009). Dalam penelitian ini jenis kertas yang digunakan adalah kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*). Kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) sebagian besar terdiri dari selulosa dibandingkan dengan kandungan lignin atau hemiselulosa. Jika dibandingkan dengan kertas buram, glukosa yang dihasilkan oleh HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) lebih tinggi karena kandungan lignin yang ada dalam kertas ini lebih sedikit dan jumlah selulosanya lebih besar. Lignin merupakan komponen fenolik yang tidak mengandung gugus

glukosa, maka produk degradasi lignin tidak menghasilkan glukosa. (Taruna, *et al.* 2010).

Penelitian ini menggunakan limbah lignoselulosa berupa kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) karena jumlah selulosa yang ada didalamnya lebih tinggi dibanding limbah lignoselulosa yang lain. Selain itu, kertas merupakan limbah yang memiliki konsumsi tinggi di Indonesia. Menurut Fuadi (2015) jumlah penggunaan kertas di Indonesia mengalami kenaikan sebesar satu kilogram (kg) per kapita atau sekitar 220 ribu ton setiap tahunnya. Kementerian Prindustrian Republik Indonesia tahun 2012 menyatakan bahwasanya produksi kertas tahun 2012 bisa mencapai 13 juta ton (Khrisna, 2017). Limbah kertas banyak ditemukan di semua kalangan masyarakat terutama lingkungan akademika universitas. Kertas digunakan untuk menunjang aktivitas akademik mereka. Setelah mahasiswa selesai dengan aktivitas akademik mereka, banyak kertas yang tidak dimanfaatkan kembali dan menjadi limbah kertas yang dibuang sia sia (Khrisna, 2017). Selain itu, apabila pengelolaan terhadap sampah kertas yang tidak benar seperti dibakar, akan menyebabkan polusi udara dan mengganggu keseimbangan lingkungan sekitar. Al-Quran surat Al-A'raaf (7) ayat 56 yang berbunyi:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَأَدْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ

Artinya: “Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya dan Berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah Amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik”.

Kalimat “dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya” di atas menyebutkan bahwa Allah melarang segala perbuatan yang menimbulkan kerusakan di bumi dan hal-hal yang dapat

membahayakan kelestariannya. Manusia hidup di muka bumi ini berdampingan dengan lingkungan, alam, hewan dan tumbuhan yang membentuk satu kesatuan yaitu ekosistem. Lingkungan sangat berpengaruh terhadap kehidupan manusia. Alam memiliki daya dukung yang sangat penting bagi kelangsungan hidup manusia itu sendiri. Sehingga, alam harus tetap dijaga agar tetap lestari dan manusia dapat memanfaatkannya dengan sebaik mungkin.

Manusia merupakan makhluk yang diperintahkan oleh Allah untuk melestarikan lingkungan hidupnya dan mengurangi segala dampak buruk akibat limbah. Semakin banyak limbah yang dihasilkan oleh umat manusia tanpa pengolahan yang tepat maka semakin cepat bumi ini hancur. Oleh sebab itu maka pemanfaatan limbah sangatlah penting untuk mencegah bumi ini kotor dan hancur. Manusia juga diperintahkan untuk berdoa dan memohon belas kasih pada Allah SWT.

Hidrolisis kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) dapat dilakukan secara enzimatik maupun kimia. Hidrolisis secara enzimatik lebih efisien karena menggunakan mikroorganisme yang sifatnya ramah lingkungan dan prosesnya lebih mudah (Fuadi, 2015). Proses hidrolisis enzimatik kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) membutuhkan enzim selulase. Fungi dan bakteri merupakan jenis mikroorganisme yang dapat memproduksi enzim selulase. Salah satu mikroorganisme utama dalam hidrolisis selulosa adalah bakteri karena mikroorganisme ini banyak terdapat di alam dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya (Hasibuan, 2009). Waktu yang dibutuhkan dalam produksi enzim selulase dari kelompok bakteri lebih pendek karena bakteri memiliki tingkat pertumbuhan lebih cepat dibandingkan fungi (Alam *et al.*, 2004).

Ukuran molekul selulase yang dimiliki oleh bakteri juga lebih kecil jika dibandingkan dengan fungi. Hal ini menyebabkan proses difusi ke dalam jaringan tumbuhan yang mengandung selulosa lebih mudah (Li dan Gao, 1997 dalam Saropah *et al.*, 2012).

Bacillus subtilis merupakan mikroorganisme penghasil enzim selulase. Bakteri jenis *Bacillus* merupakan bakteri yang memiliki aktivitas CMCase dan endoglukanase untuk menghidrolisis substrat selulosa yang bersifat kristal (Reddy *et al.*, 2016). *Bacillus subtilis* memiliki kelebihan tersendiri dalam produksi enzim selulase dibandingkan dengan jenis *Bacillus* yang lain. Bakteri ini memiliki aktivitas selulase yang lebih tinggi dibanding jenis bakteri yang lain. Dalam penelitiannya, (Reddy *et al.*, 2016). mengisolasi tanah yang sudah terkontaminasi limbah industri kertas dan dikulturkan pada media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) dan limbah kertas. Dari isolasi tersebut didapatkan dua strain bakteri yang memiliki kemampuan selulolitik. Strain bakteri yang memiliki aktivitas selulase paling optimal yaitu *Bacillus subtilis*. Menurut Reddy *et al.* (2016) *Bacillus subtilis* yang diuji dalam substrat CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) memiliki aktifitas CMCase 1,00 (U/ml) sedangkan pada substrat limbah kertas memiliki aktifitas CMCase 1,11 (U/ml). Selain *Bacillus subtilis*, didapatkan isolate bakteri lain yakni *Bacillus cereus*. Bakteri ini ketika diuji dalam substrat CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) memiliki aktifitas CMCase 0,70 (U/ml) sedangkan pada substrat limbah kertas memiliki aktifitas CMCase 0,75 (U/ml). Dalam penelitian Perdana (2017) tentang karakterisasi enzim selulase yang dihasilkan oleh *Bacillus cereus* pada substrat CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) diperoleh hasil bahwa bakteri ini memiliki aktifitas CMCase sebesar 0,70 (U/ml).

Menurut Irawati (2016) dalam penelitiannya tentang karakterisasi enzim selulase kasar pada *Bacillus circulans* dengan substrat CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) menyebutkan aktifitas enzim selulase oleh *Bacillus circulans* yaitu 0,0217 (U/ml).

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dijelaskan di atas, dapat diketahui bahwa *Bacillus subtilis* memiliki aktifitas selulase yang lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri lainnya. Aruna dan Mangalayaki (2018) menjelaskan bahwa *Bacillus subtilis* merupakan bakteri yang memiliki kompleks enzim *Endoglucanase*, *Exoglucanase*, β -*Glycosidase*, dan juga *Xylanase*. Kompleks enzim ini akan bekerjasama dalam menghidrolisis selulosa menjadi glukosa.

Bacillus subtilis memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim selulase atas kuasa Allah SWT. Hal ini telah dijelaskan dalam Al-Quran Surat Al-Hijr (15) ayat 20 yang berbunyi:

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعَايِشَ وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ

Artinya: “dan Kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, dan (Kami menciptakan pula) makhluk-makhluk yang kamu sekali-kali bukan pemberi rezki kepadanya”.

Maksud dari ayat tersebut adalah Allah SWT telah memberikan rezeki kepada masing-masing makhluk yang diciptakanNya. Rezeki yang diberikan antara satu makhluk dengan makhluk lainnya berbeda sesuai kebutuhan. Dalam kuasa Allah, antar makhluk ini dapat bermanfaat dan saling melengkapi satu sama lain. Makhluk Allah yang diberikan rezeki salah satunya yaitu bakteri *Bacillus subtilis*. Mikroorganisme ini diberikan Allah kemampuan untuk menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri dapat dimanfaatkan untuk membantu memecah sumber karbon selulosa menjadi glukosa. Hal ini tentu

bermanfaat bagi kehidupan manusia khususnya dalam menjaga keseimbangan lingkungannya. Dalam ayat ini Allah juga menegaskan bahwasanya hanya Dia lah Dzat yang maha pemberi rezeki bagi setiap makhluk yang diciptakanNya.

Faktor penting yang sangat mempengaruhi aktivitas enzim adalah suhu dan pH. Setiap enzim memiliki suhu dan pH tertentu untuk dapat melakukan aktifitasnya secara maksimal. Kecepatan reaksi suatu enzim akan menurun drastis apabila suhu yang digunakan terlalu tinggi. Hal ini disebabkan karena enzim merupakan protein yang apabila pada suhu tinggi akan mengalami denaturasi atau kerusakan. Begitu pula jika pH yang digunakan mengalami pergeseran. Maka akan menyebabkan perubahan signifikan pada reaksi yang dikatalisis enzim (Murray *et al*, 2013). Dalam penelitian (Sholihati, 2015) tentang produksi dan uji aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* dengan metode *Nelson-Somogy* pada substrat CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) menunjukkan aktivitas enzim selulase tertinggi terjadi pada lingkungan pH optimum 6,0 sebesar $4,3661 \times 10^{-3}$ U/mL dan aktivitas enzim selulase tertinggi terjadi pada lingkungan suhu optimum 30°C sebesar $5,6609 \times 10^{-3}$ U/mL. Reddy *et al* (2016) menyebutkan bahwa *Bacillus subtilis* menunjukkan aktifitas selulase tertinggi pada pH optimum 6-7 sedangkan untuk suhu optimum yaitu 45°C dengan aktifitas selulase $0,941 \pm 0,02$ U/ml.

Berdasarkan pernyataan di atas dapat diketahui bahwa kerja suatu enzim sangat dipengaruhi oleh lingkungan yang ada di sekitarnya. Setiap enzim memiliki suhu dan pH optimal untuk aktifitasnya. Adanya penentuan kondisi suhu dan pH optimal pada enzim hasil produksi *Bacillus subtilis* dalam hidrolisis substrat kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) bekas perlu dikaji lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari pH dan suhu terhadap enzim selulase

yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* dalam menghidrolisis kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) bekas sebagai bahan baku pembuatan bioetanol.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu

1. Berapa suhu optimum untuk aktivitas enzim selulase kasar dari *Bacillus subtilis* dalam hidrolisis kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) bekas?
2. Berapa pH optimum untuk aktivitas enzim selulase kasar dari *Bacillus subtilis* dalam hidrolisis kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) bekas?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu

1. Mengetahui suhu optimum untuk aktivitas enzim selulase kasar dari *Bacillus subtilis* dalam hidrolisis kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) bekas.
2. Mengetahui pH optimum untuk aktivitas enzim selulase kasar dari *Bacillus subtilis* dalam hidrolisis kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) bekas.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat kepada publik tentang informasi pH dan suhu optimum enzim selulase *Bacillus subtilis* dalam menghidrolisis kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) bekas sebagai bahan baku pembuatan bioetanol.

1.5 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini yaitu,

1. Aktivitas enzim selulase *Bacillus subtilis* dalam menghidrolisis kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) bekas tinggi pada suhu optimum.
2. Aktivitas enzim selulase *Bacillus subtilis* dalam menghidrolisis kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) bekas tinggi pada pH optimum.

1.6 Batasan Masalah

Batasan Masalah dalam penelitian ini yaitu,

1. Isolat Bakteri yang digunakan adalah isolat *Bacillus subtilis* (Koleksi Laboratorium Universitas Brawijaya).
2. Variasi kondisi pH yang digunakan adalah 6,7,8
3. Variasi kondisi suhu yang digunakan adalah, 30°C,35 °C,40 °C, 45 °C
4. Metode yang digunakan untuk mengetahui aktivitas enzim selulase *Bacillus subtilis* adalah metode DNS (*asam 2,3-dinitrosalisilat*)
5. Karakter yang ingin diketahui (pH dan suhu) didapatkan berdasarkan data nilai aktivitas enzim selulase tertinggi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kajian Penelitian dalam Perspektif Islam

2.1.1 Pemanfaatan Limbah dalam Islam

Allah menjelaskan dalam Alquran surah Al-A'raaf (7) ayat 56 yang berbunyi:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ

Artinya: “Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya dan Berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah Amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik”.

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah telah melarang segala perbuatan atau tingkah laku yang dapat menimbulkan kerusakan di muka bumi yang dapat membahayakan kelestariannya. Hal ini dijelaskan oleh Allah dalam kalimatNya “Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya. Manusia sebagai makhluk Allah yang paling sempurna diperintahkan untuk mengelola alam dengan sebaik-baiknya supaya kelestarian alam tetap terjaga. Salah satu cara yang dapat dilakukan yaitu mengurangi dampak limbah yang dihasilkan oleh aktifitas manusia itu sendiri dengan mengolahnya secara baik dan benar. Kemudian, Allah memerintahkan manusia untuk selalu berdoa kepadaNya dengan keikhlasan doa bagiNya, dengan diiringi rasa takut terhadap siksaanNya dan berharap akan pahalaNya. Sesungguhnya orang-orang yang berbuat kebaikan padaNya dekat dengan rahmat Allah.

Kementrian Agama Republik Indonesia memberikan tafsir pada ayat di atas bahwa Allah melarang manusia untuk berbuat kerusakan di muka bumi. Bumi dan segala isinya telah diciptakan oleh Allah SWT untuk kepentingan manusia.

Diharapkan, sebagai khalifah di bumi ini, manusia dapat mengolah dan memanfaatkannya dengan sebaik mungkin. Dengan begitu, manusia dapat mendapatkan kesejahteraan dalam kehidupannya. Larangan berbuat kerusakan yang Allah sebutkan dalam ayat di atas yaitu membuat kerusakan pada kehidupan dan sumber-sumber penghidupan seperti perdagangan, pertanian, dan lain-lain serta membuat kerusakan lingkungan dimana manusia itu hidup (Departemen Agama RI, 2010).

2.1.2 Bakteri dalam Islam

Allah SWT. berfirman dalam surah An Nahl (16) 13 yang berbunyi,

وَمَا ذَرَأَّا لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ

Artinya: "Dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran" (Q.S. an-Nahl [16]: 13).

Ayat di atas menyebutkan bahwasanya Allah SWT. telah menciptakan berbagai makhluk di muka bumi ini dengan sangat beragam. Allah menciptakan manusia, hewan, tumbuhan, dan segala yang ada di bumi dengan bentuk beragam sesuai dengan kebutuhan dan manfaatnya masing-masing. Setiap makhluk yang Allah ciptakan pasti memiliki keunikan dan keistimewaan. Hal ini tentu menunjukkan tanda-tanda kekuasaan Allah dan sebagai pelajaran bagi manusia. Allah mengingatkan hambaNya melalui tanda-tanda kekuasaanNya yang menakjubkan (Syaikh, 2007). Salah satu makhluk yang Allah ciptakan dengan keistimewaan yaitu mikroorganisme jenis bakteri. Bakteri adalah makhluk Allah yang dapat menghasilkan suatu enzim untuk mendegradasi limbah-limbah organik

menjadi sesuatu yang lebih bermanfaat untuk kepentingan manusia. Hal ini menunjukkan adanya peranan penting bakteri dalam kelangsungan hidup makhluk lain.

Suatu enzim sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan seperti suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, dan keberadaan inhibitor dalam melakukan aktivitasnya (Hames dan Hooper, 2005). Hal ini telah dijelaskan dalam al-Qur'an surat Faathir [35]: 20 – 21 yang berbunyi

وَلَا الظُّلُمَاتُ وَلَا النُّورُ وَلَا الظُّلُّ وَلَا الْحَرُّورُ

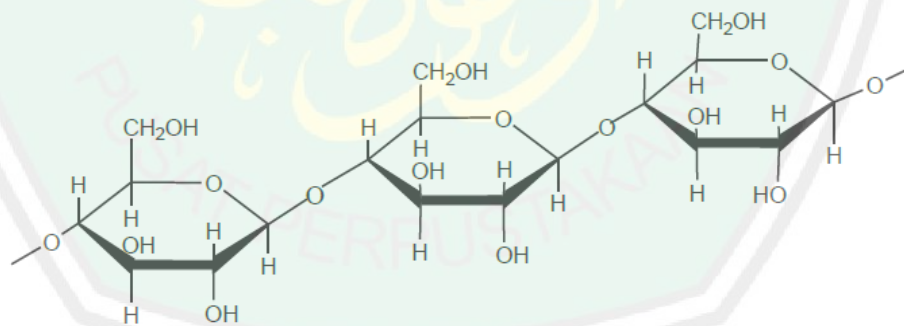
Artinya: “Dan tidak (pula) sama gelap gulita dengan cahaya. Dan tidak (pula) sama yang teduh dengan yang panas” (Q.S. Faathir [35]: 20 – 21).

Lafadz **والانسر والالظلمت** pada ayat di atas memiliki arti “tidak sama antara gelap gulita dengan cahaya, serta tidak sama pula antara keteduhan dengan kepanasan”. Lafadz **الحرور** memiliki arti “tidak akan terjadi kecuali jika adanya sinar matahari di siang hari”. Sedangkan **السمم** (angin panas) terjadi pada waktu malam. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan suatu makhluk hidup adalah teduh dan panas (Al-Qurthubi, 2009). Ayat di atas dapat dikaitkan dengan kerja enzim. Enzim dapat bekerja optimum apabila faktor-faktor pendukung kerja enzim dapat berfungsi secara maksimal. Faktor penting yang sangat mempengaruhi aktivitas enzim adalah suhu dan pH. Setiap enzim memiliki suhu dan pH tertentu untuk dapat melakukan aktifitasnya secara maksimal. Kecepatan reaksi suatu enzim akan menurun drastis apabila suhu yang digunakan terlalu tinggi. Hal ini disebabkan karena enzim merupakan protein yang apabila pada suhu tinggi akan mengalami denaturasi atau kerusakan. Begitu pula jika pH yang digunakan mengalami pergeseran. Hal ini akan menjadi akan menyebabkan

perubahan signifikan pada reaksi yang dikatalisis enzim. Faktor lingkungan sangat berpengaruh terhadap kerja suatu enzim.

2.2 Selulosa

Selulosa adalah polimer glukosa (D-glukosa) yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glikosidik dan membentuk rantai linier. Rantai yang memiliki struktur linier ini menyebabkan selulosa bersifat tidak mudah larut dan kristalin. Selulosa tidak mudah pecah atau dihidrolisis secara kimia maupun mekanis. Secara umum, selulosa berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin di alam membentuk dinding sel tumbuhan (Holtzapfle *et al*, 2003). Unit dasar pembentuk selulosa merupakan 2 unit gula (D-glukosa) yang disebut dengan selobiosa (Lehninger, 1993). Menurut Sjoström (1995), selulosa memiliki struktur sebagai berikut:



Gambar 2.1 Struktur Selulosa (Sjoström, 1995)

Selulosa selalu ditemukan bersama polisakarida lain seperti lignin, hemiselulosa, pektin, dan xilan saat berada di alam. Selulosa dan lignin apabila berasosiasi disebut dengan lignoselulosa. Selulosa tersusun oleh mikrofibrin di

dalam sel tumbuhan dimana senyawa ini terdiri dari beberapa molekul yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik sehingga sulit diuraikan (Fitriani, 2003). Mikrofibrin selulosa memiliki dua susunan yakni kristal (85%) dan amorf (15 %). Hambatan utama dalam menghidrolisis selulosa adalah adanya struktur krostal dan lignin di dalam selulosa (Sjostrom, 1995). Aktifitas suatu mikroorganisme dapat membantu menguraikan komponen komponen tersebut. Bakteri dan fungi merupakan beberapa jenis mikroorganisme yang mampu menghidrolisis selulosa (Sukumaran, 2005).

Hidrolisis selulosa dapat dilakukan secara kimia maupun biologi. Dalam proses kimia, proses hidrolisis selulosa dibantu oleh asam atau basa. Sedangkan, dalam proses biologi dibantu oleh mikroorganisme selulolitik yang berasal dari jamur ataupun bakteri (Galbe dan Zacchi, 2007). Hidrolisis sempurna selulosa oleh mikroorganisme selulolitik akan melepaskan karbondioksida dan air pada kondisi aerob. Sedangkan, dalam kondisi anaerob akan melepaskan karbondioksida, metana, dan air. Mikroorganisme dapat membantu proses hidrolisis karena mampu menghasilkan suatu enzim. Enzim ini disebut dengan enzim selulase yang mampu memecah ikatan β -1,4 glikosidik pada substrat selulosa. Apabila selulosa mampu terhidrolisis secara sempurna akan menghasilkan glukosa, sedangkan apabila selulosa tidak terhidrolisis secara sempurna akan menghasilkan disakarida dari selulosa yang disebut dengan selobiosa (Galbe dan Zacchi, 2007).

2.3 Enzim Selulase

Enzim merupakan senyawa protein yang mampu meningkatkan kecepatan suatu reaksi. Enzim ini membantu mengubah substrat menjadi produk dimana enzim ini sendiri tidak mengalami perubahan (Adhiyanto, 2006). Enzim selulase merupakan enzim yang mampu mengubah selulosa melalui proses katalis untuk melepaskan glukosa (Santos *et al.*, 2012). Enzim selulase termasuk enzim ekstraseluler dimana enzim ini menghidrolisis polimer di lingkungan dengan melepas sel ke lingkungan. Produksi enzim selulase berada di dalam sel mikroorganisme selulolitik yang dikeluarkan dari sel menuju ke dalam sistem pencernaan untuk mencerna selulosa (Masfufatun, 2011). Tiga tipe enzim yang menyusun enzim selulase adalah *endoglucanase* (endo-1,4- β -D-glukanase), *eksoglucanase* (ekso-1,4- β -D-glukanase) dan *selobiase* (β -D-glukosidase) (Murashima *et al.*, 2002). Enzim ini saling bekerja sama satu sama lain dalam proses degradasi selulosa menjadi glukosa (Fikrinda, 2000). Hal ini menyebabkan enzim selulase semakin diminati dalam hidrolisis substrat selulosa menjadi produk bioetanol (Sukumaran *et al.*, 2005).

Fungi dan bakteri merupakan jenis mikroorganisme yang dapat memproduksi enzim selulase. Salah satu mikroorganisme utama dalam hidolisis selulosa adalah bakteri karena mikroorganisme ini banyak terdapat di alam dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya (Hasibuan, 2009). Waktu yang dibutuhkan dalam produksi enzim selulase dari kelompok bakteri lebih pendek karena bakteri memiliki tingkat pertumbuhan lebih cepat dibandingkan fungi (Alam *et al.*, 2004). Ukuran molekul selulase yang dimiliki oleh bakteri juga lebih kecil jika dibandingkan dengan fungi. Hal ini menyebabkan proses difusi ke dalam jaringan

tumbuhan yang mengandung selulosa lebih mudah (Li dan Gao, 1997 dalam Saropah *et al.*, 2012).

Fungi yang memiliki kemampuan selulolitik diantaranya *Trichoderma longbrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, *T. koningii*, *T. hamatum*, *T. Pseudokoningii*, *T. aureoviride*, *T. pilulfemm*, dan *Aspergillus terreus* (Hermawan, 2009). Enzim selulase dapat juga dihasilkan oleh bakteri-bakteri sebagai berikut, *Clostridium*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Acetivibrio* (Ozaki *et al.*, 1991), *Micrococcus* dan *Pseudomonas* (Nandimath *et al.*, 2016). *Micromonospora bispora*, *Acidothermus cellulolyticus*, *Bacillus sp.*, *Streptomyces flavogriseu*, *Cytophaga sp.*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Thermomonospora fusca*, *T. curvata*, *Cellulomonas uda*, *Ruminococcus albus* dan *Clostridium stercorarium* merupakan beberapa bakteri yang dapat memproduksi enzim selulase (Philippidis, 1991). Enzim selulase dapat diproduksi pada membran sel contohnya pada bakteri *Cytophaga sp.*, Pada bakteri *Cellvibrio vulgaris*, enzim selulase merupakan hasil ekstraseluler. Bakteri *Cellvibrio filvus* memproduksi enzim selulase dari keduanya yakni membrane dan hasil ekstraseluler. Komposisi enzim selulase dari jenis bakteri dan fungi berbeda. Bakteri selulolitik memproduksi *endoglucanase* dan atau *selobiofosforilase*. Enzim ini mempercepat perubahan selobiosa menjadi glukosa dan glukosa-1-fosfat atau β -glukosidase atau keduanya (Philippidis, 1991).

2.4 Mekanisme Kerja Enzim Selulase

Hidrolisis selulosa dapat dilaksanakan dengan metode hidrolisis asam atau enzim. Proses hidrolisis asam dan enzim sebenarnya sama, yang menjadi pembeda adalah jenis katalis yang digunakan. Pada hidrolisis asam digunakan katalis asam dan pada hidrolisis enzim digunakan katalis enzim. Hidrolisis dengan enzim lebih menguntungkan pada lingkungan karena tidak menggunakan zat berbahaya sehingga lebih aman jika dibandingkan dengan hidrolisis asam (Taherdazeh dan Kartini, 2007). Kompleks enzim endo-1,4- β -D-glukanase (endoselulase atau CMC-ase), ekso-1,4- β -D-glukanase (selobiohidrolase) dan β -glukosidase (selobiase) merupakan kompleks enzim yang terlibat di dalam degradasi selulosa (Ikram *et al.*, 2005). Dua tahap penting dalam hidrolisis selulosa menjadi glukosa secara enzimatik yaitu, pertama selulosa mengalami pemecahan ikatan glikosidik menjadi selobiosa oleh β -1,4-glukanase. Tahap kedua yaitu selobiosa mengalami pemecahan ikatan β -1,4-glikosidik menjadi glukosa oleh β -glukosidase (Fox, 1991).

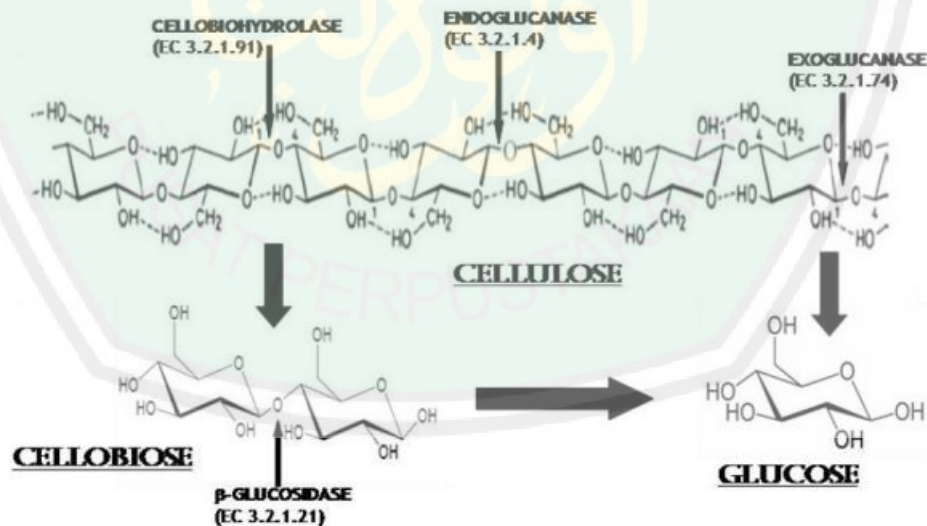
Berdasarkan spesifikasi substrat masing-masing enzim, ada empat kelompok enzim penting yang berperan sebagai komponen penyusun selulase yaitu (Yunasfi, 2008):

1. Endo- β -1,4-glukanase menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosida secara acak.

Enzim ini tidak menghidrolisis selobiosa tetapi menghidrolisis selodekstrin.

Selodekstrin adalah selulosa yang telah dilongarkan oleh asam fosfat dan selulosa yang telah disubstitusi seperti CMC dan HES (Hidroksi Etil Selulosa).

2. β -1,4-D-glukan selobiohidrolase (EC.3.2.1.91), enzim ini berperan menghasilkan selobiosa pada ujung rantai selulosa non pereduksi. Selodekstrin diserang oleh enzim ini namun, selulosa yang telah disubstitusi serta tidak dapat menghidrolisis selobiosa tidak diserang.
3. β -1,4-D-glukan glukohidrolase (EC.3.2.1.74). Enzim ini berperan menghasilkan glukosa pada ujung rantai selulosa non pereduksi. Enzim ini menyerang selulosa yang telah dilonggarkan dengan asam fosfat, selo-oligosakarida dan CMC.
4. β -1,4-D-glukosidase (EC.3.2.1.21). Enzim ini menghasilkan glukosa dengan menghidrolisis selobiosa dan selo-oligosakarida rantai pendek. Enzim ini tidak menyerang selulosa atau selodekstrin. Berdasarkan penjelasan di atas, mekanisme hidrolisis enzimatik terhadap selulosa diilustrasikan sebagai berikut (Morana *et al.*, 2011):



Gambar 2.2 Skema tahap hidrolisis enzimatik (Morana, *et al.*, 2011)

2.5 Faktor-Faktor yang Berpengaruh pada Aktivitas Enzim Selulase

Faktor-faktor yang berpengaruh dalam kinerja suatu enzim antara lain pH, suhu, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, dan keberadaan inhibitor (Hames dan Hooper, 2005). Penjelasan rinci mengenai faktor-faktor yang berpengaruh dalam aktivitas enzim adalah sebagai berikut:

1) Suhu

Dua cara suhu yang dapat mempengaruhi aktifitas enzim adalah satu, suhu yang semakin tinggi dapat meningkatkan energi termal molekul substrat. Suhu yang semakin tinggi dapat menghasilkan energy yang dapat melebihi energi aktivasi dan meningkatkan tingkat reaksi. Kedua, adanya perubahan struktur protein yang menyusun enzim diakibatkan oleh suhu yang semakin tinggi. Hal ini dapat memutus interaksi nonkovalen (ikatan hidrogen, gaya van der Waals dan interaksi lainnya) yang menopang struktur tiga dimensi enzim (Hames dan Hooper, 2005).

Kecepatan reaksi kimia enzim akan meningkat seiring dengan kenaikan suhu eksternal. Denaturasi enzim yaitu rusaknya struktur protein enzim terjadi apabila kenaikan suhu terjadi terlalu tinggi. Perubahan pada ikatan ionik dan ikatan *hydrogen* merupakan tanda denaturasi enzim. Kerusakan struktur protein ini menyebabkan penurunan kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim (Saropah *et al.*, 2012). Kinetika enzim semakin meningkat dengan adanya suhu tinggi. Hal ini berguna untuk mencapai titik yang diperlukan untuk merusak ikatan kovalen yang menyusun struktur tiga dimensi enzim. Hal ini menyebabkan rantai polipeptida menjadi tidak terlipat (*unfolding*), rusak dan disertai aktivitas reaksi menurun secara drastis. Setiap enzim memiliki rentang suhu tertentu agar tetap stabil

(Murray *et al.*, 2003). Aktivitas enzim selulase berada pada kisaran suhu inkubasi 35-80 °C agar tetap stabil (Fitriani, 2003).

2) pH

pH optimum adalah sifat pH yang menunjukkan aktivitas katalitik maksimum. Reaksi yang dikatalis enzim akan mengalami perubahan besar apabila terjadi perubahan pH. Selain itu, apabila berada pada pH yang tidak maksimal, akan menyebabkan denaturasi protein. Kisaran pH dalam aktifitas enzim selulase adalah pH 5,5-8,0 (Murray *et al.*, 2003). Aktivitas suatu enzim sangat dipengaruhi oleh konsentrasi ion. Pusat aktif enzim harus berada dalam keadaan ionisasi yang tetap agar menjadi aktif. Setiap enzim memiliki pH optimum, maksimum dan minimum (Murray *et al.*, 2003).

3) Konsentrasi Substrat

Konsentrasi substrat dapat meningkatkan atau menurunkan kecepatan reaksi suatu enzim. Konsentrasi substrat yang semakin tinggi akan meningkatkan kecepatan reaksi apabila konsentrasi substrat lebih sedikit dibandingkan konsentrasi enzim. Konsentrasi substrat memiliki kadar tertentu dalam meningkatkan aktifitas reaksi. Peningkatan kadar substrat tidak akan mempengaruhi kecepatan reaksi ketika enzim jenuh dengan substrat (Volk dan Wheeler, 1988).

4) Konsentrasi Enzim

Kecepatan reaksi akan semakin meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim pada kondisi substrat tertentu (Poedjiadi, 2006). Penambahan konsentrasi enzim akan meningkatkan kecepatan reaksi hingga batas konsentrasi tertentu. Namun, dengan konsentrasi enzim yang semakin tinggi akan menyebabkan

hidrolisis substrat konstan. Hal ini disebabkan karena penambahan enzim sudah tidak efektif lagi (Reed, 1975).

5) Inhibitor Enzim

Inhibitor enzim adalah molekul yang dapat mengganggu bahkan menghentikan reaksi (Nelson dan Cox, 2005). Inhibisi enzim dibagi menjadi dua yaitu reversible dan irreversible. Inhibisi reversible dibagi menjadi inhibitor kompetitif dan nonkompetitif. Inhibitor kompetitif akan bersaing dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif enzim. Hal ini terjadi inhibitor kompetitif memiliki struktur yang serupa dengan substrat. Inhibitor nonkompetitif bekerja dengan cara berikatan pada bagian enzim sehingga mengubah konformasi tiga dimensi protein penyusun enzim. (Sari, 2010).

Adanya ikatan kovalen yang kuat antara inhibitor dan residu asam amino pada enzim menyebabkan adanya inhibisi irreversible. Inhibitor secara efektif merusak gugus fungsional pada enzim yang esensial bagi aktivitas enzim. Inhibitor irreversible dan enzim akan membentuk ikatan kovalen. Asam amino dengan fungsi katalitik pada sisi aktif enzim dapat diidentifikasi dengan menentukan residu mana yang secara kovalen berhubungan dengan inhibitor setelah enzim diinaktivasi (Sari, 2010).

6) Aktivator Enzim

Molekul yang dapat memulihkan aktivitas enzim disebut dengan activator enzim. Ikatan antara enzim dan substrat semakin mudah dengan adanya molekul aktivator enzim. Reaksi enzim akan semakin meningkat apabila ada ikatan antara molekul aktivator dengan enzim. Kofaktor dan koenzim adalah molekul

pembentuk enzim. Kofaktor merupakan ion-ion anorganik seperti Ca, Fe, Mg, Cu Mn. Sedangkan koenzim adalah molekul organik (Martoharsono, 1997).

7) Waktu Kontak

Waktu yang berlangsung saat reaksi antara enzim dan substrat disebut dengan waktu kontak. Lama waktu reaksi mempengaruhi aktifitas kerja enzim supaya lebih efektif. Adanya penambahan waktu reaksi akan menyebabkan aktifitas enzim semakin optimal (Azis, 2012).

8) Produk Akhir

Inhibitor dalam proses degradasi selulosa adalah selobiosa dan glukosa. Dua senyawa ini merupakan produk akhir dalam degradasi selulosa. Hal ini merupakan salah satu contoh bahwa produk akhir dalam kondisi tertentu dapat menurunkan aktifitas kerja enzim (Azis., 2012).

2.6 *Bacillus subtilis*

Bakteri merupakan organisme dengan kelimpahan banyak di alam. Bakteri merupakan mikroorganisme yang dapat tumbuh dan berkembang pada berbagai macam habitat. Selain itu, bakteri merupakan mikroorganisme yang mampu menyederhanakan senyawa-senyawa kompleks. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri adalah mikroorganisme pengurai atau decomposer (Hatmanti, 2000). Bakteri merupakan organisme bersel satu yang bersifat prokariotik dan bereproduksi dengan cara pembelahan sel. Bakteri secara umum dapat hidup secara parasit atau saprofit pada makhluk hidup lainnya (Sumarsih, 2003).

Bacillus merupakan bakteri yang berbentuk basil atau batang dan termasuk ke dalam bakteri gram positif. *Bacillus* merupakan salah satu genus bakteri yang

teridentifikasi mampu menguraikan senyawa selulosa menjadi unit glukosa.. Genus *Bacillus* merupakan jenis bakteri yang mudah tumbuh dalam lingkungan kurang menguntungkan dengan membentuk endospora, tidak membahayakan makhluk hidup lain karena hidupnya secara saprofit, dan mampu hidup pada temperatur suhu 10 – 50 °C (Salle, 1984 dalam Hatmanti, 2000).

Bacillus subtilis termasuk bakteri saprofit yang hidup pada organism yang sudah mati atau mengalami dekomposisi. *Bacillus sp.* bersifat aerobic, sehingga harus diperhatikan dengan baik dalam proses fermentasi. Bakteri ini akan membentuk endospora apabila berada pada kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan. Endospora yang dibentuk oleh bakteri dapat bertahan hingga 60 tahun atau lebih pada kondisi lingkungan ekstrim (Sakti, 2012).

Bacillus subtilis merupakan bakteri gram-positif yang secara alami ditemukan di tanah dan vegetasi berbentuk batang atau basil. *Bacillus subtilis* merupakan bakteri yang bersifat mesofilik yang tumbuh pada suhu 25-35 °C. *Bacillus subtilis* merupakan bakteri yang mampu bertahan hidup pada lingkungan dengan kondisi stres seperti kondisi pH rendah (asam), bersifat alkali, kondisi *oxidative*, osmosa, dan panas atau etanol. *Bacillus subtilis* memiliki satu molekul DNA berukuran BP 4214814 (4,2 Mbp) (TIGR CMR). 4,100 kode gen protein. *Bacillus subtilis* adalah bakteri mampu menghasilkan antibiotik dalam jumlah besar ke luar sel (Sutedjo dan Kartajapoetra, 1991).

Klasifikasi *Bacillus subtilis* adalah sebagai berikut (Manual of Determinative Bacteriology, 8 th editions dalam Hadioetomo, 1985):

Kingdom : Procaryotae
Divisi : Bacteria
Kelas : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales
Family : Bacillaceae
Genus : Bacillus
Spesies : *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis merupakan bakteri antagonis yang dapat tumbuh dan berkembang pada kondisi lingkungan dengan suhu berkisar -5 hingga 75°C, dan (pH) antara 2-8. Populasi bakteri ini akan terus tumbuh dengan baik hingga 2 kali lebih banyak apabila berada pada kondisi lingkungan yang mendukung. Masa ini dikenal dengan waktu generasi. Waktu generasi atau penggandaan pada *Bacillus subtilis* adalah 28,5 menit pada suhu 40°C (Soesanto, 2008).

2.7 Aktivitas Enzim Selulase *Bacillus subtilis*

Aktivitas enzim merupakan kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan satu mikromol gula reduksi (glukosa) setiap menit (Lehninger, 1993).

Bakteri jenis *Bacillus* merupakan bakteri yang memiliki aktivitas CMCase dan endoglukanase untuk menghidrolisis substrat selulosa yang bersifat kristal. Pada umumnya bakteri dari spesies *Bacillus* memiliki beberapa keunggulan sebagai sumber selulase yaitu tidak bersifat patogen, mudah ditumbuhkan, media pertumbuhannya murah dan menghasilkan selulase dengan aktivitas yang tinggi. (Reddy *et al.*, 2016).

Bacillus subtilis memiliki kelebihan tersendiri dalam produksi enzim selulase dibandingkan dengan jenis *Bacillus* yang lain. Reddy (2016) melakukan penelitian dengan mengisolasi bakteri selulolitik yang diambil dari tanah yang sudah

terkontaminasi oleh limbah kertas. Dalam penelitiannya, ditemukan dua strain bakteri selulolitik yang memiliki kemampuan selulase lebih tinggi daripada bakteri lainnya yakni *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus*. Dua bakteri ini kemudian dimurnikan dan diuji dalam media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) dan limbah kertas untuk dilihat strain bakteri yang kemampuan selulolitiknya paling optimum. Diantara dua strain bakteri tersebut, *Bacillus subtilis* menampilkan aktivitas selulase terbesar menggunakan substrat CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) dan limbah kertas. *Bacillus subtilis* pada substrat CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) memiliki aktifitas CMCase sebesar 1,00 (U/ml) sedangkan pada substrat yang sama, *Bacillus cereus* memiliki aktifitas CMCase lebih rendah yaitu sebesar 0,70 (U/ml). Pada substrat limbah kertas *Bacillus subtilis* memiliki aktifitas CMCase sebesar 1,11 (U/ml) sedangkan pada substrat yang sama, *Bacillus cereus* memiliki aktifitas CMCase lebih rendah yaitu sebesar 0,75 (U/ml). Pada penelitian ini menunjukkan aktifitas selulase tertinggi pada suhu 45 °C dan pH 7. Hal ini dapat dilihat dalam tabel sebagai berikut (Reddy *et al.*, 2016):

Tabel 2. 1 Produksi Selulase Isolat Bacillus Media CMC (Reddy *et al.*, 2016)

Isolates	CMCase (U/ml)	FPase (U/ml)	Protein (mg/ml)	Sugar (mg/ml)
Isolate I <i>Bacillus subtilis</i>	1,00	0,89	3,33	0,555
Isolate II <i>Bacillus cereus</i>	0,70	0,79	2,85	0,345

Tabel 2. 2 Produksi Selulase Isolat *Bacillus* Media Limbah Kertas (Reddy *et al.*, 2016)

Isolates	CMCase (U/ml)	FPase (U/ml)	Protein (mg/ml)	Sugar (mg/ml)
Isolate I <i>Bacillus subtilis</i>	1,11	0,99	3,59	0,598
Isolate II <i>Bacillus cereus</i>	0,75	0,89	3,15	0,385

Bacillus subtilis merupakan bakteri yang memiliki kompleks enzim *Endoglucanase*, *Exoglucanase*, β -*Glycosidase*, dan juga *Xylanase*. Penelitian Aruna dan Manganalayaki (2018) menguji aktivitas kompleks enzim *Endoglucanase*, *Exoglucanase*, β -*Glycosidase*, dan juga *Xylanase* dari *Bacillus subtilis* pada substrat serbuk gergaji dan limbah sabut. Aktifitas optimum enzim oleh *Bacillus subtilis* berada pada pH 6,0 dan suhu 30 °C. Pada pH 6,0 dihasilkan endoglukanase tertinggi sebesar 32,623 (IU/ml), eksoglukanase 9,442 (IU/ml), dan β -*Glycosidase* 0,460 (IU/ml). Sedangkan pada perlakuan suhu, didapatkan hasil optimum pada perlakuan suhu 30 °C dengan endoglukanase tertinggi sebesar 9,979 (IU/ml), eksoglukanase 3,820 (IU/ml), dan β -*Glycosidase* 1,932 (IU/ml). Hal ini dibuktikan dengan tabel pengaruh suhu dan pH pada aktifitas enzim selulase oleh *Bacillus subtilis* sebagai berikut (Aruna dan Manganalayaki, 2018):

Tabel 2. 3 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Selulase *Bacillus subtilis* (Aruna dan Manganalayaki, 2018)

pH	Cellulase (IU/ml)			
	Endoglucanase	Exoglucanase	β -Glycosidase	Xylanase
6	32,623	9,442	0,460	5,062
7	30,758	8,902	0,434	4,773
8	29,048	8,407	0,410	4,508

Tabel 2. 4 Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Selulase *Bacillus subtilis* (Aruna dan Manganalayaki, 2018)

Temperatu re (°C)	Cellulase (IU/ml)			
	Endoglucanase	Exoglucanase	β -Glycosidase	Xylanase
25	9,688	3,709	0,255	1,989
30	9,979	3,820	1,932	2,049
45	8,253	3,160	0,191	1,695
55	5,502	2,106	0,128	1,130

Sholihati (2015) dalam penelitiannya tentang produksi dan uji aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* pada substrat CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) dengan metode *Nelson-Somogy* menunjukkan aktivitas enzim selulase tertinggi terjadi pada lingkungan pH optimum 6,0 sebesar $4,3661 \times 10^{-3}$ U/mL dan aktivitas enzim selulase tertinggi terjadi pada lingkungan suhu optimum 30°C sebesar $5,6609 \times 10^{-3}$ U/mL. Roopa *et al* (2017) juga melakukan penelitian tentang produksi selulase dari *Bacillus subtilis* menggunakan substrat serat *Palmyra palm*, jerami, dan juga *banana bracts*. Dari penelitian tersebut, lingkungan pH terbaik

untuk mendapatkan aktifitas enzim optimum adalah pH 7 dengan nilai aktivitas enzim sebesar $0,1519 \mu\text{mol ml}^{-1}\text{min}^{-1}$ dan suhu inkubasi 37°C .

2.8 Limbah Kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*)

Limbah kertas merupakan limbah yang mudah sekali ditemui. Umumnya kertas berbahan dasar dari alam dan berasal dari pohon atau kayu. Semakin banyak mempergunakan kertas maka semakin cepat pula bumi ini penuh dengan rusak karena keseimbangan alamnya terganggu. Unit akademik akan menghasilkan limbah kertas yang cukup besar karena segala kegiatan akademik berhubungan langsung dengan kertas (Arfah, 2017). Pemakaian kertas yang terus mengalami peningkatan menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan yaitu semakin menumpuknya kertas bekas yang masih dipandang sebagai limbah lingkungan yang tidak berguna. Menumpuknya limbah kertas bekas ini berpotensi buruk bagi lingkungan dan juga pemanasan global yang bisa terus meningkat di akibatkan oleh asap yang dihasilkan dari limbah kertas yang dibakar (Nurul *et al.*, 2017).

Proses pembuatan kertas dimulai dengan menguliti bahan baku kertas, yaitu kayu gelondongan dengan menggunakan mesin *debarker*. Kemudian kayu yang sudah dikuliti tersebut dipotong-potong ke dalam ukuran yang kecil (kurang lebih $\frac{1}{4}$ inchi) di dalam *chipper*. Potongan-potongan kayu tersebut lalu dimasak bersama-sama *sodium sulfide*, *sodium carbonate*, dan *sodium hidroksida* di dalam *digester* untuk mendapatkan *pulp* atau bubur kertas. Selanjutnya, *pulp* dibersihkan dan diputihkan di dalam *bleacher* dan diaduk dengan bahan-bahan aditif seperti

bahan pencelup, lem, resin, dan kanji di dalam *beater* untuk menghasilkan *furnish*. Setelah itu *furnish* masuk ke dalam finishing roll melalui *Fourdrinier machine* untuk diproses menjadi *continuous sheet of paper* (Hermawan, 2009).

Secara umum, proses pembuatan kertas mengalami tiga tahap yaitu *pulping*, dimana terjadi proses pelunakan bahan agar terbentuk bubur kertas. Setelah itu ada proses pemutihan dan dilanjutkan dengan proses pencetakan. Proses pemutihan pulp atau disebut juga dengan proses *bleaching* yang dapat meningkatkan kebersihan *pulp* dengan cara menghilangkan ekstraktif-ekstraktif dan zat-zat yang menyebabkan pulp menjadi kotor, yang meliputi kotoran-kotoran anorganik dan sisa kulit. Pemutih kertas biasanya menggunakan *oxidizing agent* atau *reducing agent* yang dapat menghilangkan senyawa kromofor aromatik. Oksidan yang digunakan adalah senyawa klorin, hidrogen peroksida, sodium perborat, potassium permanganat dan ozon, sedangkan reduktan yang biasa digunakan adalah sulfur dioksida dan senyawa sodium (Coniwanti *et al.*, 2015). Klorin yang digunakan dalam proses pemutihan kertas ini akan bereaksi dengan lignin yaitu serat dari kayu yang merupakan bahan baku pembuat kertas membentuk senyawa beracun yaitu dioksin. Dioksin adalah sekelompok senyawa organik terklorinasi yang memiliki empat klor, dua oksigen, dan dua cincin benzen. Klor merupakan unsur halogen yang sangat reaktif sehingga mudah bereaksi dengan senyawa organik atau senyawa lainnya. Sebagian besar organoklorin seperti dioksin dan furan menimbulkan efek racun (Gufita *et al.*, 2014). Proses *bleaching* menggunakan khlor sebagai pemutih adalah salah satu sumber terbentuknya pencemaran dioksin/furan. Apabila senyawa dioksin/furan ini mengalami proses pembakaran dapat menurunkan kualitas udara. Selain itu,

senyawa dioksin/furan sangat berbahaya bagi kesehatan tubuh manusia seperti memicu sel kanker, alergi, dan merusak susunan syaraf. Dioksin/furan dapat mengganggu sistem endokrin sehingga terjadi kerusakan sistem reproduksi dan sistem kekebalan pada makhluk hidup termasuk janin (Matsuhita, 2003)

Kertas merupakan material yang mengandung kandungan selulosa yang lebih tinggi daripada material yang lain seperti batang kayu, rumput, dan daun. Kertas memiliki kandungan selulosa tertinggi yakni 85-99 % dengan kadar lignin rendah yakni 0-15 %. Berikut data komposisi selulosa dalam beberapa sumber (Harmsen et al., 2010):

Tabel 2. 5 Komposisi Lignoselulosa dalam Beberapa Sumber (Harmsen et al., 2010)

Material Lignoselulosa	Selulosa (%)	Hemiselulosa (%)	Lignin (%)
Batang kayu keras	40-45	24-40	18-25
Batang kayu lunak	45-55	25-35	25-35
Rumput	25-40	35-50	10-30
Daun	15-20	80-85	0
Kertas	85-99	0	0-15

Kertas adalah salah satu limbah yang memiliki kandungan selulosa tinggi yaitu sekitar 80-90%. Kandungan ini lebih tinggi dibandingkan pada kayu yang rata-rata hanya memiliki selulosa sebesar 48-50% (Hermawan, 2009). Limbah kertas merupakan sumber utama biomassa selulosa yang dapat dimanfaatkan sebagai substrat untuk produksi selulase. Salah satu jenis kertas yang mengandung selulosa adalah kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*). Kertas HVS (*Houtvrij*

Schrijfpapier) sebagian besar terdiri dari selulosa dibandingkan dengan kandungan lignin atau hemiselulosa. Jika dibandingkan dengan kertas buram, glukosa yang dihasilkan oleh kertas buram akan lebih rendah karena jumlah lignin yang pada kertas buram sangat tinggi. Lignin merupakan komponen fenolik yang tidak mengandung gugus glukosa, maka produk degradasi lignin tidak menghasilkan glukosa. (Taruna, *et al.* 2010). Kandungan selulosa pada kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) cukup tinggi jika dibandingkan jenis kertas lain. Pada kertas koran jumlah selulosanya sebesar 49,14% dan lignin 1,66%. Pada HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) tinta jumlah selulosa sebesar 58,33% dan lignin 1,33% dan pada kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) kosong jumlah selulosanya sebesar 60,52% dan lignin 1,21% (Hermawan, 2009). Berikut data hasil pengujian analisa lignin dengan menggunakan analisa wise dan beberapa kandungan yang terdapat didalamnya (Hermawan, 2009).

Tabel 2. 6 Analisa Lignin pada Berbagai Jenis Kertas (Hermawan, 2009)

Jenis Kertas	Lignin	Hemiselulosa	Selulosa	Residu
Koran	1,66	31,19	49,14	8,01
HVS tinta	1,33	30,26	58,33	10,08
HVS kosong	1,21	30,26	60,51667	18,01

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel ekstrak kasar enzim selulase yang berasal dari *Bacillus subtilis* dengan substrat kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) bekas. Penelitian dilaksanakan melalui dua tahap. Tahap pertama yaitu menggunakan faktor suhu inkubasi yang terdiri dari 4 perlakuan yaitu pada suhu, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C. Tahap kedua yaitu menggunakan faktor pH hidrolisis yang terdiri dari 3 perlakuan yaitu 6, 7, dan 8. Data yang dihasilkan dari perlakuan suhu optimum pada tahap pertama, kemudian digunakan dalam tahap kedua yaitu penentuan pH optimum dalam proses hidrolisis kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) bekas. Selanjutnya, akan diketahui aktivitas enzim selulase kasar terbaik dari *Bacillus subtilis* dengan variasi suhu dan juga pH optimal.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan September - November 2019 di laboratorium Biokimia, Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yaitu,

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari dua faktor yaitu suhu dan pH. Suhu inkubasi yang digunakan memiliki 4 perlakuan yaitu suhu, 30 °C, 35°C, 40 °C, 45 °C. Sedangkan pH hidrolisis yang digunakan memiliki 3 perlakuan yaitu pH 6, 7, dan 8.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu aktivitas enzim selulase kasar yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*.

3.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol penelitian ini menggunakan spesies bakteri *Bacillus subtilis* yang sama. Jenis substrat yang digunakan adalah limbah kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) bekas dengan jumlah yang sama.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, blender, nampan, rak tabung reaksi, seperangkat alat gelas, autoklaf, mikropipet, kuvet, aluminium foil, bluetip, plastik wrap, spatula, mikroskop, hotplate, water bath, neraca analitik, kertas pH, *shaker incubator*, LAF (*Laminar Air Flow*), incubator, jarum ose, *freezer centrifuge* dingin, vortex, dan spektrofotometer.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, isolat *Bacillus subtilis* (Koleksi yang dimiliki Laboratorium Universitas Brawijaya), seperangkat bahan pewarnaan gram, H₂O₂, aquades, Ekstrak Kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) bekas, NA (*Nutrient Agar*), Alkohol 70 %, Congo red 1 %, NaOH, KNO₃, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, FeSO₄·7H₂O, K₂HPO₄, ekstrak khamir, Agar, glukosa, media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*), KNa-tartrat, reagen *dinitrosalicylic acid* (DNS), larutan NaCl 1 M, buffer sitrat fosfat 0,05 M pH untuk 6 dan 7, buffer fosfat 0,05 M untuk pH 7, buffer Tris-HCl 0,05 M untuk pH 8.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Uji Konfirmasi Isolat *Bacillus subtilis*

3.5.1.1 Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Media NA (*Nutrient Agar*) ditimbang seberat 2,3 gr dan ditambahkan dalam 100 ml aquades. Kemudian, media yang sudah ditimbang dididihkan dan dimasukkan sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, mulut tabung reaksi ditutup menggunakan kasa dan dilakukan proses sterilisasi pada autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Selanjutnya, tabung reaksi yang sudah berisi media diletakkan pada posisi miring sampai dingin dan terbentuk agar (Sholihati, 2015).

3.5.1.2 Peremajaan Isolat *Bacillus subtilis*

Peremajaan isolat *Bacillus subtilis* dilakukan dengan mengambil 1 ose *Bacillus subtilis* dan digoreskan pada media NA (*Nutrient Agar*) miring yang

sudah disiapkan sebelumnya. Langkah ini dilaksanakan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Setelah itu, isolat *Bacillus subtilis* diinkubasi suhu ruang selama 24 jam (Putri, 2014).

3.5.1.3 Pengamatan Makroskopis

Pengamatan makroskopis *Bacillus subtilis* dilakukan dengan mengamati morfologi koloni dan uji katalase. Beberapa langkah pengamatan yang dilakukan dalam pengamatan makroskopis ini adalah sebagai berikut:

1. Morfologi Koloni

Media NA (*Nutrient Agar*), dituang ke dalam cawan petri dalam keadaan steril. Kemudian isolate bakteri di gores (*streak plate*) ke dalam media NA (*Nutrient Agar*) dan ditutup rapat dengan plastic wrap. Perlakuan di atas dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Setelah itu isolate bakteri dimasukkan ke dalam oven pada suhu 37 °C dengan posisi terbalik. Setelah itu ditunggu selama 48 jam dan diamati morfologinya. Morfologi *Bacillus subtilis* yang diamati antara lain tepi koloni, bentuk koloni, warna koloni, dan juga permukaan koloni (Afzal *et al.*, 2012).

2. Uji Katalase

Diteteskan aquades pada gelas benda. Kemudian, satu ose *Bacillus subtilis* dioleskan pada gelas benda dan dicampurkan dengan aquades tadi. Selanjutnya ditambahkan 2 tetes cairan H₂O₂. Jika muncul gelembung uadra, menandakan uji katalase bernilai positif (Hamdiyati *et al.*, 2008).

3.5.1.4 Pengamatan Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis *Bacillus subtilis* dilakukan dengan uji pewarnaan gram dan pengamatan endospora. Langkah-langkah dalam pengamatan mikroskopis adalah sebagai berikut:

1. Pewarnaan Gram

Sebanyak 1 ose isolat bakteri *Bacillus subtilis* digoreskan pada gelas benda steril dan selanjutnya dilakukan proses fiksasi. 1 tetes kristal violet kemudian ditambahkan ke permukaan gelas benda yang sudah terdapat isolat bakteri dan didiamkan 1 menit. Setelah itu, gelas benda dibilas dengan air sampai warna dari kristal violet luntur dan dikeringkan di atas bunsen. Ditambahkan 1 tetes larutan iodine dan didiamkan 1 menit. dan dicuci dengan air. Setelah itu dilakukan proses pembilasan dengan alkohol 96% hingga semua zat warna luntur dan dicuci dengan air. Gelas benda kemudian dikeringkan di atas api bunsen. Ditambahkan 1 tetes safranin dan didiamkan selama 45 detik. Setelah itu, gelas benda dicuci dengan air dan dikeringkan. Gelas benda selanjutnya dilakukan pengamatan dengan mikroskop perbesaran 1000x (Pratita dan Surya, 2012).

2. Uji Endospora

Sebanyak 1 ose isolat bakteri *Bacillus subtilis* digoreskan pada gelas benda steril dan difiksasi di atas api bunsen. Selanjutnya ditetesi malachite hijau ditetaskan dan diletakkan selama 2-3 menit di atas penangas air. Setelah sudah dingin, dibilas dengan aquades. Kemudian safranin ditetaskan dan selama 60 detik didiamkan kemudian dibilas dengan air. Setelah itu, dikeringkan dan diamati dengan mikroskop. hasil

positif uji endospora ditandai dengan spora berwarna hijau dan sel vegetatif berwarna merah (Lay, 1994).

3.5.2 Uji Konfirmasi *Bacillus subtilis* terhadap produksi Enzim Selulase

3.5.2.1 Pembuatan Media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) Agar

CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) merupakan media selektif untuk pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*. Langkah pertama yaitu melarutkan pada gelas erlenmeyer CMC 1 gram, 0,075 gram KNO₃, 0,02 gram MgSO₄·7H₂O, 0,05 gram K₂HPO₄, 0,004 gram CaCl₂·2H₂O, 0,002 gram FeSO₄·7H₂O, 0,2 gram ekstrak khamir, 0,1 gram glukosa, 1,5 gram agar dengan aquadest hingga volume 100 mL. Selanjutnya larutan dididihkan dan kemudian disterikan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri (Perdana, 2017).

3.5.2.2 Uji Konfirmasi *Bacillus subtilis* terhadap Produksi Enzim Selulase

Uji konfirmasi ini dilakukan dengan pengamatan zona bening pada media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) agar. Uji ini dilakukan dengan metode *congo red* 0,1 %. *Bacillus subtilis* dioleskan pada cawan petri yang sudah berisi media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) agar dan diinkubasi 24 jam pada suhu 37 °C. *Congo red* 0,1 % kemudian ditetaskan pada permukaan media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) agar yang telah berisi isolate bakteri. Setelah itu, dilakukan pembilasan dengan NaCl 0,1 %. Zona bening yang terbentuk menunjukkan *Bacillus subtilis* memproduksi enzim selulase sehingga di sekitar daerah tersebut selulosa sudah berhasil dihidrolisis (Sholihati, 2015).

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) bekas

Menyiapkan kertas HVS (*Houtvrij Schrijfpapier*) bekas kemudian dipotong potong hingga ukuran kecil dan direndam di dalam air selama 24 jam. Setelah itu, potongan kertas ditiriskan dalam nampan dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 80 °C dan ditunggu selama 24 jam. Potongan kertas yang sudah kering kemudian diblender hingga halus. Setelah halus, bubur kertas dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan NaOH 0,1 %. Setelah itu dipanaskan di atas hotplate hingga mendidih. Setelah mendidih, bubur kertas ditiriskan kembali didalam nampan dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 80 °C selama 24 jam. Kemudian, bubur kertas kembali diblender sampai halus dan didapatkan ekstrak kering (Fuadi *et al.*, 2015).

3.5.4 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

3.5.4.1 Pembuatan Media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) Cair

Pembuatan media ini sama dengan media sebelumnya, hanya saja pada CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) agar ditambahkan dengan agar dan pada CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) cair tidak ditambahkan agar. CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) 1 gram, 0,075 gram KNO₃, 0,02 gram MgSO₄7H₂O, 0,05 gram K₂HPO₄, 0,004 gram CaCl₂H₂O, 0,002 gram FeSO₄7H₂O, 0,2 gram ekstrak khamir, 0,1 gram glukosa, 1,5 gram agar dilarutkan dengan aquadest hingga volume 100 mL. Kemudian larutan dididihkan dan disterikan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. (Perdana, 2017).

3.5.4.2 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Bacillus subtilis diinokulasikan pada 200 mL media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) cair sebanyak 2 ose. Kemudian media yang sudah berisi bakteri diinkubasi dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang selama 24 jam di *shaker incubator*. Selanjutnya inokulum diambil 10 mL dan dipindahkan dalam 100 mL media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) cair. Setelah itu, di sentrifugasi dingin pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit dengan suhu 4 °C. Kemudian, dipisahkan antara supernatant dan pellet. Supernatant diambil sebagai hasil ekstrak kasar enzim selulase (Sholihati, 2015). Selanjutnya, dilakukan uji aktivitas enzimnya dengan metode DNS (*asam 2,3-dinitrosalisilat*).

3.5.5 Metode DNS (*asam 2,3-dinitrosalisilat*)

3.5.5.1 Pembuatan Reagen DNS (*asam 2,3-dinitrosalisilat*)

Asam 3,5-*Dinitrosalicylic acid* ditimbang di dalam neraca analitik seberat 1 gram, 0,05 gram sodium sulfid, 0,2 gram fenol, dan 1 gram natrium hidroksida. Bahan-bahan ini semuanya dilarutkan di dalam aquadest sebanyak 100 ml dan disimpan di dalam wadah yang gelap. (Miller 1959 dalam Perdana, 2017).

3.5.5.2 Pembuatan KNa-Tartrat 40%

KNa-Tartrat sebanyak 20 gram ditimbang di dalam neraca analitik dan dilarutkan di dalam erlemeyer dengan aquades sebanyak 50 ml. Selanjutnya larutan yang sudah jadi disimpan dalam wadah yang gelap (Miller 1959 dalam Perdana, 2017).

3.5.5.3 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

0,5 gram glukosa ditimbang pada neraca analitik dan dilarutkan dengan aquades 100 mL di dalam labu ukur. Selanjutnya larutan stok glukosa standar dibuat dengan konsentrasi 5000 ppm. Larutan stok tersebut diencerkan dengan konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250 dan 300 ppm (Perdana, 2017).

3.5.5.4 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Diambil 1 mL dari masing-masing larutan stok standar glukosa yang sudah dibuat sebelumnya dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, 1 mL reagen DNS ditambahkan dan dihomogenkan. Tabung reaksi ditutup rapat menggunakan aluminium foil dan dididihkan selama 5-15 menit hingga larutan berwarna merah kecoklatan. 1 mL KNa-tartrat ditambahkan dan didiamkan hingga dingin. Ditambahkan larutan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Kemudian diukur nilai absorbansi tiap larutan dengan spektrofotometer pada $(\lambda) = 540 \text{ nm}$ (Miller, 1959). Setelah didapatkan nilai absorbansinya, kurva standar glukosa dibuat di Microsoft Excel. Pada kurva tersebut, untuk mengetahui konsentrasi glukosa (x) dari sampel yang akan diukur absorbansinya digunakan persamaan garis $y = ax + b$ (Rosyada, 2015).

3.5.5.4 Analisis Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS (asam 2,3-dinitrosalisilat)

1 mL larutan ekstrak HVS (*Houtvrij Schijpapier*) bekas diambil dan ditambahkan dengan 1 ml ekstrak kasar enzim selulase dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, larutan diinkubasi 15 menit pada suhu tertentu dan pH tertentu pada water bath. Ditambahkan sebanyak 1 mL reagen DNS dan

dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, ditambahkan 1 ml KNa-Tartrat 40 % dan didinginkan selama 5 menit dan ditambahkan aquades hingga volume 10 ml dan dihomogenkan. Sampel diukur jumlah gula reduksinya pada spektrofotometer dengan (λ) = 540 nm (Perdana, 2017)

Kontrol adalah campuran enzim dan substrat tanpa inkubasi dan ditambahkan dengan DNS. Sampel adalah reaksi enzim dan substrat dengan perlakuan inkubasi, dan ditambahkan dengan DNS. Blanko adalah campuran DNS, aquades, dan substrat (Maranatha, 2008). Nilai absorbansi yang dihasilkan diplotkan dalam kurva standar yang sudah dijelaskan dalam prosedur sebelumnya untuk mengetahui konsentrasi glukosa pada sampel. Jumlah μmol glukosa hasil hidrolisis enzim selulase tiap satu menit pada kondisi pengujian dinyatakan sebagai Satu unit aktivitas enzim selulase. Perhitungan nilai aktivitas selulase adalah sebagai berikut (Kombong, 2004) :

$$AE = \frac{C}{BM \text{ glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Keterangan :

AE = Nilai Aktivitas Enzim (Unit/mL)

C = Konsentrasi produksi glukosa

BM = Berat Molekul Glukosa (180 g/mol)

T = Waktu yang digunakan pada inkubasi (menit)

H = Volume Total Enzim-Substrat (mL)

E = Volume Enzim (mL)

3.5.6 Uji Aktivitas Enzim Selulase

3.5.6.1 Suhu optimum

4 tabung reaksi disediakan dan diisi masing masing tabung dengan ekstrak kertas HVS bekas sebanyak 1 ml. Kemudian 1 mL buffer fosfat 0,05 M pH 7 ditambahkan dalam tabung reaksi. 1 mL ekstrak kasar enzim selulase ditambahkan dan diinkubasi pada suhu berbeda yakni, 30°C, 35°C, dan 40°C, 45°C. Proses inkubasi dilakukan di dalam waterbath dengan waktu 15 menit dan setelah itu didinginkan pada suhu ruang. Analisis aktivitas enzim dilakukan dengan metode DNS (*asam 2,3-dinitrosalisilat*) sesuai prosedur sebelumnya. Suhu optimal yang dihasilkan digunakan untuk menentukan pH optimal selulase (Perdana, 2017)

3.5.6.2 pH optimum

3 tabung reaksi disediakan dan diisi masing masing dengan ekstrak kertas HVS bekas sebanyak 1 ml. Kemudian ditambahkan 1 mL buffer pada setiap perlakuan pH. Untuk pH 6 dan 7 digunakan buffer sitrat fosfat 0,05 M, untuk pH 8 digunakan buffer Tris-HCl 0,05 M. Masing-masing tabung ditambahkan kembali dengan ekstrak kasar enzim selulase sebanyak 1 ml. Kemudian, diinkubasi pada waterbath selama 15 menit menggunakan suhu optimal yang sudah didapat pada prosedur sebelumnya. Selanjutnya, didinginkan pada suhu ruang dan analisis aktivitas enzim menggunakan metode DNS (*asam 2,3-dinitrosalisilat*) (Perdana, 2017)

3.5.7 Analisis Data

Data produksi glukosa dan nilai aktivitas enzim selulase (U/mL) yang dihasilkan kemudian dilakukan analisis varians (One Way ANOVA) untuk mengetahui adanya perbedaan nilai aktivitas enzim selulase. Apabila terjadi perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji Tukey taraf 5 % untuk mengetahui adanya perbedaan nyata pada masing-masing perlakuan. Semua analisis ini dilakukan dengan aplikasi SPSS.



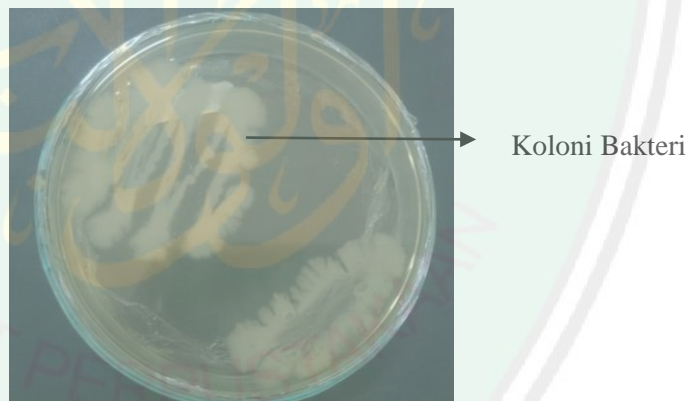
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Aktivitas Enzim Selulase dalam Hidrolisis Kertas HVS (*Hourvrij Schrijfpapier*) Bekas berdasarkan Variasi Suhu

4.1.1 Uji Konfirmasi *Bacillus subtilis*

Sebelum melakukan analisis aktivitas enzim berdasarkan variasi suhu dan pH, dilakukan uji konfirmasi terhadap *Bacillus subtilis*. Uji ini bertujuan untuk mengkonfirmasi bahwa bakteri yang digunakan dalam penelitian ini benar-benar *Bacillus subtilis*. Uji konfirmasi yang dilakukan meliputi pengamatan terhadap koloni bakteri, uji metabolisme bakteri dengan uji katalase, uji pewarnaan gram, dan uji endospora.



Gambar 4.1.1 Hasil Pengamatan Morfologi *Bacillus subtilis*

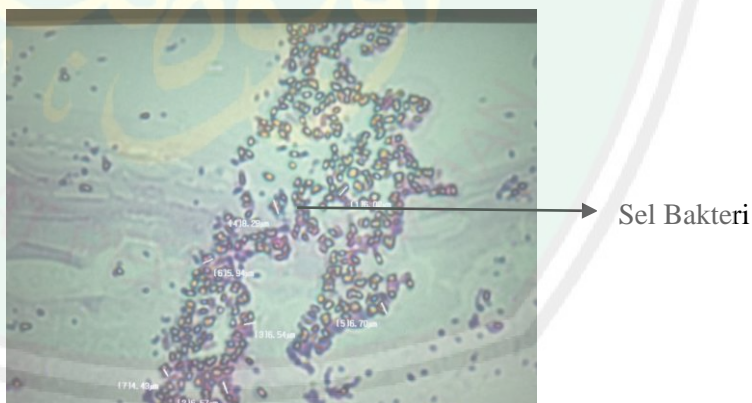
Berdasarkan hasil pengamatan pada gambar 4.1.1, *Bacillus subtilis* secara makroskopis memiliki koloni isolat yang berwarna putih susu dengan bentuk rata pada permukaan media. Koloni *Bacillus subtilis* menyebar dengan cepat pada permukaan media agar dan tepi koloninya tidak beraturan. Hal ini didukung oleh Reddy *et al* (2016) yang menyatakan bahwasanya isolat *Bacillus subtilis* memiliki

warna putih susu dengan permukaan koloni rata, tepi yang tidak beraturan, motil dan menyebar dengan cepat pada permukaan media agar.

Menurut Hatmanti (2000) jenis *Bacillus* memiliki bentuk koloni yang berbeda – beda pada media NA (*Nutrient Agar*). Koloni bakteri ini umumnya berwarna putih sampai kekuningan atau putih suram. Tepi koloni *Bacillus* bermacam – macam namun, umumnya tidak rata. Bakteri jenis ini memiliki permukaan kasar, tidak berlendir, dan ada juga yang cenderung kering bebubuk. Bentuk koloninya besar dan tidak mengkilat. Bentuk koloni dan ukuran bakteri ini sangat beraneka ragam tergantung jenisnya. Setiap jenis menunjukkan kemampuan dan ketahanan yang berbeda – beda terhadap kondisi lingkungan tempat tinggalnya seperti ketahanan terhadap panas, kadar garam, asam, dan sebagainya.

Selanjutnya yaitu uji metabolisme bakteri menggunakan uji katalase. Berdasarkan data hasil pengamatan, *Bacillus subtilis* bersifat katalase positif. Hal ini ditandai dengan munculnya gelembung udara pada saat uji katalase. Uji katalase merupakan suatu metode pengujian pada isolat bakteri yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim katalase untuk memecah H_2O_2 (Hidrogen peroksida) pada proses respirasi aerob menjadi O_2 (Oksigen) dan H_2O (dihidrogen oksida). Menurut Reddy *et al* (2016) *Bacillus subtilis* merupakan isolat bakteri dengan proses oksidasi positif dan uji katalase positif. Istiqomah (2015) menambahkan bahwasanya uji katalase adalah proses mengidentifikasi mikroba yang menghasilkan enzim katalase yang digunakan untuk memecah H_2O_2 (Hidrogen peroksida) pada proses respirasi aerob menjadi O_2 (Oksigen) dan H_2O (dihidrogen oksida) yang tidak toksik.

Pengamatan selanjutnya yaitu uji pewarnaan gram. Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwasanya *Bacillus subtilis* merupakan bakteri gram positif. Hal ini ditandai dengan adanya warna ungu pada koloni bakteri. Gambar hasil pengamatan dapat dilihat pada gambar 4.1.2. Adanya warna ungu disebabkan karena *Bacillus subtilis* memiliki dinding sel yang dapat mengikat zat warna kristal violet. Hal ini didukung oleh Sholihati (2015) yang menyatakan bahwasanya *Bacillus subtilis* merupakan salah satu jenis bakteri Bacillus yang termasuk ke dalam bakteri gram positif. Sutrisna (2013) menyebutkan bahwa warna ungu pada hasil pewarnaan gram menunjukkan zat warna kristal violet dapat diikat oleh dinding sel bakteri. Struktur dinding sel bakteri gram positif terdiri dari membran dalam dan lapisan peptidoglikan yang tebal. Lapisan ini dapat menyerap sekaligus mengikat zat warna kristal violet. Kristal violet yang sudah diikat oleh dinding sel bakteri ini tidak akan luntur oleh alkohol.



Gambar 4.1.2 Hasil Uji Pewarnaan Gram *Bacillus subtilis*

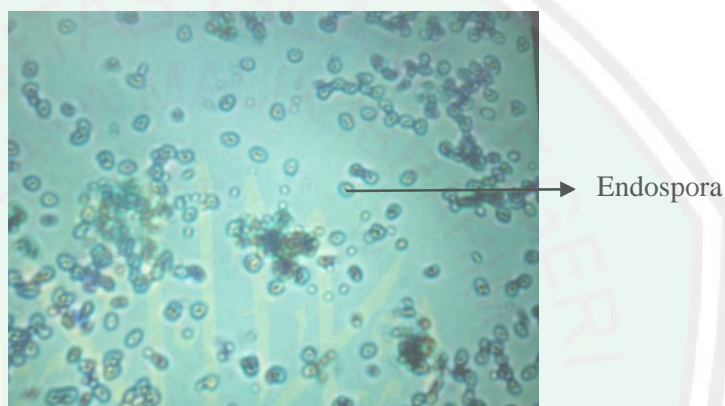
Berdasarkan morfologi isolat *Bacillus subtilis* pada pewarnaan gram, sel bakteri terlihat memiliki bentuk batang pendek dengan jumlah koloni berpasangan yang terdiri dari 1-2 sel. Koloni bakteri memiliki ukuran sel 4 μm – 8 μm . Hal ini

didukung oleh Yu (2013) yang menyebutkan bahwasanya sel *Bacillus subtilis* berbentuk batang, dengan panjang sekitar 4-10 mikrometer (μm) dan diameter 0,25-1,0 μm , dengan volume sel sekitar 4,6 fL di fase stasioner. Menurut Bakti (2012) *Bacillus* sp. berbentuk batang dengan ukuran sel 0,3 – 2,2 μm x 127 – 7,0 μm . *Bacillus* sp. merupakan perwakilan dari bakteri genus gram positif yang dapat ditemukan di alam (tanah, air, dan debu di udara).

Pengamatan selanjutnya yaitu uji pewarnaan endospora. Endospora dihasilkan oleh bakteri sebagai bentuk ketahanan tinggi terhadap lingkungan yang ekstrim seperti suhu ekstrim, panas tinggi, asam, alkohol, dan sebagainya. Pengamatan spora bakteri ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya spora pada sel vegetatif bakteri. Menurut Volk dan Wheeler (1988), dalam melakukan pengamatan endospora digunakan pewarna spesifik yang disebut *malachite green* dan safranin. *Malachite green* memiliki fungsi pewarnaan spora yang ada di dalam sel bakteri. Sedangkan, safranin digunakan untuk memperjelas pengamatan. Sel vegetative akan berwarna merah dan endospora bakteri berwarna hijau. Adanya perbedaan warna tersebut menyebabkan seseorang bisa mengamati ada tidaknya spora dalam sel bakteri. Posisi spora dalam tubuh sel vegetatif juga dapat diidentifikasi.

Pewarnaan endospora bakteri menghasilkan dua jenis bakteri yaitu bakteri endospora positif dan bakteri endospora negatif. Bakteri endospora positif ditandai dengan adanya warna hijau di dalam sel bakteri. Sedangkan pada bakteri endospora negatif ditandai dengan sel vegetatif yang berwarna merah dan tidak terlihat spora hijau didalamnya. Berdasarkan data hasil pengamatan, *Bacillus subtilis* merupakan bakteri dengan endospora positif. Hal ini ditandai dengan

adanya warna hijau dalam sel bakteri. Gambar hasil pengamatan dapat dilihat pada gambar 4.1.3. Warna hijau dalam sel bakteri menunjukkan bakteri memiliki spora di dalam tubuhnya. Hal ini didukung oleh Yu (2013) yang menyatakan bahwa *Bacillus subtilis* dapat membentuk endospora yang digunakan untuk bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang ekstrim dan suhu lingkungan yang terlalu tinggi.



Gambar 4.1.3 Hasil Pengamatan Endospora *Bacillus subtilis*

Menurut Hatmanti (2000) *Bacillus* merupakan salah satu dari enam bakteri yang dapat menghasilkan endospora. Endospora ada yang berbentuk elips, oval, bulat maupun silinder yang terbentuk di dalam sel vegetative. Endospora ini membedakan bakteri jenis *Bacillus* dengan tipe bakteri pembentuk eksospora. Ilmuwan Cohn pada tahun 1872 mendeskripsikan spora *Bacillus subtilis* yang awalnya disebut *Vibrio subtilis* oleh Ehrenberg pada tahun 1835. Cohn menunjukkan bahwa spora tersebut memiliki ketahanan yang lebih dibandingkan sel vegetatifnya.

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah diuraikan dalam paragraf di atas, isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini sudah sesuai dengan isolat yang

dikehendaki peneliti yakni *Bacillus subtilis*. Isolat *Bacillus subtilis* memiliki koloni isolat yang berwarna putih susu dengan bentuk rata pada permukaan media, serta tepi koloninya tidak beraturan. Koloni *Bacillus subtilis* berbentuk batang pendek dengan ukuran sel 4 μm – 8 μm . *Bacillus subtilis* merupakan koloni bakteri yang bersifat katalase positif, bakteri gram positif, dan endospora positif. Uji konfirmasi bakteri dapat juga ditambahkan dengan berbagai uji yang lain supaya hasil yang didapatkan lebih maksimal. Reddy, *et al* (2016) menjelaskan dalam penelitiannya untuk mengidentifikasi bakteri dapat dilakukan dengan berbagai parameter. Parameter yang diteliti yaitu pengamatan morfologi, uji indol, uji merah Metil, uji Voges Proskauer, uji pemanfaatan Sitrat, uji katalase, uji oksidase, uji Gelatin, uji motilitas, uji Amilase, Nitrat, uji karbohidrat, serta uji molekul DNA.

Allah SWT. telah menciptakan bumi dan seluruh isinya untuk kemaslahatan hidup makhluk- makhlukNya. Bakteri yang merupakan makhluk Allah yang berukuran sangat kecil saja Allah ciptakan dan penuhi semua kebutuhan hidupnya. Ini adalah bukti kebesaran Allah SWT. Hal ini seperti disebutkan dalam Alquran Surah Yunus (10) : 61

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُو 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

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 zarah (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).*”

Al-Jazairi (2007) menjelaskan dalam *Tafsir Al-Aisar* bahwasanya Allah SWT adalah dzat yang Maha luas ilmu dan pengetahuannya. Allah juga memberitahukan pada semua makhlukNya atas semua kuasanya. Makhluk Allah paling kecil atau *dzarrah* pun tidak pernah luput dari kuasa dan pengetahuannya. *Dzarrah* adalah semut kecil yang baik. Dia diciptakan Allah di muka bumi atau di atas langit. *Dzarrah* dapat berupa sesuatu yang lebih kecil atau lebih besar dari semut kecil itu. Semua itu sudah ditetapkan Allah dalam kitabNya yaitu *Lauhul Mahfudz*. Musthofa (1942) menambahkan dalam *Tafsir Al-Maraghi* bahwa semut kecil dan segala sesuatu yang mirip dengan hewan kecil itu misal cahaya matahari atau debu disebut dengan *dzarrah*.

Berdasarkan beberapa tafsir yang telah disebutkan di atas, *dzarrah* adalah makhluk kecil yang Allah ciptakan baik di bumi atau di langit. *Dzarrah* berukuran sangat kecil, ada yang bisa dilihat dengan mata telanjang dan ada juga yang tidak bisa dilihat secara langsung melainkan harus dengan alat bantu. Namun begitu, meskipun *dzarrah* berukuran sangat kecil, Allah tidak pernah luput untuk menunjukkan kuasa dan pengetahuannya. Salah satu makhluk Allah yang dinamakan *dzarrah* adalah bakteri. Bakteri adalah makhluk Allah yang tidak bisa dilihat dengan mata telanjang namun memiliki banyak manfaat dalam kehidupan manusia. Dalam penelitian ini, bakteri dimanfaatkan untuk menghidrolisis substrat selulosa berupa kertas menjadi glukosa. Bakteri ini adalah *Bacillus subtilis* yang dapat menghasilkan enzim selulase untuk merombak substrat selulosa menjadi glukosa.

4.1.2 Uji Konfirmasi Aktivitas Enzim Selulase yang Dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*

Menurut Abou-Taleb *et al* (2009) dalam memproduksi enzim selulase, CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) merupakan media dan substrat terbaik untuk menginduksi bakteri dalam menghasilkan enzim tersebut. Lee (2008) menambahkan bahwa CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) merupakan suatu polimer *anionic* yang umum digunakan untuk pengujian aktivitas selulase. Kim *et al.* (2000) menjelaskan bahwa CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) merupakan polimer dengan bobot molekul tinggi yang menjadikannya tidak bisa ditranspor ke dalam sel mikroorganismenya. Oleh sebab itu, menurut (Sari,2010) enzim pendegradasi CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) akan ditahan pada permukaan dinding sel bakteri atau dilepaskan ke luar sel. Enzim selulase yang disekresikan oleh isolat bakteri akan berdifusi masuk ke dalam permukaan media agar. Berdasarkan sekresi enzim yang diproduksi oleh mikroorganismenya, maka enzim selulase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* termasuk ke dalam enzim ekstraseluler.



Gambar 4.1.4 Visualisasi Zona Bening pada Uji Produksi Enzim Selulase

Berdasarkan gambar 4.1.4, isolat bakteri *Bacillus subtilis* terbukti mampu menghasilkan enzim selulase. Hal ini ditandai dengan munculnya zona bening di sekitar koloni bakteri *Bacillus subtilis*. Terbentuknya zona bening ini menunjukkan adanya selulosa yang telah dimanfaatkan oleh *Bacillus subtilis* dan terdegradasi menjadi glukosa. Adanya perubahan rantai polisakarida menjadi sakarida dengan rantai yang lebih pendek tidak dapat menyerap pewarna *congo red* 0,1%. Sehingga, muncullah zona yang lebih jernih dibandingkan dengan zona yang lain (zona bening).

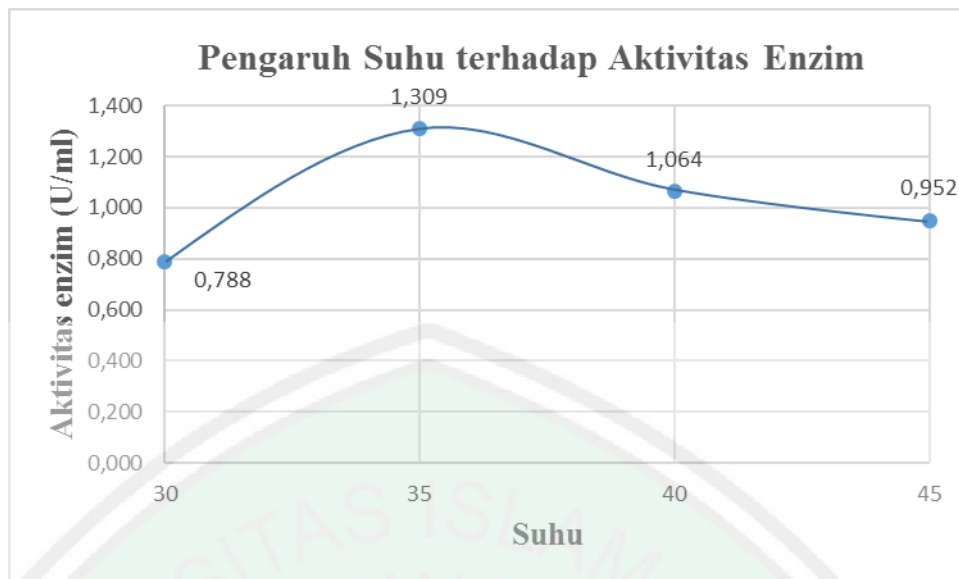
Ratnakomala (2010) menyebutkan bahwa zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri mampu memanfaatkan selulosa yang terdapat di dalam media tumbuhnya. Zona bening merupakan indikator bahwa selulosa telah terdegradasi menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu disakarida atau monosakarida. Zhang *et al.* (2006) menjelaskan jika *congo red* 0,1% akan berdifusi ke dalam media agar dan akan diabsorpsi oleh rantai panjang polisakarida dengan ikatan β -D-glukan. Menurut Sudarmaji *et al.* (1997) pewarna *congo red* 0,1% merupakan pewarna indikator dengan rentang pH 3-5,2. Adanya penambahan NaCl 0,1% yang memiliki pH 7 berfungsi untuk mengubah warna *congo red* 0,1% yang tidak diikat oleh polisakarida (selulosa). Sehingga, zona bening yang muncul di sekitar koloni bakteri akan terlihat lebih jelas.

Aktivitas enzim selulase dapat diukur secara semi kuantitatif berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk di sekitar koloni *Bacillus subtilis*. Pengukuran ini dilakukan dengan menggunakan jangka sorong dan dihitung melalui rumus Indeks Aktivitas Selulase (IAS). Berdasarkan data hasil pengukuran zona bening, *Bacillus subtilis* memiliki nilai indeks aktivitas selulase

(IAS) sebesar 1,039 mm. Hal ini menunjukkan bahwa Indeks Aktivitas Selulase (IAS) dari isolat bakteri *Bacillus subtilis* termasuk ke dalam kategori sedang. Menurut Choi *et al.* (2005) nilai IAS (Indeks Aktivitas Selulase) dikatakan dalam rasio sedang apabila memiliki nilai antara 1-2 mm.

4.1.3 Uji Aktivitas Enzim Selulase dalam Hidrolisis Kertas HVS (*Hourvrij Schrijfpapier*) Bekas

Suhu sangat mempengaruhi kinerja suatu enzim. Aktivitas enzim bekerja dalam kisaran suhu tertentu. Suhu yang paling tepat untuk melakukan suatu reaksi enzimatis disebut sebagai suhu optimum. Kenaikan suhu yang terjadi di dalam suatu reaksi enzim dapat mengakibatkan kerusakan yang menyebabkan terganggunya sisi aktif enzim dan kecepatan reaksi berkurang. Selain itu, penurunan suhu akan menyebabkan tidak aktifnya enzim sehingga mengganggu proses reaksi (Poedjadi dan Supriyanti, 2006). Setiap enzim yang dihasilkan oleh bakteri memiliki suhu optimum tertentu untuk bekerja secara maksimal. Adanya perbedaan suhu optimum yang dimiliki oleh setiap bakteri menunjukkan bahwa setiap enzim selulase tersebut memiliki karakter yang berbeda (Volk dan Wheeler, 1988).



Gambar 4.1.5 Aktivitas Enzim Selulase berdasarkan Variasi Suhu

Berdasarkan data hasil pengukuran aktivitas enzim pada gambar 4.1.5, aktivitas enzim selulase pada suhu 30 °C sebesar 0,788 U/ml, pada suhu 35 °C sebesar 1,309 U/ml, suhu 40 °C memiliki aktivitas selulase sebesar 1,064 U/ml, dan pada suhu 45 sebesar 0,952 U/ml. Aktivitas tertinggi dihasilkan pada perlakuan suhu 35 °C dengan aktivitas selulase sebesar 1,309 U/ml. Hal ini menunjukkan bahwa suhu optimum untuk aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* dalam hidrolisis kertas HVS (*HourVrij Schrijfpapier*) bekas adalah suhu 35 °C. Menurut Tarigan (2015) pada suhu optimum, terjadi proses tumbukan yang terjadi antara enzim dan substrat sangat baik sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat semakin mudah dan terjadi peningkatan produk yang dihasilkan. Saropah *et al* (2012) menjelaskan bahwa enzim yang bekerja secara maksimal pada suhu 20 – 50 °C termasuk dalam golongan mesozim. Sedangkan, enzim selulase yang aktif bekerja pada suhu 50 – 80 °C disebut dengan golongan termozim atau termostabil (tahan terhadap panas) (Meryandini *et al*, 2009).

Berdasarkan penjelasan tersebut, enzim selulase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* termasuk ke dalam golongan mesozim.

Aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* mengalami peningkatan pada suhu 30 °C menuju 35 °C. Hal ini disebabkan oleh adanya kenaikan suhu yang mengakibatkan peningkatan energi kinetik. Semakin meningkatnya energi kinetik menyebabkan tumbukan antara substrat dan enzim semakin bertambah dan mempermudah pembentukan kompleks enzim substrat sehingga, produk yang dihasilkan semakin meningkat dan aktivitas enzim tentu lebih besar. Hames dan Hooper (2005) menjelaskan bahwa peningkatan suhu dapat meningkatkan energi termal molekul substrat. Peningkatan ini akan menghasilkan energy yang dapat melebihi energy aktivasi dan meningkatkan tingkat reaksi. Meryandini *et al* (2009) menambahkan bahwa ketika ada kenaikan suhu sampai batas optimum, maka kecepatan reaksi dari enzim akan naik karena energy kinetic juga bertambah. Aktivitas energy kinetik yang bertambah ini akan mempercepat translasi, gerak vibrasi, dan rotasi baik enzim maupun substrat.

Penurunan aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* terjadi pada kisaran suhu 40 °C dan 45 °C. Hal ini terjadi karena suhu tersebut sudah melebihi batas optimal, sehingga aktivitas katalis dari enzim selulase sudah menurun dan enzim sudah terdenaturasi. Meryandini *et al* (2009) menjelaskan apabila suhu sudah melewati batas optimalnya, maka konformasi substrat akan berubah dan tidak bisa masuk ke dalam sisi aktif enzim. Hal ini menyebabkan produksi glukosa menjadi rendah karena tidak terbentuknya kompleks enzim substrat. Menurut Whitaker (1994) suhu yang terlalu tinggi dapat mempengaruhi ikatan hidrogen yang berperan dalam menjaga konformasi enzim sehingga sisi aktif

enzim tidak bekerja secara maksimal. Kondisi panas tertentu dapat mengakibatkan ikatan hidrogen tersebut putus. Putusnya ikatan hidrogen ini akan memudahkan ikatan hidrogen selanjutnya dalam rantai polipeptida mejadi putus sehingga protein enzim mengalami kerusakan.

Berdasarkan data analisis statistik ANOVA, perlakuan variasi suhu terhadap aktivitas enzim menunjukkan adanya pengaruh dengan nilai sig adalah 0,011. Analisis statistik kemudian dilanjutkan dengan uji tukey untuk mengetahui adanya perbedaan nyata di setiap perlakuan suhu. Data hasil uji tukey menunjukkan bahwa perlakuan suhu 35 °C memberikan adanya perbedaan nyata dibandingkan dengan perlakuan suhu yang lain yaitu dengan notasi B. Hal ini dapat dilihat pada lampiran L.7.1. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa aktivitas selulase terbesar berada pada suhu optimum 35 °C dengan nilai aktivitas enzim sebesar 1,309 U/ml.

Hasil penelitian ini jika dibandingkan dengan penelitian lain tentang enzim selulase dari *Bacillus subtilis* dengan substrat CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) memiliki aktifitas yang lebih tinggi. Penelitian Sholihati (2015) menyebutkan aktifitas selulase dari *Bacillus subtilis* pada substrat CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) dengan metode Nelson-Somogy memiliki aktivitas optimal $5,6609 \times 10^{-3}$ U/ml pada suhu 30 °C. Deka *et al* (2011) dalam penelitiannya menggunakan berbagai variasi konsentrasi substrat CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) menunjukkan aktivitas optimal enzim selulase sebesar 0,43 U/ml dengan konsentrasi CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) sebesar 1,8 %. Reddy *et al* (2016) dalam penelitiannya menggunakan substrat CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) sebagai sumber karbon dan suhu 45 °C menyebutkan aktivitas selulase tertinggi

oleh *Bacillus subtilis* sebesar 1,00 U/ml. Berdasarkan data di atas, substrat kertas sebagai sumber karbon memiliki aktifitas selulase lebih tinggi dibanding substrat CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) karena didalam kertas mengandung substrat selulosa terbaik untuk isolasi mikroorganisme selulolitik. Hal ini sesuai dengan Reddy *et al* (2016) yang menjelaskan bahwa kertas mengandung limbah bubur yang kaya akan substrat selulosa sebagai sumber terbaik untuk mengisolasi mikroorganisme selulolitik.

Penelitian ini merupakan salah satu bentuk usaha dalam melestarikan lingkungan agar tetap seimbang. Bumi ini adalah tanggung jawab kita bersama. Apabila kita dapat memiliki hubungan timbal balik yang baik dengan bumi ini, maka kelangsungan kehidupan di bumi ini akan seimbang. Allah menjelaskan dalam Alquran surah Al-A'raaf (7) ayat 56 yang berbunyi:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ

Artinya: “Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya dan Berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah Amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik”.

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah telah melarang segala perbuatan atau tingkah laku yang dapat menimbulkan kerusakan di muka bumi yang dapat membahayakan kelestariannya. Hal ini dijelaskan oleh Allah dalam kalimatNya “Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya. Manusia sebagai makhluk Allah yang paling sempurna diperintahkan untuk mengelola alam dengan sebaik-baiknya supaya kelestarian alam tetap terjaga. Salah satu cara yang dapat dilakukan yaitu mengurangi dampak limbah yang dihasilkan oleh aktifitas manusia itu sendiri dengan

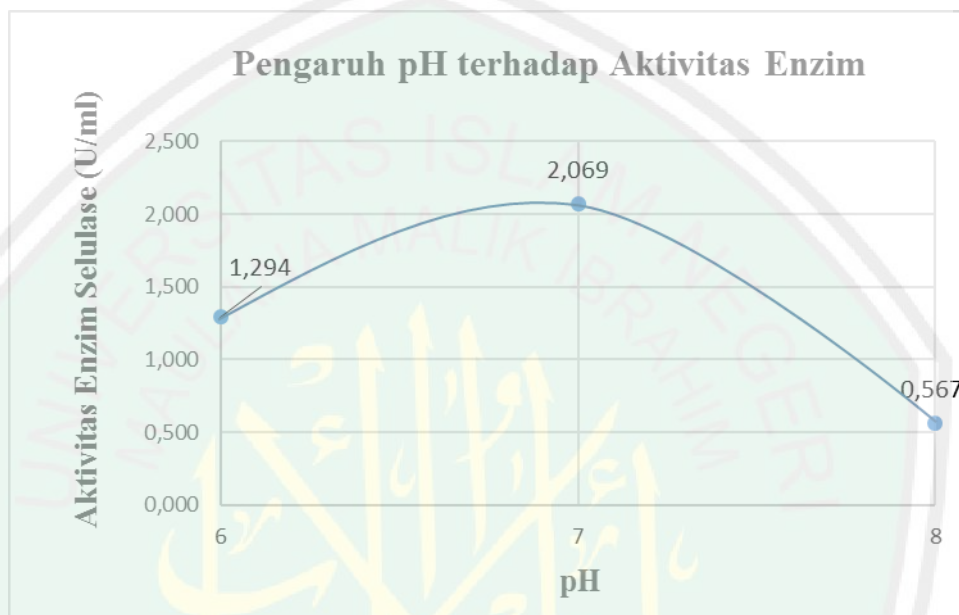
mengolahnya secara baik dan benar. Kemudian, Allah memerintahkan manusia untuk selalu berdoa kepadaNya dengan keikhlasan doa bagiNya, dengan diiringi rasa takut terhadap siksaanNya dan berharap akan pahalaNya. Sesungguhnya orang-orang yang berbuat kebaikan padaNya dekat dengan rahmat Allah.

Kementrian Agama Republik Indonesia memberikan tafsir pada ayat di atas bahwa Allah melarang manusia untuk berbuat kerusakan di muka bumi. Bumi dan segala isinya telah diciptakan oleh Allah SWT untuk kepentingan manusia. Diharapkan, sebagai khalifah di bumi ini, manusia dapat mengolah dan memanfaatkannya dengan sebaik mungkin. Dengan begitu, manusia dapat mendapatkan kesejahteraan dalam kehidupannya. Larangan berbuat kerusakan yang Allah sebutkan dalam ayat di atas yaitu membuat kerusakan pada kehidupan dan sumber-sumber penghidupan seperti perdagangan, pertanian, dan lain-lain serta membuat kerusakan lingkungan dimana manusia itu hidup (Departemen Agama RI, 2010).

4.2 Aktivitas Enzim Selulase dalam Hidrolisis Kertas *HVS (HourVrij Schrijfpapier)* Bekas berdasarkan Variasi pH

pH merupakan komponen penting bagi enzim dalam melakukan aktivitasnya. Lingkungan pH sangat mempengaruhi kinerja enzim. Adanya perubahan pH sangat berpengaruh dalam struktur dan fungsi enzim. Reaksi katalis yang dilakukan oleh enzim dapat terganggu apabila tidak berada pada lingkungan pH optimal. pH yang terlalu rendah dapat menyebabkan enzim tidak aktif, sedangkan pH yang terlalu tinggi dapat mendenaturasi enzim. Menurut Nelson dan Cox (2005), pH merupakan faktor penting dalam struktur dan aktivitas biologis enzim. Interaksi yang terjadi antara ion ion didalam strukturnya akan

menyebabkan enzim menjadi stabil dan dapat mengenali serta berikatan dengan substratnya. Murray *et al* (2003) menambahkan bahwa perubahan pada lingkungan pH enzim akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi yang sedang dikatalisis oleh enzim. Enzim dapat mengalami denaturasi / kerusakan ketika berada pada lingkungan pH yang kurang tepat.



Gambar 4.2.1 Aktivitas Enzim Selulase berdasarkan Variasi pH

Berdasarkan data pengaruh pH terhadap aktivitas enzim pada gambar 4.2.1, diketahui bahwa aktivitas enzim pada pH 6 memiliki nilai sebesar 1,294 U/ml, pH 7 memiliki aktivitas enzim 2,069 U/ml, sedangkan lingkungan pH 8 memiliki aktivitas enzim sebesar 0,567 U/ml. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulase *Bacillus subtilis* optimal pada lingkungan pH 7 dengan nilai 2,069 U/ml. Menurut Sari (2010) ketika enzim berada pada lingkungan pH 7 (netral), asam amino enzim sebanyak 90% berbentuk aktif. Kondisi pH yang terlalu asam atau basa dapat menyebabkan inaktifnya asam amino penyusun enzim. Rasul *et al* (2015) menambahkan bahwa pH netral (6-7) menyebabkan

enzim selulase bakteri bekerja secara optimal. Setiap enzim memiliki lingkungan pH berbeda beda dalam melakukan aktivitasnya secara optimal. Enzim akan aktif dan stabil dalam kisaran pH yang terbatas. Menurut (Irawadi, 1991), perubahan lingkungan pH dapat mengakibatkan perubahan tingkat ionisasi pada substrat maupun enzim. Hal ini menyebabkan lingkungan pH sangat berpengaruh pada aktivitas enzim selulase.

Aktivitas enzim selulase dalam penelitian ini mengalami penurunan drastis saat memasuki pH 8 dengan nilai 0,567 U/ml. Hal ini terjadi karena lingkungan pH terlalu tinggi bagi enzim sehingga mengalami denaturasi. Menurut Utarti *et al* (2009) adanya perubahan asam amino enzim mengakibatkan sisi aktif enzim menjadi tidak aktif dan aktivitas enzim menurun karena kompleks enzim substrat sudah tidak berikatan. Suhartono (1989) menyebutkan bahwa enzim merupakan protein yang disusun oleh asam amino yang dapat mengikat proton, karboksil, dan juga gugus fungsional lainnya. Gugus fungsional yang terdapat pada sisi aktif enzim sangat berpengaruh dalam reaksi katalisis enzim. Gugus fungsional bisa terdapat pada kondisi asam amino asam maupun asam amino basa (Whittaker, 1994). Dalam penelitian ini, gugus fungsional asam amino pada sisi aktif enzim tidak terionisasi sehingga aktivitas enzim menjadi rendah saat kondisi basa. Salle (1997) menyatakan bahwa asam amino enzim harus berada dalam kondisi ionisasi yang stabil supaya menjadi aktif karena asam amino inilah pusat aktif enzim. Adanya pergeseran nilai pH dapat menyebabkan asam amino berada dalam kondisi ionisasi yang tidak stabil sehingga menjadi tidak aktif dan mengakibatkan nilai aktivitas enzim rendah.

Berdasarkan data analisis brown forshyte, perlakuan variasi pH terhadap aktivitas enzim menunjukkan tidak adanya pengaruh dengan nilai sig adalah 0,219. Hal ini terjadi karena kisaran atau rentang pH yang digunakan kurang jauh sehingga tidak menunjukkan perubahan yang nyata. Dalam penelitian selanjutnya hal ini dapat menjadi koreksi sehingga hasil yang didapatkan menjadi lebih baik. Karena hasil analisis statistik menunjukkan tidak adanya perubahan yang nyata antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya, maka data dianalisis secara deskriptif.

Aktivitas enzim optimal berdasarkan lingkungan pH pada penelitian ini memiliki kisaran nilai pH yang sama dengan penelitian sebelumnya. Penelitian Sholihati (2015) tentang produksi dan uji aktivasi enzim selulase *Bacillus subtilis* menunjukkan pH optimal untuk aktivitas enzim adalah pH 6 dengan nilai $4,3661 \times 10^{-3}$ U/ml. Reddy *et al* (2016) menyebutkan bahwa pH optimal dalam aktivitas enzim selulase oleh *Bacillus subtilis* adalah pH 6-7 dengan aktivitas selulase sebesar 0,6 – 0,9 U/ml. Roopa *et al* (2017) dalam penelitiannya tentang produksi selulase *Bacillus subtilis* menggunakan limbah serat *Palmyra Palm* menunjukkan aktivitas tertinggi pada pH 7 dengan nilai $0,1519 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$. Hal ini menunjukkan bahwa lingkungan pH terbaik untuk aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* adalah pH netral 7. Fikrinda (2000) menjelaskan bahwa kisaran pH optimum untuk aktivitas selulase yaitu pada rentang 4,5-7.0. Pada kondisi pH netral, asam amino sebagai pusat aktif enzim dapat terionisasi secara optimal sehingga dapat mengaktifkan sisi aktif enzim dan aktivitas enzim menjadi lebih meningkat.

Allah SWT. menciptakan segala sesuatu sesuai dengan kadarnya masing-masing. Allah telah membuat aturannya secara pasti dengan ukuran yang sesuai dengan kebutuhan setiap makhlukNya. Allah selalu menciptakan segala sesuatu baik yang besar atau yang kecil, yang di langit atau yang di bumi, sesuai dengan kadar dan aturan yang telah ditetapkan oleh Allah SWT. Hal ini dijelaskan Allah dalam Alqur'an Surah Al Qomar (54) : 49 yang berbunyi,

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya : *“Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran”*

Menurut tafsir oleh Syaikh Muhammad bin Shalih asy-Syawi, ayat *“Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran,”* ini memiliki arti bahwa Allah telah menciptakan seluruh makhluk di bumi dan di langit. Allah adalah satu-satunya pencipta seluruh alam dan tiada sekutu bagiNya. Allah telah menciptakan segala sesuatu sesuai dengan ketentuan dan kuasaNya. Allah telah mencatat semua berdasarkan catatan penaNya sesuai dengan ukuran serta semua sifat yang tercakup dalam semua hal.

Bakteri diciptakan Allah dengan segala ketentuan dan ketetapan Allah sesuai dengan kebutuhan hidupnya. Begitupun dengan enzim yang sudah dihasilkan oleh bakteri. Allah sudah memberikan ukuran yang sesuai agar bekerja secara optimal. Dalam menghasilkan enzim, bakteri memiliki pH lingkungan tertentu, suhu lingkungan tertentu, dan faktor faktor lain yang menunjang kehidupannya. Antara satu bakteri dengan bakteri lainnya memiliki kadar yang berbeda-beda. Dalam penelitian ini, *Bacillus subtilis* memiliki lingkungan pH optimum 7 dan juga suhu lingkungan 35 °C

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan data hasil penelitian yang telah dijelaskan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Enzim selulase kasar dari *Bacillus subtilis* dalam hidrolisis kertas HVS (*HourVrij Schrijfpapier*) bekas memiliki aktivitas optimal pada suhu 35 °C dengan nilai aktivitas selulase sebesar 1,309 U/ml
2. Enzim selulase kasar dari *Bacillus subtilis* dalam hidrolisis kertas HVS (*HourVrij Schrijfpapier*) bekas memiliki aktivitas optimal pada pH 7 dengan nilai aktivitas selulase sebesar 2,069 U/ml.

5.2 Saran

Sebaiknya enzim selulase yang digunakan dalam penelitian ini dimurnikan terlebih dahulu sehingga hasil dari aktivitas selulase yang didapatkan menjadi lebih maksimal. Uji konfirmasi bakteri dapat ditambah supaya hasil yang didapatkan lebih maksimal. Rentang pH yang digunakan untuk aktivitas enzim selulase dapat ditambah supaya menghasilkan data yang lebih optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhiyanto,C. 2006. *Pemanfaatan Tentang Enzim dan Manfaatnya dalam Bidang Biomedik*. Jakarta: UIN Jakarta Press.
- Afzal, I., A.A. Shah., Z. Makhdam., A. Hameed., F. Hasan. 2012. Isolation and Characterization of Cellulase Producing *Bacillus cereus* MRLB1 from Soil. *Minerva Biotechnologica*. 24(3): 101-109.
- Alam, M.Z., Manchur, M.A., Anwar, M.N. 2004. Isolation, Purification, Characterization of Cellulolytic Enzymes Produced by The Isolate *Streptomyces omiyaensis*. *Pak J Biol Sci*. 7: 1647-1653.
- Anindyawati, T. 2009. *Prospek Enzim dan Limbah Lignoselulosa untuk Produksi Bioetanol*. Bogor: Pusat Pebelitian Biotechnologi LIPI
- Al-Jazairi, Syaikh Abu Bakar Jahir. 2007. Tafsir Al-Quran Al-Aisar Jilid 3. Jakarta: Darus Sunnah Press.
- Al-Qurthubi, I. 2009. Tafsir al-Qurthubi. Penerjemah: Fathurrahman Abdul Hamid, Dudi Rosyadi, dan Marwan Affandi. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Arfah, Mahrani. 2017. Pemanfaatan Limbah Kertas Menjadi Kertas Daur Ulang Bernilai Tambah Oleh Mahasiswa . *Buletin Utama Teknik*. Vol. 13, No. 1.
- Aruna A dan Mangalanayaki R., 2018. Production And Optimization Of Cellulase By *Bacillus Subtilis* Using Coir Waste And Sawdust Under Solid State Fermentation. *World Journal Of Pharmaceutical And Medical Research*. Vol 4(2), 102-108.
- Asy-syuyuti, Jalaludin dan Jalaluddin Muhammad Ibn Ahmad Al-Mahalliy. 1505. *Tafsir Jalalain*. Kairo Mesir.
- Aulanni'am. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Malang: Citra Mentari Grup
- Aziz, P. 2012. Enzim dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Laju Reaksi Enzim. *Addition Material for FIK Biochemical Experiment Class*.
- Bakti, Chandra Paska. 2012. Optimasi Produksi Enzim Selulase dari *Bacillus* sp. BPPT CC RK2 dengan Variasi pH dan Suhu menggunakan Response Surface Methodology. *Skripsi*. Depok: Fakultas Teknik UI
- Choi, Y.W., Hodgkiss, I.J., Hyde, K.D. 2005. Enzyme Production by Endophytes of *Brucea javanica*. *J Agric Tech*. 1: 55-66.

- Coniwanti, Pamilia, M. Nugra Prima Anka, Christoforus Sanders. 2015. Pengaruh Konsentrasi, Waktu dan Temperatur Terhadap Kandungan Lignin Pada Proses Pemutihan Bubur Kertas Bekas. *Jurnal Teknik Kimia* No.3, Vol.21.
- Deka, Deepmoni, P. Bhargavi, Ashish Sharma, Dinesh Goyal, M.jawed, and Arun Goyal. 2011. Enhancement of Cellulase Activity from a New Strain of *Bacillus subtilis* by Medium Optimization and Analysis with Various Cellulosic Substrates. *SAGE-Hindawi Access to Research*. doi:10.4061/2011/151656.
- Departemen Agama RI. 2010. *Al-Quran dan Tafsirnya Kementrian Agama RI*. Jakarta: Departemen Agama RI.
- Fauzi, A.F.A. 2011. *Pemanfaatna Buah Pepaya (Carica papaya L.) sebagai Bahan Baku Bioetanol dengan Proses Fermentasi dan Destilasi*. Semarang: UNDIP.
- Fikrinda. 2000. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Selulase Ekstermofilik dari Ekosistem Air Hitam. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor.
- Fitriani, E. 2003. Aktivitas Enzim Karboksimetil Selulase *Bacillus pumilus* Galur 55 pada Berbagai Suhu Inkubasi. Bogor: Kimia FMIPA IPB.
- Fox, P.F. 1991. *Food Enzymology*. New York: Elseiver Applied Science Ltd.
- Galbe, M. and Zacchi G. 2007. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Effic.
- Gufita, Fellycia, Diar Herawati , Syarif Hamdani. 2014. Analisis Kandungan Dioksin, Daya Serap dan Kandungan Klorin (Cl₂) Dalam Pembalut Wanita. *Indonesian Journal Of Pharmaceutical Science And Technology*. Vol.,Iii No.1.
- Hadioetomo, R. S. 1985. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: Gramedia 163 pp.
- Hames, D., Hooper, N. 2005. *Biochemistry*. Ed ke-4. New York: Taylor and Francis Group.
- Harmsen, P., Huijgen W., Bermudez L., and Bakker R. 2010. Literature review of physical and chemical pretreatment process for lignocellulosic biomass. *Wageningen UR Food and Biobased Research*,1184
- Hasibuan, B.E. 2009. *Pupuk dan Pemupukan*. Medan: Universitas Sumatra Utara Press.

- Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. ISSN 0216-1877. Oseana. Volume XXV, Nomor 1: 31 – 41.
- Hermawan, Yulis Aswar. 2009. Konversi Limbah Kertas Menjadi Etanol Menggunakan Kombinasi Enzim Selulase Dan Selobiase Melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak. *Skripsi*. Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Holtzaple., Mark, M., Nathan, W., Charles, D., Bruce, E., Richard, L., Y. Y., Ladisch, M. 2003. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Journal*. Purdue University.
- Ikram, U.H, Javed, M.M., Khan, T.S., dan Ziddiq, S. 2005. Cotton saccharifying activity of Cellulose produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma virid*. *Res.J. Arcic & Biol. Sci*. Volume 1, Nomor 3: 241 – 245.
- Irawadi, T.T. 1991. Produksi Enzim Ekstraseluler (Selulase dan Xylanase) dari *Neurospora sitophila* pada Substrat Limbah Padat Kelapa Sawit. *Disertasi*. Bogor: Fakultas Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Irawati, Rosyida. 2016. Karakterisasi Ph, Suhu Dan Konsentrasi Substrat Pada Enzim Selulase Kasar Yang Diproduksi Oleh *Bacillus circulans*. *Skripsi*. Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri (Uin) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Istiqomah, L. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Fitase dari Saluran Pencernaan Unggas serta Karakterisasi Fitasenya. *Tesis*. Program Pascasarjana. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Jennifer, V. dan Thiruneelakandan G. 2015. Enzymatic Activity of Marine Lactobacillus Species from South East Coast of India. *IJISSET*. 2 (1): 542-546.
- Kim, Y.S., Jung, H.C., Pan, J.G. 2000. Bacterial Cell Surface Display of an Enzyme Library for Selective Screening of Improved Cellulase Variants. *J Appl Environ Microbiol*. 66: 788-793.
- Kombong, H. 2004. Evaluasi Daya Hidrolitik Enzim Glukoamilase dari Filtrat Kultur *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Dasar*. 5: 16-20.
- 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*.

- Lay, B.W. 1994. *Analisa Mikroba di Laboratorium Edisi I*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Lee, Y. 2008. Purification and Characterization of Cellulase Produces by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 Utilizing Rice Hull. *Bioresource Technology*. 99: 378-386.
- Lehninger, A. L. 1993. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publisher.
- Li, X. dan Gao P. 1997. CMC-liquefying Enzym, a Low Molecular Mass Initial Cellulose-Decomposing Cellulose Responsible for Fragmentation from *Sterptomyces* sp. LX. *J. appl. Microbial*. 83: 56–66.
- Maranatha, B. 2008. *Aktivitas Enzim Selulase Isolat Asal Indonesia pada Berbagai Substrat Limbah Pertanian*. Skripsi. Bogor: Biologi FMIPA IPB.
- Martoharsono, S. 1997. *Biokimia Jilid I*. Yogyakarta: UGM Press.
- Masfufatun. 2011. *Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase*, *Jurnal*. Surabaya: Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.
- Meryandini, A., Widosari, W., Besty, M., Sunarti, T.C., Rachmania, N., Satria, H. 2009. Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Sains*. 13 (1): 33-38.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 31: 426.
- Morana, A. M. 2011. *Cellulase from Fungi and Bacteria and Their Biotechnological Applications*. In A. E. Golan, *Cellulase: Types and Action, Mechanism, and Uses*. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Murashima, K., A. Kosugi and R.H. Doy. 2002. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *J. Bacteriol*. 184: 5088 – 5095.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Ed ke-26. San Fransisco: McGraw-Hill.
- Musthofa, Ahmad Al-Maroghi. 1942. *Terjemahan Tafsir Al Maroghi Juz 11*. Semarang: CV Toha Putra.
- Nandimath, A. P., Kiran R. K., Shanti G. G., Arun S. K. 2016. Optimization of Cellulase Production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. Soil Isolates. *African Journal of Microbiology Research*. 10(13): 410-419.

- Nelson, D.L dan Cox, M.M. 2005. *Principles of Biochemistry*. Ed ke-4. New York: Worth Publisher
- Nurul, St. Chadijah, Kurnia Ramadani. 2017. Waktu Dan Suhu Optimum Dalam Produksi Asam Oksalat ($H_2C_2O_4$) Dari Limbah HVS Dengan Metode Peleburan Alkali. *Al Kimia*. Volume 5 Nomor 1.
- Ozaki, Katsuya and Ito S. 1991. Purification and Properties of an Acid Endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. *Journal of General Microbiology*.137: 41-48.
- Perdana, Terry Angria Putri. 2017. Karakterisasi Enzim Selulase Yang Dihasilkan Oleh Bakteri Endofit Rimpang Temulawak (*Curcuma Zanthorrhiza Roxb.*) *Bacillus Cereus* Pada Variasi Suhu, Ph Dan Konsentrasi Substrat. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Philippidis, G. P. 1991. Evaluation of The Current Status of The Cellulase Production Technology. *Biofuel Information Center*.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti T.F.M. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI press.
- Pratita, M. Y. E. dan Surya R. P. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik dari Sumber Mata Air Panas di Songgoriti setelah Dua Hari Inkubasi. *Jurnal Teknik Pomits*. 1(1): 1-5.
- Putri, F.I.C.E. 2014. Optimasi Produksi Selulase dari Bakteri Laut *Bacillus cereus*. *Skripsi*. Bogor: IPB.
- Rasul, F., Afroz, A., Rashid, U., Mehmood, S., Zeeshan, N. 2015. Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacteria from Soil and Waste (Molasses) of Sugar Industry. *Int J Biosci*. 6 (3): 230-238.
- Roopa, R., M. Charulata, and S. Meignanalakshmi. 2017. Production of Cellulase from *Bacillus subtilis* under Solid- State Fermentation Using Fiber Wastes of *Palmyra Palm*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 6(6): 2225-2231.
- Reddy, K.Venkateswar, T.Vijaya Lakshmi , A.Vamshi Krishna Reddy , V. Hima Bindu1 and M.Lakshmi Narasu. 2016. Isolation, Screening, Identification and Optimized Production of Extracellular Cellulase from *Bacillus subtilis* Sub.sps using Cellulosic Waste as Carbon Source. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Volume 5 Number 4.
- Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. New York: Academic Press.

- Rosyada, N. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Selulolitik pada Saluran Pencernaan Mentok (*Cairina moschata*). *Skripsi*. Surakarta: Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret.
- Salle. A.J. 1974. *Fundamental Principles of Bacteriology*. New Delhi: Tata Mc Graw Hill.
- Santos, T.C., Gomes, D.P.P., Bonomo, R.C.F., Franco, M. 2012. Optimisation of Solid State Fermentation of Potato Peel for The Production of Cellulolytic Enzyme. *Food Chemistry*. 133: 1299-1304.
- Sakti, P. C., 2012, Optimasi Produksi Enzim Selulase dari *Bacillus* sp. BPPT CC RK2 dengan Variasi pH dan Suhu Menggunakan Response Surface Methodology, *Skripsi*. Depok: Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Sari, W.W. 2008. Karakterisasi Selulase Bakteri Asal Tanah Pertanian Jawa Tengah dan Jawa Barat. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Saropah, A., Jannah, A., Maunatin, A. 2012. Kinetika Reaksi Enzimatis Ekstrak Kasar Enzim Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul. *Alchemy*. 2 (1): 34-45.
- Sholihati, Al Maratun, Maswati Baharudin, Santi. 2015. Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase Dari Bakteri *Bacillus subtilis*. *Al Kimia*.
- Sjostrom, E. 1995. *Kimia Kayu: Dasar-dasar dan Penggunaan*. Penerjemah Hardjono Sastrohamidjojo. Yogyakarta: Gadjadara University Press.
- Soerawidjaja, T.H. dan Amiruddin A. 2007. Mengantisipasi Pemanfaatan Bahan Lignoselulosa untuk Pembuatan Bioetanol: Peluang dan Tantangan. *Seminar Nasional Diversifikasi Sumber Energi untuk mendukung Kemajuan Industri dan Sistem kelistrikan Nasional*. Surakarta: UNS
- Sonia, N.M.O., Kusnadi, J. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Selulase dari Isolat Bakteri OS-16 Asal Padang Pasir Tengger Bromo. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3 (4): 11-19.
- Sudarmaji, S: Haryono, B dan Suhardi. 1997. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: liberty.
- Suhartono. 2008. *DoE Module 1: Introduction*. Surabaya: Institut Sepuluh November

- Sukumaran, R.K., Singhanis, R.R., Pandhey, A.S. 2005. Microbial Cellulases, Production, Applications and Challenges. *J of Science and Industrial Research*. 4: 832-844.
- Sumarsih, S., Sulistiyanto, B., Sutrisno, C. I dan Rahayu, E. S. 2012. Peran Probiotik Bakteri Asam Laktat terhadap Produktivitas Unggas. *Jurnal Litbang Provinsi Jawa Tengah*. 10 (1).
- Susanti, E. 2011. Optimasi Produksi dan Karakterisasi Sistem Selulase dari *Bacillus circulans* strain Lokal dengan Induser Avicel. *Jurnal Ilmu Dasar*. 12(1): 40 – 49.
- Syaikh, A. I. 2007. *Tafsir Ibnu Katsir*. Penerjemah: M. Abdul Ghoffar E.M. Jakarta: Pustaka Imam asy-Syafi'i.
- Taherdazeh, M.J. dan Karini, k. 2007. Acid-based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulose Materials: a review. *Bioresources*. Volume 2, Nomor 3: 472 – 499.
- Tarigan, W.F., Sumardi., Setiawan, W.A. 2015. Karakterisasi Enzim Selulase dari Bakteri Selulolitik *Bacillus* sp. Seminar Nasional Sains dan Teknologi VI.
- Taruna, H., Rita A., Tania S., Sri A. 2010. *Studi Awal Pemanfaatan Limbah Kertas HVS sebagai Bahan Baku Dalam Proses Pembuatan Etanol*. Universitas Indonesia.
- Utarti, E; Nurita, L dan Arimurti, S. 2009. Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar *Bacillus* sp 31. *Jurnal Ilmu Dasar*. 1 (1): 102 – 108.
- Volk, W.A dan Wheeler, M.F. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan Markam. Jakarta: Erlangga.
- Whittaker, J.R. 1994. *Principle of Enzymology for The Food Science Second Edition*. New York: Marcel Decker.
- Yunasfi. 2008. *Serangan Patogen dan Gangguan Terhadap Proses Fisiologis Pohon*. Universitas Sumatera Utara.
- Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. 2006. Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Selection Strategies. *Biotech Adv*. 24: 452-481.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Konfirmasi *Bacillus subtilis*

Nama Uji	Hasil Uji
Morfologi Koloni	Berwarna putih susu Bentuk rata Tepi koloninya tidak beraturan.
Pewarnaan gram	+ (*)
Uji Endospora	+ (**)
Uji Katalase	+ (***)

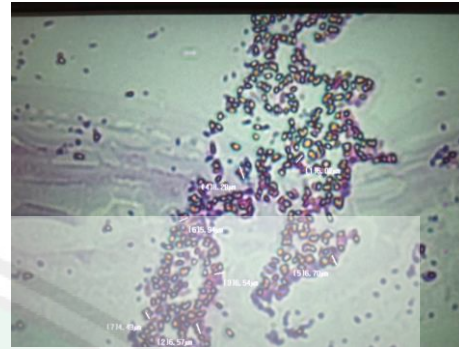
Keterangan :

- (*) Bakteri gram positif, ditandai dengan sel berwarna ungu
- (**) Mampu menghasilkan endospora, ditandai dengan endospora berwarna hijau dan sel vegetative berwarna merah muda
- (***) Muncul gelembung udara setelah ditetesi H_2O_2

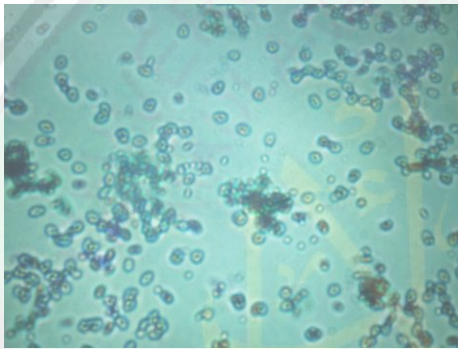
Lampiran 2. Gambar Pengamatan *Bacillus subtilis* Secara Mikroskopis



(A)



(B)



(C)

Keterangan :

- (A) Morfologi Koloni
- (B) Bakteri gram positif
- (C) Endospora Positif

Lampiran 3. Penentuan Indeks Aktivitas Selulase

L.3.1 Tabel Hasil Pengukuran Zona Bening

Isolat	Diameter luar (mm)	Diameter dalam (mm)	IAS
<i>Bacillus subtilis</i>	15,5	7,6	1,039

Keterangan :

Diameter luar (diameter zona bening + koloni)

Diameter dalam (diameter koloni)

IAS (Indeks Aktivitas Selulase)

L.3.2 Indeks Perhitungan Aktivitas Selulase

$$\text{Indeks Selulolitik} = \frac{A-B}{B}$$

Keterangan:

A = Diameter zona bening (mm)

B = Diameter koloni (mm)

Contoh :

$$\text{IAS} = \frac{(15,5-7,6)}{7,6} = 1,039$$

L.3.3 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

Lampiran 4. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

L.4.1 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Cara membuat larutan stok glukosa standar 5000 ppm adalah:

$$5000 \text{ ppm} = \frac{5000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{5 \text{ g}}{1 \text{ L}} = \frac{0,5 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

$$1 \text{ L} \quad 1 \text{ L} \quad 100 \text{ mL}$$

Untuk membuat larutan standar 5000 ppm dibutuhkan 0,5 g glukosa, dilarutkan dengan akuades sebanyak 100 mL. Kemudian larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm sebanyak 100 mL dibuat sesuai dengan perhitungan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

1) Konsentrasi 50 ppm

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

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 50 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL larutan stok glukosa} + 99 \text{ mL akuades}$$

2) Konsentrasi 100 ppm

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

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL larutan stok glukosa} + 98 \text{ mL akuades}$$

3) Konsentrasi 150 ppm

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

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 150 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 3 \text{ mL larutan stok glukosa} + 97 \text{ mL akuades}$$

4) Konsentrasi 200 ppm

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

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 200 \text{ ppm}$$

$V_1 = 4 \text{ mL larutan stok glukosa} + 96 \text{ mL akuades}$

5) Konsentrasi 250 ppm

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

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 250 \text{ ppm}$$

$V_1 = 5 \text{ mL larutan stok glukosa} + 95 \text{ mL akuades}$

6) Konsentrasi 300 ppm

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

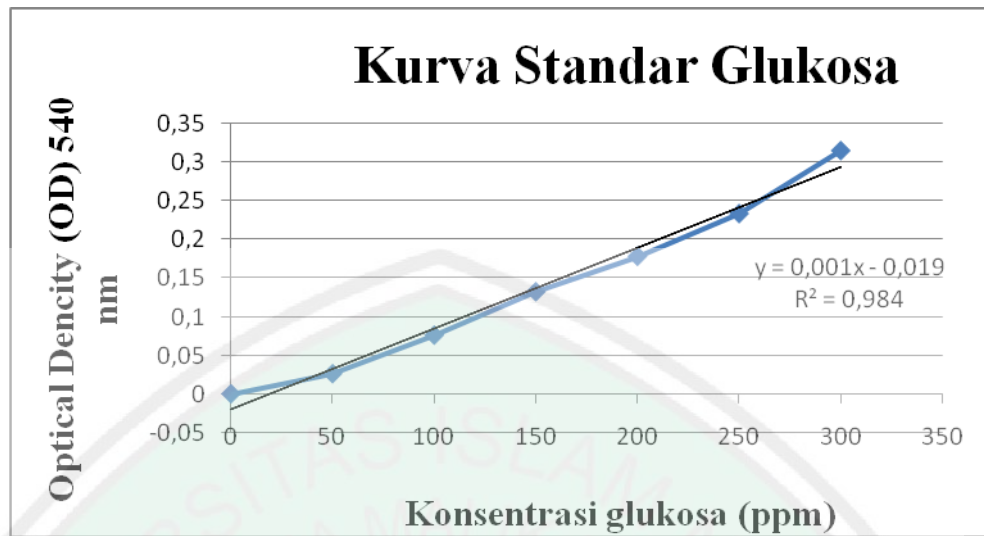
$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 300 \text{ ppm}$$

$V_1 = 6 \text{ mL larutan stok glukosa} + 94 \text{ mL akuades}$

L.4.2 Tabel Data Hasil Absorbansi Larutan Glukosa

Konsentrasi glukosa (ppm)	Absorbansi I	Absorbansi II	Absorbansi III	Rata-Rata
0	0,000	0,000	0,000	0,000
50	0,025	0,026	0,027	0,026
100	0,075	0,077	0,076	0,076
150	0,132	0,133	0,132	0,132
200	0,177	0,178	0,180	0,178
250	0,231	0,235	0,235	0,233
300	0,314	0,317	0,315	0,315

L.4.3 Kurva Standar Glukosa



Lampiran 5. Penentuan Aktivitas Enzim Selulase Metode DNS

Persamaan regresi linier $y = ax + b$

$$AE = \frac{C}{\text{BM glukosa}} \times \frac{H}{t E}$$

Absorbansi terkoreksi = absorbansi sampel – absorbansi kontrol

Contoh perhitungan:

(Data diambil dari hasil perlakuan suhu 35 °C Ulangan 1(lampiran 6.1))

Absorbansi terkoreksi : 0,113

Waktu inkubasi : 15 menit

Berat molekul glukosa : 180

H (volume total enzim-substrat) : 2 mL

E (volume enzim) : 1 mL

Konsentrasi glukosa (x atau C)

Persamaan regresi linier $y = 0,001x - 0,019$

y = absorbansi

x = konsentrasi glukosa

maka:

$$0,113 = 0,001x - 0,019$$

$$x = 132$$

Aktivitas selulase = $(132 : (180 \times 15)) \times (2 : 1) = 1,463 \text{ U/mL}$.

Lampiran 6. Aktivitas Enzim Berdasarkan Suhu dan pH

L.6.1 Data Hasil Perlakuan Suhu terhadap Aktivitas Selulase

Suhu	Ulangan	Absorbansi terkoreksi	Konsentrasi glukosa (ppm)	Aktivitas Enzim	Rata - rata aktivitas enzim
30	I	0,036	55	0,615	0,788
	II	0,067	86	0,952	
	III	0,050	69	0,763	
	IV	0,055	74	0,822	
35	I	0,113	132	1,463	1,309
	II	0,103	122	1,356	
	III	0,086	105	1,167	
	IV	0,094	113	1,252	
40	I	0,092	111	1,230	1,064
	II	0,097	116	1,289	
	III	0,058	77	0,852	
	IV	0,061	80	0,885	
45	I	0,093	112	1,248	0,952
	II	0,062	81	0,896	
	III	0,064	83	0,919	
	IV	0,048	67	0,744	

L.6.2 Hasil Perlakuan pH terhadap Aktivitas Selulase

pH	Ulangan	Absorbansi terkoreksi	Konsentrasi glukosa (ppm)	Aktivitas Enzim	Rata - rata aktivitas enzim
6	I	0,112	131	1,452	1,294
	II	0,086	105	1,163	
	III	0,088	107	1,193	
	IV	0,104	123	1,367	
7	I	0,109	128	1,426	2,069
	II	0,384	403	4,474	
	III	0,085	104	1,156	
	IV	0,091	110	1,219	
8	I	0,029	48	0,537	0,567
	II	0,043	62	0,693	
	III	0,025	44	0,489	
	IV	0,030	49	0,548	

Lampiran 7 Analisis Statistik Aktivitas Enzim Selulase

L.7.1 Data Analisis Statistik Hasil Perlakuan Suhu terhadap Aktivitas Selulase

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Aktivitas Enzim
N		16
Normal Parameters ^{a, b}	Mean	1.02831
	Std. Deviation	.254823
Most Extreme Differences	Absolute	.180
	Positive	.180
	Negative	-.161
Kolmogorov-Smirnov Z		.721
Asymp. Sig. (2-tailed)		.676

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Aktivitas Enzim

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.297	3	12	.320

ANOVA

Aktivitas Enzim

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.576	3	.192	5.784	.011
Within Groups	.398	12	.033		
Total	.974	15			

Multiple Comparisons

Aktivitas Enzim

Tukey HSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
30	35	-.521500*	.128811	.008	-.90393	-.13907
	40	-.276000	.128811	.195	-.65843	.10643
	45	-.163750	.128811	.597	-.54618	.21868
35	30	.521500*	.128811	.008	.13907	.90393
	40	.245500	.128811	.276	-.13693	.62793
	45	.357750	.128811	.069	-.02468	.74018
40	30	.276000	.128811	.195	-.10643	.65843
	35	-.245500	.128811	.276	-.62793	.13693
	45	.112250	.128811	.819	-.27018	.49468
45	30	.163750	.128811	.597	-.21868	.54618
	35	-.357750	.128811	.069	-.74018	.02468
	40	-.112250	.128811	.819	-.49468	.27018

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Aktivitas Enzim

Tukey HSD^a

Suhu	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
30	4	.78800	
45	4	.95175	.95175
40	4	1.06400	1.06400
35	4		1.30950
Sig.		.195	.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

L.7.2 Data Analisis Statistik Hasil Perlakuan pH terhadap Aktivitas Selulase

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Aktivitas Enzim
N		12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1.30975
	Std. Deviation	1.059501
Most Extreme Differences	Absolute	.363
	Positive	.363
	Negative	-.219
Kolmogorov-Smirnov Z		1.258
Asymp. Sig. (2-tailed)		.084

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Aktivitas Enzim

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.524	2	9	.012

Robust Tests of Equality of Means

Aktivitas Enzim

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	2.593	2	3.063	.219

a. Asymptotically F distributed.



**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp /Faks (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Zulfa Hidayatul Laila
NIM : 15620095
Program Studi : Biologi
Semester : Genap T.A 2020
Pembimbing : Ir. Lilik Harianie, AR,MP
Judul Skripsi : Analisis Suhu dan pH terhadap Enzim Selulase Kasar dari *Bacillus Subtilis* dalam Hidrolisis Kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) Bekas Sebagai bahan Baku Pembuatan Bioetanol

NO.	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	15 Januari 2019	Konsultasi Judul Penelitian	1.
2.	30 Januari 2019	Konsultasi Judul Penelitian	2.
3.	5 Maret 2019	Konsultasi BAB I	3.
4.	11 Maret 2019	Konsultasi BAB I, II, III	4.
5.	13 Maret 2019	ACC Proposal	5.
6.	16 November 2020	Konsultasi BAB IV	6.
7.	27 November 2020	Konsultasi BAB IV, V, dan Daftar Pustaka	7.
8.	3 Desember 2020	ACC Skripsi	8.

Malang, 3 Desember 2020

Pembimbing Skripsi,

Ir. Lilik Harianie, AR,MP
NIP. 19620901 199803 2 001



Pembimbing Skripsi,
Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002



**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./Faks (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI AGAMA SKRIPSI

Nama : Zulfa Hidayatul Laila
NIM : 15620095
Program Studi : Biologi
Semester : Ganjil T.A 2020
Pembimbing : Dr. Ahmad Barizi, M.A
Judul Skripsi : Analisis Suhu dan pH terhadap Enzim Selulase Kasar dari *Bacillus Subtilis* dalam Hidrolisis Kertas HVS (*Houtvrij schrijfpapier*) Bekas Sebagai Bahan Baku Pembuatan Bioetanol

NO.	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	11 Maret 2019	Konsultasi Integrasi Ayat BAB I dan II	1.
2.	15 Maret 2019	ACC Integrasi BAB I dan II	2.
3.	27 November 2020	Konsultasi Integrasi Ayat BAB IV	3.
4.	4 Desember 2020	ACC Integrasi BAB IV	4.

Malang, 4 Desember 2020

Pembimbing Skripsi,

Dr. Ahmad Barizi, M.A
NIP. 19731212 199803 1 008

KEMENTERIAN AGAMA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
JURUSAN BIOLOGI
REPUBLIC OF INDONESIA

Wika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002