

**ISOLASI BAKTERI SELULOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI  
AKTIVITAS ENZIM SELULASE DENGAN VARIASI SUHU INKUBASI**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
LAILATUL FITRIA  
NIM. 16630034**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2021**

**ISOLASI BAKTERI SELULOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI  
AKTIVITAS ENZIM SELULASE DENGAN VARIASI SUHU INKUBASI**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
LAILATUL FITRIA  
NIM. 16630034**

**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 KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2021**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**ISOLASI BAKTERI SELULOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI  
AKTIVITAS ENZIM SELULASE DENGAN VARIASI SUHU INKUBASI**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
LAILATUL FITRIA  
NIM. 16630034**

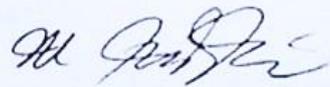
**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal: 28 Juni 2021**

**Pembimbing I**



**Dr. Akyunul Jannah, M.P  
NIP 197504102005012009**

**Pembimbing II**



**Dr. H. Mochamad Imamudin, Lc., M.A  
NIP. 19740602 200901 1 010**

**Mengetahui,  
Ketua Program Studi**



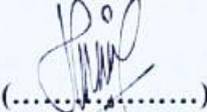
**Elok Hanifah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002**

**ISOLASI BAKTERI SELULOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI  
AKTIVITAS ENZIM SELULASE DENGAN VARIASI SUHU INKUBASI**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
LAILATUL FITRIA  
NIM. 16630034**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 28 Juni 2021**

<b>Penguji Utama</b>	<b>: Rachmawati Ningsih, M.Si NIP. 19810811 200801 2 010</b>	
<b>Ketua Penguji</b>	<b>: Dewi Yuliani, M.Si NIDT. 19880711 20160801 2 067</b>	
<b>Sekretaris Penguji</b>	<b>: Dr. Akyunul Jannah, M.P NIP. 19750410 200501 2 009</b>	
<b>Anggota Penguji</b>	<b>: Dr. H. Mochamad Imamudin, Lc., M.A NIP. 19740602 200901 1 010</b>	

**Mengesahkan,  
Ketua Program Studi**



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



## PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Lailatul Fitria

NIM : 16630034

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Isolasi Bakteri Selulolitik dari Bekatul dan Uji Aktivitas Enzim  
Selulase dengan Variasi Suhu Inkubasi

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi atau hasil penelitian saya ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data dan tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dengan mencantumkan sumber kutipan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia mempertanggungjawabkannya sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Malang, 28 Juni 2021

Yang Membuat Pernyataan,



Lailatul Fitria

NIM. 16630034

## HALAMAN PERSEMBAHAN

الحمد لله رب العالمين

Segala puji dan syukur kupersambahkan kepadaMu ya Allah, dengan Ridho-Mu saya bisa menyelesaikan kewajiban saya sebagai seorang mahasiswi. Terimakasih

Engkau telah memberi kesempatan kepada saya untuk menuntut ilmu sampai ditingkat ini dan melewati semua rintangan serta ujian yang harus saya hadapi.

Karya sederhanaku ini, ku persembahkan untuk kedua orangtuaku tercinta Ayah Sukarman, S.E dan Ibu Miftachul Jannah, Mbak Likha, Mas Ito, Emak, dan Adek-adekku yang selalu memberi semangat, dukungan, doa, dan berkorban hanya demi agar aku bisa terus melanjutkan studiku. Semoga Allah senantiasa memberikan kesehatan, kebahagiaan, dan membalas semua jerih payah mereka dengan sebaik-baik balasan.

Teruntuk bapak ibu dosen yang dengan sabar dan telaten memimbing dan meluangkan waktunya, semoga Allah melimpahkan rahmatNya kepada mereka.

Teruntuk asatidz-asatidzah, sahabat-sahabatku tercinta, teman-teman seperjuanganku di Kimia A, Carbon, Ponpes Albarokah, Gubuk Sufi, dan teman-teman satu lab biokimia yang telah menemani saya dalam proses belajar, berbagi ilmu, bertukar pikiran, dan saling memberikah support untuk selalu semangat dan ceria. Semoga kedepannya kita semua menjadi orang yang sukses.

جزاكم الله احسن الجزاء

MOTTO

**“SEBESAR APA USAHAMU, SEBESAR ITULAH YANG AKAN  
KAMU DAPATKAN”**

-Abi Aan As'ari-

**" وَأَفْوَضُ أَمْرِي إِلَى اللَّهِ "**

*“Dan aku menyerahkan urusanku kepada Allah...”*

Al-Mu'min Ayat 44

## KATA PENGANTAR

Segala puja dan puji hanya bagi Allah, Rabb semesta alam yang telah begitu banyak memberikan kenikmatan kepada kita semua, makhluk-Nya yang lemah ini. Shalawat serta salam semoga tetap tercurah kepada junjungan teladan umat Islam, Nabi Agung Muhammad SAW, beserta para keluarga, sahabat, dan pengikut beliau *ilaa yaumul qiyaamah*. Dengan mengucapkan syukur yang sedalam-dalamnya sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian ini dengan judul **“ISOLASI BAKTERI SELULOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI AKTIVITAS ENZIM SELULASE DENGAN VARIASI SUHU INKUBASI”**.

Pada kesempatan ini penulis juga ingin menyampaikan terimakasih pada berbagai pihak, diantaranya adalah:

1. Kepada kedua orang tua dan keluarga yang senantiasa memberikan do'a dan motivasi agar senantiasa sabar dan semangat dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
2. Kepada Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P., selaku dosen pembimbing utama dan Bapak Dr. H. Mochamad Imamudin, Lc., M.A., selaku dosen pembimbing agama yang senantiasa telaten dan sabar membimbing kami dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Kepada Ibu Rahmawati Ningsih, M.Si dan Ibu Dewi Yuliani, M.Si selaku penguji tugas akhir kami yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, memotivasi, mengarahkan, dan memberikan masukan dalam penyusunan skripsi ini.

4. Kepada seluruh bapak ibu dosen dan bapak ibu laboran jurusan kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Kepada Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Kepada seluruh teman seperjuangan khususnya kelas A Kimia angkatan 2016, Carbon, teman-teman santri Pondok Pesantren Al-Barokah Malang, para darwish dan darwisyah dari Gubuk Sufi Jabung, sahabat-sahabat terkasih yang senantiasa saling memberi semangat, dukungan, berbagi keluh kesah, dan bertukar pikiran
7. Kepada teman satu perjuangan saya di laboratorium biokimia dan biotek Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang (Mbak Dimitri, Mas Chalim, Edo, Rahma, Ica, dan Merinda) yang selalu berbagi suka maupun duka bersama, saling menghibur, bertukar pikiran, saling membantu dan memberi dukungan
8. Dan kepada semua pihak yang telah turut serta membantu dalam penyelesaian tugas dan penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu-satu

Penulis memohon maaf apabila dalam penulisan skripsi ini terdapat kesalahan dan semoga dapat menjadi manfaat bagi penulis, para pembaca, maupun berbagai pihak.

Malang, 28 Juni 2021

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>PENYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN.....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>v</b>
<b>MOTTO .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>مستخلص البحث.....</b>	<b>xvi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Batasan masalah .....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Bekatul .....	6
2.2 Bakteri Selulolitik .....	8
2.3 Enzim Selulase .....	9
2.4 Karakterisasi Bakteri .....	11
2.5 Uji Bakteri Penghasil Selulase secara Kualitatif.....	12
2.6 Pewarnaan Gram .....	13
2.7 Uji Katalase .....	15
2.8 Pewarnaan Endospora .....	15
2.9 Penentuan Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode Asam 3,5-dinitro- salisilat (DNS) .....	16
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>18</b>
3.1 Pelaksanaan Penelitian .....	18
3.2 Alat dan Bahan .....	18
3.2.1 Alat .....	18
3.2.2 Bahan.....	18
3.3 Rancangan Penelitian .....	19
3.4 Tahapan Penelitian .....	20

3.5 Pelaksanaan Penelitian .....	20
3.5.1 Pembuatan Media .....	20
3.5.1.1 Pembuatan Media <i>Natrium Agar</i> (NA) .....	20
3.5.1.2 Pembuatan Media CMC Agar dan Broth .....	20
3.5.2 Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Bekatul.....	21
3.5.3 Uji Bakteri Penghasil Selulase secara Kualitatif.....	22
3.5.4 Karakterisasi Bakteri Selulolitik .....	22
3.5.4.1 Pewarnaan Gram .....	22
3.5.4.2 Uji Katalase .....	23
3.5.4.3 Pewarnaan Endospora .....	23
3.5.5 Produksi Enzim Selulase pada Masing-masing Isolat.....	24
3.5.6 Uji Aktivitas Enzim Selulase Menggunakan Metode DNS .....	24
3.5.6.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa.....	24
3.5.6.2 Uji Aktivitas Enzim Selulase .....	25
3.5.8 Analisis Data .....	26
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>27</b>
4.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Bekatul.....	27
4.2 Uji Bakteri Penghasil Selulase secara Kualitatif.....	28
4.3 Identifikasi Mikroskopis Bakteri.....	30
4.3.1 Pewarnaan Gram .....	30
4.3.2 Uji Katalase .....	31
4.3.3 Pewarnaan Endospora .....	33
4.4 Uji Aktivitas Enzim Selulase .....	35
4.5 Isolasi Bakteri dari Bekatul menurut Pandangan Islam .....	37
<b>BAB V PENUTUP.....</b>	<b>40</b>
5.1 Kesimpulan.....	40
5.2 Saran.....	40
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>41</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>46</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Lapisan Bekatul dalam Bulir Padi .....	7
Gambar 2.2	Degradasi Selulosa oleh Enzim Selulase.....	10
Gambar 2.3	Dugaan Interaksi antara <i>Congo red</i> dengan CMC .....	13
Gambar 2.4	Reaksi DNS dengan Gula Pereduksi .....	17
Gambar 4.1	Reaksi Penguraian Hidrogen Peroksida .....	33
Gambar 4.2	Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Selulase.....	35
Gambar 4.3	Mekanisme Hidrolisis Selulosa oleh Enzim Selulase .....	37

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Komposisi Nutrisi Bekatul ( <i>Edible Grade</i> ).....	7
Tabel 2.2	Berbagai Bakteri Penghasil Selulase.....	9
Tabel 2.3	Hasil Identifikasi Bakteri Selulolitik.....	12
Tabel 2.4	Perbedaan ciri-ciri dinding sel bakteri gram positif dan gram Negatif.....	14
Tabel 4.1	Karakter Makroskopis Isolat Bakteri dari Bekatul.....	28
Tabel 4.2	Hasil Pengukuran Zona Bening.....	29
Tabel 4.3	Hasil Uji Pewarnaan Gram.....	31
Tabel 4.4	Hasil Uji Katalase.....	32
Tabel 4.5	Hasil Uji Pewarnaan Endospora.....	34

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Rancangan Penelitian .....	46
Lampiran 2	Diagram Alir.....	47
Lampiran 3	Pembuatan Reagen .....	53
Lampiran 4	Perhitungan Pembuatan Larutan Standar Glukosa.....	54
Lampiran 5	Penentuan Indeks Aktivitas Selulase secara Kualitatif .....	55
Lampiran 6	Pembuatan Kurva Standar Larutan Glukosa .....	56
Lampiran 7	Pengukuran Absorbansi dan Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase .....	57
Lampiran 8	Dokumentasi.....	60
Lampiran 9	Statistik TwoWay ANOVA.....	62

## ABSTRAK

Fitria, L. 2021. **Isolasi Bakteri Selulolitik dari Bekatul dan Uji Aktivitas Enzim Selulase dengan Variasi Suhu Inkubasi.** Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Dr. Akyunul Jannah, M.P., Pembimbing II: Mochamad Imamudin, Lc., M.A.

---

Kata Kunci: Bekatul, Bakteri Selulolitik, Enzim Selulase, DNS

Enzim Selulase merupakan enzim yang digunakan untuk mendegradasi selulosa. Enzim selulase dapat diproduksi oleh bakteri selulolitik. Bakteri selulolitik dapat diisolasi dari beberapa limbah pertanian, salah satunya adalah bekatul. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri selulolitik yang mampu memproduksi enzim selulase dan menguji aktivitas ekstrak kasar enzim dengan variasi suhu inkubasi.

Penelitian ini diawali dengan tahapan isolasi dan seleksi bakteri menggunakan media selektif pertumbuhan bakteri selulolitik yang mengandung selulosa yaitu *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) dan karakterisasi bakteri secara makroskopis dan mikroskopis. Selanjutnya adalah produksi enzim selulase kasar dan uji aktivitas enzim selulase dengan variasi suhu inkubasi 30°C, 40°C, 50°C, dan 60°C. Pengujian Aktivitas enzim menggunakan metode DNS (*3,5-asam dinitrosalisilat*) dengan spektrofotometer UV-Vis.

Hasil penelitian ditemukan lima isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari bekatul menggunakan substrat bekatul. Terdapat tiga isolat dengan kode IR 1, IR 2, dan IR 6 pada suhu 30°C memiliki aktivitas selulase tertinggi berturut-turut sebesar 0,741 U/mL; 0,616 U/mL; dan 0,638 U/mL. Sedangkan dua isolat dengan kode IR 4 dan IR 10 pada suhu 40°C dengan aktivitas selulase tertinggi masing-masing adalah 0,710 U/mL dan 0,680 U/mL. Isolat dengan kode IR 10 memiliki aktivitas selulolitik terbesar dengan karakter mikroskopis gram positif, sel berbentuk basil, memiliki endospora dan memiliki aktivitas katalase.

## ABSTRACT

Fitria. L. 2021. **Isolation of Cellulolytic Bacteria from Rice bran and Cellulase Enzyme Activity Test with Variation of Incubation Temperature.** Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor I: Dr. Akyunul Jannah, M.P., Advisor II: Dr. H. Mochamad Imamudin, Lc., M.A.

---

Key Word: Rice Bran, Cellulolytic Bacteria, Cellulase enzyme, DNS

Cellulase is an enzyme used to degrade cellulose. Cellulase enzymes can be produced by cellulolytic bacteria. Cellulolytic bacteria can be isolated from several agricultural wastes, one of which is rice bran. This study aims to isolate cellulolytic bacteria capable of producing cellulase enzymes and to test the activity of the crude extract of the enzyme with variations in incubation temperature.

This study begins with the isolation and selection of bacteria using a selective medium for the growth of cellulolytic bacteria containing cellulose, namely Carboxymethyl Cellulose (CMC) and macroscopic and microscopic characterization of the bacteria. Next is the production of crude cellulase enzymes and cellulase enzyme activity tests with variations in incubation temperature of 30°C, 40°C, 50°C, and 60°C. Enzyme activity testing using DNS method (3,5-dinitrosalicylic acid) with UV-Vis spectrophotometer.

The results of the study found five isolates of bacteria that were successfully isolated from rice bran using rice bran substrate. There were three isolates with codes IR 1, IR 2, and IR 6 at 30°C which had the highest cellulase activity of 0.741 U/mL, 0.616 U/mL, and 0.638 U/mL, respectively. Meanwhile, two isolates with codes IR 4 and IR 10 at 40°C with the highest cellulase activity were 0.710 U/mL and 0.680 U/mL, respectively. Isolates with IR code 10 had the greatest cellulolytic activity with microscopic Gram positive characters, bacilli-shaped cells, endospores and catalase activity.

## مُستَخْلَصُ البَحْثِ

الفطرية، ليلة ٢٠٢١. عزل البكتيريا السيلوليتية من نخالة الأرز واختبار نشاط إنزيم السليولاز مع تغير درجة حرارة الحضانة. قسم الكيمياء، كلية العلوم و التكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المُشرفُ الأوَّلُ: الدكتور اكين الجنة الماجستير. المشرف الثاني: الدكتور الحج محمد إمام الدين الماجستير.

الكلماتُ المُفتاحيةُ: نَخَالَةُ الأرز، البكتيريا السيلوليتية، إنزيم السليولاز،

DNS

إنزيم سليولوز هو الإنزيم الذي يُستخدَم لِتَحطِيمِ السليولوز. يُمكنُ أن تُنتجَ البكتيريا المحللة للسليولاز إنزيمات السليولاز. يمكن عزل البكتيريا السيلوليتية من العُديد من المُخَلَّفَاتِ الزراعيَّةِ، أحرَّها نَخَالَةُ الأرز. تهدف هذه الدراسة إلى عزل البكتيريا المحللة للسليوليت القادرة على إنتاج إنزيمات السليوليز واختبار نشاط المستخلصات الخام لهذه الإنزيمات في درجات حرارة حضانة مختلفة..

يبدأ هذا البحث بعزل واختيار البكتيريا باستخدام وسط نمو بكتيري انتقائي يحتوي على السليولوز، وهي كربوكسي ميثيل السليولوز (CMC) والتوصيف المجهرى والمجهري للبكتيريا. التالي هو إنتاج إنزيمات السليوليز الخام واختبارات نشاط إنزيم السليوليز مع تغيرات في درجة حرارة الحضانة 30 درجة مئوية، 40 درجة مئوية، 50 درجة مئوية، 60 درجة مئوية. اختبار نشاط الإنزيم باستخدام طريقة DNS مع مقياس الطيف الضوئي UV-Vis.

وجدت نتائج الدراسة 5 عزلات بكتيرية تم عزلها بنجاح من نخالة الأرز باستخدام طبقة نخالة الأرز. كانت هناك ثلاث عزلات بأكواد IR 1 و IR 2 و IR 6 عند 30 درجة مئوية والتي كان لها أعلى نشاط سيلولاز قدره 0.741 U / mL و 0.616 U / mL و 0.638 U / mL على التوالي. في الوقت نفسه، كانت عزلتان مع الكودتين IR 4 و IR 10 عند 40 درجة مئوية مع أعلى نشاط سلولاز 0.710 وحدة / مل و 0.680 وحدة / مل على التوالي. كان للعزلات التي تحتوي على رمز الأشعة تحت الحمراء 10 أكبر نشاط تحلل خلوي مع خصائص موجبة الجرام المجهرية، وخلايا على شكل عصيات، ونشاط إندوسبوريز، ونشاط الكاتلاز.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Limbah pertanian merupakan semua sisa tanaman pertanian yang berasal dari kegiatan pasca panen setelah diambil hasil utamanya yaitu padi. Padi (*Oryza sativa*) adalah salah satu tanaman yang menjadi makanan pokok sebagian besar penduduk dunia terutama negara-negara di benua Asia, khususnya negara Indonesia. Kementerian Pertanian Republik Indonesia menyebutkan, bahwa jumlah produksi padi yang diperoleh di Indonesia pada tahun 2014-2018 mencapai 70-80 ribu ton/Ha (Badan Pusat Statistik, 2018). Proses dari penggilingan padi menghasilkan 70% beras atau endosperm sebagai produk utama dan beberapa produk sampingan seperti bekatul (kurang lebih 8–10 persen) (Chen, *et al.*, 2012).

Pemanfaatan limbah dari tanaman padi secara tersirat dijelaskan oleh Allah dalam al-Qur'an bahwa segala sesuatu yang diciptakannya memiliki manfaat. Sebagaimana firmanNya [QS. Al-Imran (3): 191],

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ  
السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ -  
١٩١-

Artinya: ”((yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau Menciptakan semua ini sia-sia; Maha Suci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka”)).”

Surat al-Imran ayat 191 menjelaskan bahwa orang-orang yang mengingat Allah adalah orang-orang yang senantiasa berfikir sehingga mengakui bahwa segala ciptaanNya tidak dia-sia, tetapi dengan penuh kebenaran diciptakan untuk memberikan balasan untuk orang-orang yang beramal baik maupun buruk (Abdullah, 2001). Yang dimaksud dengan *ulul albab* (orang-orang yang berakal) adalah orang-orang yang mendalami pemahamannya, berpikir tajam, serta mau menggunakan pikirannya, mengambil manfaat dari apa yang telah diciptakan oleh Allah dan senantiasa mengingat Allah dalam keadaan apapun, baik dalam keadaan berdiri, duduk, maupun berbaring (Shihab, 2002). Selain itu, ayat al-Qur'an tersebut menerangkan bahwa tidak ada ciptaan Allah yang sia-sia atau tidak memiliki manfaat. Al-Qur'an merupakan kitab yang berisi petunjuk kepada manusia, yang mendorong manusia untuk menggunakan akal dan pikirannya dalam melakukan observasi alam sehingga diperoleh penemuan baru yang selaras dengan al-Qur'an (Shihab, 2009).

Allah menciptakan segala sesuatu dengan rancangan dan fungsi yang tepat, tidak ada satupun di dunia ini yang Allah ciptakan tanpa manfaat. Adanya berbagai jenis makhluk hidup yang Allah ciptakan di semesta ini, merupakan tanda-tanda kekuasaan Allah bagi orang yang mau berfikir. Maka sudah sepantasnya bagi manusia untuk berupaya memikirkan penciptaan Allah dengan melakukan observasi alam semesta sehingga memperoleh penemuan-penemuan baru dalam rangka pengkayaan ilmu yang selaras dengan al-Qur'an (Shihab, 2009). Dengan terungkapnya rahasia-rahasia Allah melalui hasil penelitian tersebut, dapat menambah keyakinan kita akan Kebesaran dan Kekuasaan Allah (Abdushshamad, 2003).

Semua makhluk yang ada di dunia ini diciptakan tidak semata-mata hanya untuk melengkapi isi langit dan bumi. Tapi Allah memberikan manfaat bagi semua makhluknya. Salah satu makhluk hidup yang dapat dimanfaatkan adalah bakteri selulolitik. Dalam penelitian ini bakteri selulolitik didapatkan melalui isolasi dari bekatul. Bekatul (*bran*) adalah lapisan luar dari beras yang terlepas saat proses penggilingan gabah menjadi beras, bewarna krem atau coklat muda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bekatul mengandung protein 16-19%, lemak 17-20%, karbohidrat 25% (yang terdiri dari serat larut 0,1-1,5% dan serat tidak larut 20-25%), dan mineral 6-9% (Faria, *et al.*, 2012). Dengan adanya komponen gizi dalam bekatul tersebut, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan mikroorganisme seperti bakteri selulolitik. Kelompok bakteri yang tergolong selulolitik adalah *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus*. Kedua bakteri tersebut telah ditemukan pada bekatul (Jannah, *et al.*, 2018).

Enzim selulase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa (Kulp, 1984). Penelitian yang dilakukan oleh Jannah, *et al.*, (2012), enzim selulase dari bakteri selulolitik hasil isolasi dari bekatul menghasilkan dua isolat dengan aktivitas selulase tertinggi sebesar 2,16 U/mL dan 1,31 U/mL.

Enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya suhu inkubasi (Hames dan Hooper, 2005). Pada suhu yang optimal, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat (Masfufatun, 2012).

Beberapa hasil penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa isolasi bakteri selulolitik untuk mengetahui aktivitas enzim yang dihasilkan diantaranya adalah Marina, *et al.*, (2018) menyebutkan bahwa enzim selulase yang diisolasi dari tanah Danau Kalimpa'a Sulawesi Tengah memiliki aktivitas selulase tertinggi pada suhu 40°C dengan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan sebesar 0,279 U/mL. Penelitian yang dilakukan oleh Saropah (2012), karakterisasi enzim selulase oleh bakteri selulolitik yang diisolasi dari bekatul memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 50°C. Menurut Akhtar (1998), suhu optimum enzim selulase umumnya berkisar antara 40°C sampai dengan 60°C.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, dapat dinyatakan bahwa aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Enzim selulase memiliki kondisi yang berbeda-beda tergantung darimana enzim dihasilkan. Oleh karena itu, perlu dikaji lebih lanjut enzim selulase yang diproduksi dari limbah pertanian bekatul.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana karakteristik bakteri selulolitik hasil isolasi dari bekatul?
2. Berapakah suhu inkubasi untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri hasil isolasi?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui karakteristik bakteri selulolitik hasil isolasi dari bekatul
2. Mengetahui suhu inkubasi untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri hasil isolasi.

#### **1.4 Batasan Masalah**

1. Substrat yang digunakan adalah bekatul beras putih yang berasal dari penggilingan padi lokal di Kota Malang.
2. Variasi yang digunakan adalah suhu (30°C, 40°C, 50°C, dan 60°C)
3. Parameter yang diteliti adalah kadar gula reduksi atau aktivitas enzim selulase menggunakan metode DNS (Asam 3,5-dinitrosalisilat).

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi mengenai bakteri selulolitik yang dapat diisolasi dari limbah pertanian bekatul.
2. Menambah informasi ilmiah dan pengetahuan kepada masyarakat mengenai potensi limbah pertanian bekatul yang dapat menghasilkan enzim selulase sehingga dapat membantu mengoptimalkan fungsi kerja pakan ternak yang terbuat dari limbah pertanian.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Bekatul

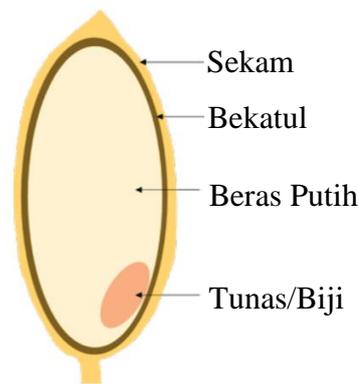
Tumbuhan biji-bijian atau biasa disebut dengan sereal merupakan sekelompok tumbuhan yang ditanam untuk dipanen biji dan bulirnya yang dimanfaatkan sebagai sumber karbohidrat. Sebagaimana firman Allah yang berbunyi,

وَأَنْزَلْنَا مِنَ الْمُعْصِرَاتِ مَاءً ثَجَّاجًا - ١٤ - لِنُخْرِجَ بِهِ حَبًّا وَنَبَاتًا - ١٥

*Artinya: “Dan Kami Turunkan dari awan, air hujan yang tercurah dengan hebatnya, untuk Kami Tumbuhkan dengan air itu biji-bijian dan tanam-tanaman” (Q.S. an-Naba’ (78): 14-15).*

Ayat diatas menjelaskan bahwasannya Allah telah menurunkan dari mega mendung air yang sangat lebat, yakni hujan yang deras dan terus-menerus. supaya dengannya Kami dapat mengeluarkan biji-bijian dan tumbuh-tumbuhan, *Linukhrifa bihī* (supaya dengannya Kami dapat Mengeluarkan), yakni supaya dengan hujan itu Kami dapat Menumbuhkan. *Habbaw wa nabātā* (biji-bijian dan tumbuh-tumbuhan), yakni segala biji-bijian dan tumbuh-tumbuhan yang beraneka ragam dan dengan warna serta rasa dan aroma yang berbeda-beda, meski hal tersebut berada dan berkumpul di suatu tempat (Abdullah, 2005).

Air merupakan sumber kehidupan. Dari air muncullah tanaman-tanaman termasuk biji-bijian. Biji-bijian yang dimaksudkan adalah biji-bijian seperti biji gandum, biji beras (bekatul), dan jenis biji-bijian yang lain sebagai bahan makanan untuk manusia dan hewan (Al-Mahalli dan As-Suyuthi, 2017).



Gambar 2.1 Lapisan Bekatul dalam Butir Padi (Sharfie dan Norhaizan, 2017)

Bekatul (*bran*) adalah lapisan terluar dari beras yang terlepas selama proses penggilingan gabah menjadi beras (Thahir, 2010). Bekatul umumnya bewarna krem atau coklat muda. Lapisan bekatul dapat dilihat pada Gambar 2.1. Lapisan-lapisan pada bekatul mengandung sejumlah nutrisi seperti protein, lemak, dan serat pangan serta sejumlah vitamin, mineral, dan komponen bioaktif. Komposisi nutrisi yang terdapat dalam bekatul dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi Nutrisi Bekatul (*Edible Grade*)

<b>Nutrien</b>	<b>Kandungan (per 100 g)</b>
Protein	16,5 g
Lemak	21,3 g
Mineral	8,3 g
Total Karbohidrat Kompleks	49,4 g
Serat Kasar	11,4 g
Serat Pangan	25,3 g
Serat Larut Air	2,1 g
Pati	24,1 g
Gula Sederhana	5,0 g
Vitamin	0,4 mg – 982 mg
Mineral	0,6 mg – 20,3 g

Sumber : Rao, 2000

Bekatul merupakan komoditi yang berasal dari kulit ari padi-padian. Bekatul merupakan hasil samping penggilingan padi yang telah disaring dan dipisahkan dari sekam (kulit luar gabah). Bekatul mengandung serat yang sebagian besar terdiri atas karbohidrat seperti selulosa, hemiselulosa, dan lignin (Luthfianto, *et al.*, 2017). Bekatul juga memiliki komponen-komponen nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri yaitu sumber karbon dan nitrogen. Kandungan nutrisi tersebut digunakan sebagai media pertumbuhan oleh bakteri (Retnaningtyas, *et al.*, 2004). Penelitian yang dilakukan oleh Asadullah, (2014) menerangkan bahwa bakteri dapat hidup pada bekatul.

## **2.2 Bakteri Selulolitik**

Bakteri selulolitik merupakan bakteri penghasil enzim selulase yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis kompleks selulosa menjadi oligosakarida yang lebih kecil seperti glukosa (Salah, *et al.*, 2007). Bakteri selulolitik dipilih sebagai salah satu mikroba pendegradasi selulosa karena memiliki tingkat pertumbuhan yang lebih cepat dibanding kelompok mikroba lainnya dan memiliki ketahanan yang tinggi terhadap kelembapan yang dibutuhkan untuk dekomposisi selulosa. Hartanti (2010), menyebutkan bahwa pemanfaatan bakteri selulolitik sebagai penghasil enzim selulase digunakan untuk menghidrolisis selulosa karena bakteri tersebut menghasilkan enzim selulase sebagai respon terhadap adanya selulosa pada lingkungannya. Proses ini berlangsung apabila terjadi kontak langsung antara sel bakteri dan permukaan selulosa. Beberapa bakteri penghasil enzim selulase dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Berbagai Bakteri Penghasil Selulase

Genus	Spesies
<i>Acidothermus</i>	<i>A. Cellulolyticus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>
<i>Clostridium</i>	<i>C. acetobutylcum</i>
	<i>C. thermocellum</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cellulose</i>
<i>Rinodothermus</i>	<i>R. marinus</i>

Sumber: Sukumaran *et al.*, 2005

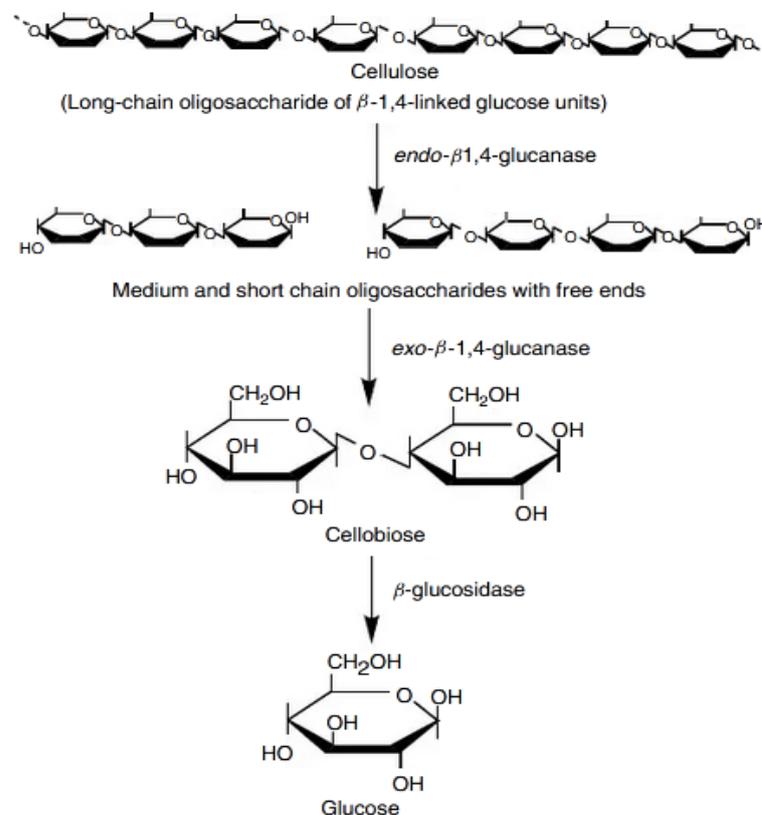
### 2.3 Enzim Selulase

Enzim merupakan bagian dari protein yang mengkatalisis reaksi-reaksi kimia. Enzim juga dapat diartikan sebagai protein katalisator yang memiliki spesifisitas terhadap reaksi yang dikatalisis dan molekul yang menjadi substratnya (Ompusunggu, *et al.*, 2013). Enzim yang berperan sebagai katalisator dalam proses degradasi selulosa adalah enzim selulase. Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler, dimana enzim ini akan dilepaskan oleh sel mikroorganisme ke dalam media tumbuhnya, sebagai respon adanya substrat selulosa pada media tersebut (Fikrinda, 2000).

Secara enzimatik, proses degradasi selulosa menjadi glukosa melibatkan kompleks enzim selulosa spesifik. Terdapat tiga enzim utama yaitu *endo- $\beta$ -1,4-glukanase*, *ekso- $\beta$ -1,4-glukanase*, dan  *$\beta$ -1,4-glukosidase* atau *selobiose* (Oktavia, *et al.*, 2014). Hidrolisis selulosa menjadi glukosa secara konsisten mengalami dua tahap dalam sistem enzimatik. Tahap pertama adalah pemecahan ikatan glikosidik menjadi selobiosa. Tahap kedua adalah pemecahan ikatan glikosidik pada selobiosa menjadi glukosa (Fox, 1991).

Enzim *endo- $\beta$ -1,4-glukanase* berfungsi untuk memotong secara acak pada sisi internal rantai selulosa yang panjang menjadi rantai yang lebih pendek,

sehingga dihasilkan ujung yang baru. Hal tersebut menyebabkan panjang rantai polisakarida menjadi semakin berkurang dengan cepat dan diikuti peningkatan jumlah gula reduksi secara bertahap (Lynd, *et al.*, 2002). Kemudian enzim *ekso- $\beta$ -1,4-glukanase* berfungsi untuk memproses ujung reduksi maupun nonreduksi dari rantai polisakarida selulosa menghasilkan glukosa (*glukanohidrolase*) atau selobiosa (*selobiohidrolase*). Sehingga jumlah reduksi meningkat secara cepat dan secara keseluruhan hanya terjadi sedikit perubahan panjang rantai dalam waktu yang singkat (Lynd, *et al.*, 2002). Enzim  *$\beta$ -1,4-glukosidase* berfungsi memotong selobiosa menjadi molekul-molekul glukosa yang lebih sederhana (Irawati, *et al.*, 2016). Proses degradasi serat kasar oleh bakteri penghasil enzim selulase dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Degradasi Selulosa oleh Enzim Selulase (Moat, *et al.*, 2002)

## 2.4 Karakterisasi Bakteri

Karakterisasi bakteri dapat dilakukan dengan dua cara pengujian yaitu, karakterisasi morfologi maupun fisiologi. Karakterisasi secara morfologi meliputi bentuk koloni (dilihat dari atas), permukaan koloni (dilihat dari samping), tepi koloni (dilihat dari atas), dan warna koloni pada bakteri. Bentuk koloni berupa bulat (*circular*), berbenang (*filamentous*), tak teratur (*irregular*), serupa akar (*rhizoid*), dan serupa kumparan (*spindle*). Permukaan koloni berupa rata (*flat*), timbul datar (*raised*), melengkung (*convex*), dan membukit. Tepi koloni dapat berupa utuh (*entire*), berombak (*undulate*), berbelah (*lobate*), bergerigi (*serrate*), berbenang (*filamentous*), keriting (*curled*), dan warna koloni bakteri dapat berupa keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening (Dwijoseputro, 1994).

Karakterisasi morfologi dilakukan dengan pewarnaan gram dan pewarnaan endospora. Masing-masing ciri ini penting dalam mencirikan morfologi suatu spesies. Sel bakteri yang berbentuk seperti bola atau elips dinamakan kokus. Kokus muncul dalam beberapa penataan yang khas tergantung pada spesiesnya. Sel berbentuk silindris atau batang dinamakan basilus. Ada banyak perbedaan dalam ukuran panjang dan lebar diantara spesies basilus. Ujung beberapa basilus tampak persegi, bundar, meruncing, atau lancip seperti cerutu. Terkadang basilus tetap saling melekat satu sama lainnya, ujung dengan ujung, sehingga berbentuk seperti rantai (Funke, *et al.*, 2004). Hasil karakterisasi bakteri selulolitik yang telah dilakukan dilaporkan pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Hasil Identifikasi Bakteri Selulolitik

<b>Genus Bakteri Selulolitik</b>	<b>Karakteristik</b>
<i>Bacillus</i> (B1, B8, B9, B12)	Gram positif, berspora, sel batang, katalase positif
<i>Cellulomonas</i> (B2)	Gram positif, tidak berspora, sel kokus, katalase positif
<i>Microbacterium</i> (B4)	Gram positif, berspora, sel batang, katalase positif
<i>Neisseria</i> (B5)	Gram negatif, tidak berspora, sel kokus, katalase positif
<i>Streptococcus</i> (B6)	Gram positif, tidak berspora, sel kokus, katalase negatif,
<i>Streptomyces</i> (B7)	Gram positif, berspora, sel batang, katalase positif

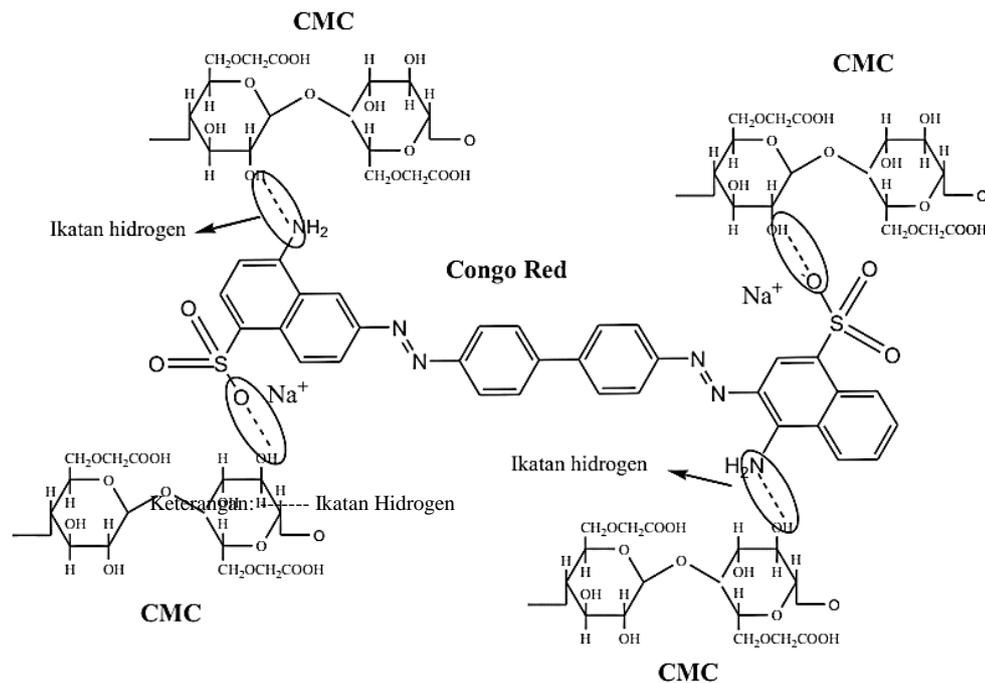
Sumber: Supriyatna, *et al.*, 2012

Karakterisasi secara fisiologi dilakukan dengan pengujian aktivitas biokimia, dimana aktivitas biokimia setiap bakteri berbeda-beda. Hal tersebut disebabkan karena bakteri memiliki aktivitas enzimatik yang berbeda-beda. Sifat metabolisme bakteri dalam uji biokimia biasanya dilihat dari interaksi metabolit-metabolit yang dihasilkan dengan reagen-reagen kimia dan kemampuannya menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon dan sumber energi (Waluyo, 2004).

## 2.5 Uji Bakteri Penghasil Selulase secara Kualitatif

Uji bakteri penghasil selulase secara kualitatif bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim selulase. Isolat yang menghasilkan enzim selulase dapat dilihat dari pembentukan zona bening disekitar koloni bakteri (Coughlan, 2001). Perez, *et al.* (2002) menyatakan bahwa zona bening tersebut menunjukkan selulosa yang didapat didalam media dihidrolisis oleh enzim selulase menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu selobiosa yang akan disederhanakan lagi menjadi dua molekul gula.

Pengujian adanya aktivitas selulolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening pada media setelah diberi pewarna *Congo red*. Pewarna *Congo red* tersebut akan berinteraksi kuat dengan ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik dalam CMC (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Dugaan Interaksi antara *congo red* dengan CMC (Chasanah, 2018)

*Congo red* merupakan garam natrium dari benzidineadiazobis-1-naphthylamine-4 asam sulfonat dengan rumus kimia  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ , sehingga pewarna ini akan larut dan tercuci oleh garam natrium lain seperti NaCl, sehingga zona bening yang terbentuk akan terlihat jelas (Chasanah, 2018).

## 2.6 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram adalah salah satu teknik pewarnaan yang paling penting untuk mengidentifikasi bakteri. Dalam proses pewarnaan gram, olesan bakteri yang sudah terfiksasi dikenai larutan – larutan berikut: zat pewarna kristal violet, larutan yodium, larutan alkohol (bahan pemucat), dan zat pewarna tandingannya berupa zat warna safranin. Bakteri yang terwarnai dibagi menjadi dua kelompok, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif akan mempertahankan zat warna kristal violet, sehingga tampak berwarna ungu tua di bawah mikroskop. Sedangkan bakteri gram negatif akan tampak berwarna merah (Putri, et al., 2017). Perbedaan sifat gram positif dan negatif tersebut didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Perbedaan ciri-ciri dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif dapat dilihat pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Perbedaan ciri-ciri dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif

<b>Ciri</b>	<b>Gram Positif</b>	<b>Gram Negatif</b>
Struktur dinding sel	- Tebal (15-18 nm) - Berlapis tunggal (mono)	- Tipis (10-15 nm) - Berlapis tiga (multi)
Komposisi dinding sel	- Kandungan lipid rendah (1-4%) - Peptidoglikan ada sebagai lapisan tunggal, komponen utama merupakan lebih dari 50% berat kering pada beberapa sel bakteri - Ada asam tekoat	- Kandungan lipid tinggi (11-12%) - Peptidoglikan ada di dalam lapisan kaku sebelah dalam, jumlahnya sedikit, sekitar 10% dari berat kering - Tidak ada asam tekoat
Kerentanan terhadap penisilin	- Lebih rentan	- Kurang rentan
Pertumbuhan dihambat oleh zat-zat warna dasar, misalnya ungu kristal	- Pertumbuhan dihambat dengan nyata	- Pertumbuhan tidak begitu dihambat
Persyaratan nutrisi	- Relatif rumit pada banyak spesies	- Relatif sederhana
Resistensi terhadap	- Lebih resisten	- Kurang resisten

## **2.7 Uji Katalase**

Uji katalase merupakan suatu pengujian terhadap bakteri apakah bakteri tersebut merupakan bakteri aerob, anaerob, anaerob fakultatif, atau anaerob obligat. Uji katalase juga digunakan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme menguraikan hidrogen peroksida dengan menghasilkan enzim katalase. Bakteri yang memerlukan oksigen akan menghasilkan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang sebenarnya beracun bagi bakteri itu sendiri. Namun, bakteri akan tetap hidup karena adanya metabolit yang menghasilkan enzim katalase. Enzim katalase berfungsi untuk membantu proses penguraian hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Hadioetomo, 1993).

## **2.8 Pewarnaan Endospora**

Endospora merupakan struktur yang tidak aktif, keras, dan non-reproduktif yang dihasilkan oleh bakteri. Dalam proses pembentukannya, bakteri membelah di dalam dinding sel kemudian satu sisi menelan sisi yang lainnya. Kelebihan endospora adalah dapat bertahan hidup dalam keadaan kekurangan nutrisi, tahan terhadap panas dan unsur-unsur fisik lainnya seperti pembekuan, kekeringan, radiasi ultraviolet, dan bahan-bahan kimia lainnya yang dapat menghancurkan bakteri yang tidak dapat membentuk spora (Hadioetomo, 1993).

Metode pewarnaan spora berfungsi untuk mempermudah pengamatan agar peneliti atau pengamat mampu melihat spora, membedakan dengan sel vegetatif ataupun mengamati bentuknya. Endospora tidak mudah diwarnai dengan zat

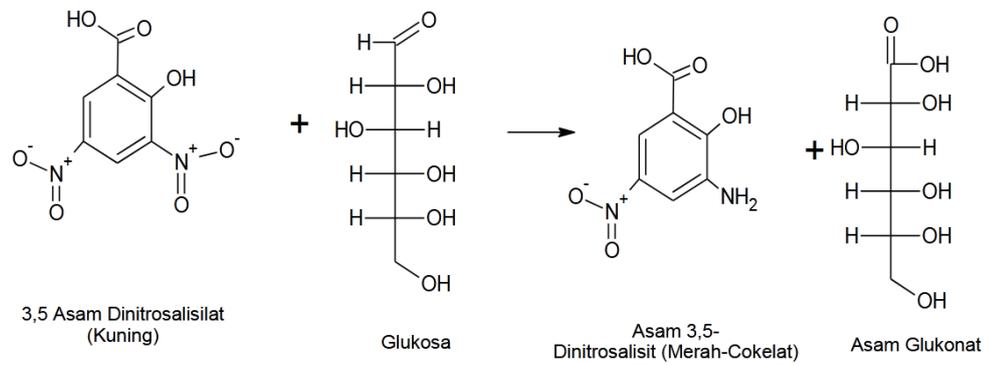
pewarna pada umumnya. Spora bakteri diamati dengan pewarna spesifik yaitu *malachite green* dan safranin. Pewarna *malachite green* berfungsi untuk mewarnai endospora yang ada dalam sel bakteri. Sedangkan pewarna safranin berfungsi untuk memperjelas pengamatan sel vegetatif dibawah mikroskop (Zahidah, 2013).

## **2.9 Penentuan Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode Asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)**

Uji aktivitas enzim selulase dapat dilakukan dengan mengamati kadar gula reduksi yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim terhadap substrat. Metode asam 3,5-dinitrosalisilat atau DNS merupakan suatu senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi dan membentuk asam 3-amino-5-dinitrosalisilat yang merupakan senyawa yang mempunyai kemampuan untuk menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang 540 nm (Putri, 2016). Pereaksi DNS dapat bekerja dengan adanya komponen pendukung yang membantu kerja DNS yaitu KNa-Tartarat, fenol, sodium bisulfit ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), dan Natrium hidroksida (NaOH) (Nelson dan Cox, 2005).

Prinsip pengujian dengan metode DNS adalah gugus aldehida pada rantai polisakarida dioksidasi menjadi gugus karboksil, disaat bersamaan gugus aldehida pada gula akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi 3-amino-5-dinitrosalisilat. Reaksi tersebut akan berlangsung terus-menerus selama terdapat gula pereduksi dalam larutan yang akan diujikan (Hasanah dan Iwan, 2015). Adanya gula pereduksi pada sampel yang bereaksi dengan larutan DNS akan

merubah warna larutan dari kekuningan menjadi jingga kemerah-merahan (Irawati, 2016). Reaksi DNS dan gula reduksi dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Reaksi DNS dengan Gula Pereduksi (Rahayu dan Kuswytasari, 2013)

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Pelaksanaan Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Mei 2021. Bertempat di Laboratorium Biokimia dan Bioteknologi Jurusan Kimia serta Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam isolasi dan seleksi bakteri adalah *autoclave*, *petri dish*, erlenmeyer, ayakan 40 mesh, *blue tip*, *hotplate*, jarum ose, *magnetic stirrer*, pengaduk gelas, bunsen, korek api, tabung reaksi, dan mikropipet. Uji bakteri penghasil selulase berdasarkan pengamatan makroskopik dan mikroskopik membutuhkan *petri dish*, jarum ose, preparat, bunsen, pipet tetes, *laminar air flow*, dan mikroskop. Pada tahap uji aktivitas selulase menggunakan gelas beker, *blue tip*, *yellow tip*, mikropipet, pipet ukur, termometer, tabung reaksi, sentrifugator, *hotplate*, *vortex*, dan spektrofotometer UV-Vis.

##### **3.2.2 Bahan**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bekatul beras putih yang diperoleh dari penggilingan padi lokal Kota Malang. Media yang digunakan adalah media Nutrien Agar (NA), CMC agar, dan CMC *Broth*. Bahan-bahan yang

digunakan pada tahap isolasi dan seleksi bakteri, uji bakteri penghasil selulase berdasarkan pengamatan makroskopik dan mikroskopik, antara lain akuades steril, congo red, dan NaCl 1 M, larutan kristal ungu, larutan iodin, larutan alkohol 96%, larutan safranin, minyak imersi, larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etanol 70%, dan *malachite green*. Selanjutnya, tahap uji aktivitas enzim selulase membutuhkan bahan berupa glukosa, buffer fosfat pH 7, CMC, akuades, reagen DNS, dan KNa-Tartrat 40%.

### **3.3 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan dua tahapan penelitian, yakni kualitatif dan kuantitatif. Penelitian deskriptif kualitatif yang dilakukan adalah data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis dan mikroskopis dari masing-masing jenis bakteri selulolitik yang berhasil diisolasi dari bekatul. Isolasi bakteri menggunakan media CMC agar. Sedangkan untuk media kultur menggunakan media cair CMC *Broth*. Kemudian dilakukan pengamatan bakteri gram positif dan gram negatif, uji katalase, dan pengamatan endospora bakteri. Penelitian tahap kedua adalah penelitian kuantitatif menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dan jenis isolat dengan variasi suhu inkubasi diukur melalui aktivitas enzim selulase dengan pengaruh perbedaan suhu (masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali perlakuan).

### **3.4 Tahapan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Pembuatan media
3. Isolasi dan seleksi bakteri selulolitik dari bekatul

4. Uji bakteri penghasil selulase secara kualitatif
5. Karakterisasi bakteri selulolitik
6. Produksi enzim selulase pada masing-masing isolat
7. Uji aktivitas enzim selulase dengan metode DNS
8. Analisa data

### **3.5 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.5.1 Pembuatan Media**

##### **3.5.1.1 Pembuatan Media *Natrium Agar* (NA)**

Media NA digunakan untuk peremajaan dan pemurnian bakteri. Media NA sebanyak 5,6 gram dan ditimbang dalam Erlenmeyer 250 mL. Kemudian ditambahkan akuades sebanyak 200 mL, diaduk dan dipanaskan sampai mendidih. Selanjutnya Erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan dibungkus dengan plastik wrap. Media disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit (Zimbro *et al.*, 2009).

##### **3.5.1.2 Pembuatan Media CMC Agar dan CMC *Broth***

Media CMC agar digunakan untuk isolasi dan uji kualitatif *Congo red*, sedangkan CMC *Broth* digunakan untuk produksi enzim. Media CMC agar terdiri dari 1 gram CMC; 0,04 gram  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,15 gram  $KNO_3$ ; 0,1 gram  $K_2HPO_4$ ; 0,004 gram  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,4 gram *yeast extract*; dan 3,4 gram agar bakto. Semua bahan dimasukkan ke dalam gelas beker 250 mL dan ditambahkan akuades sebanyak 100 mL, kemudian dipanaskan diatas *hot plate* hingga mendidih. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan kapas. Media disterilisasi

dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit (Saropah, *et al.*, 2012). Media CMC *Broth* dibuat dengan komposisi dan cara yang sama dengan media CMC agar, namun tanpa penambahan agar bakto (Meryandini *et al.*, 2009).

### 3.5.2 Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Bekatul

Bekatul sebanyak 5 gram yang sudah diayak dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 45 mL larutan garam fisiologis steril (0,85% NaCl). Kemudian dikocok (pengenceran  $10^{-1}$ ), dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Setelah masa inkubasi selesai dilakukan pengenceran bertingkat sampai sepuluh kali ( $10^{-10}$ ). Pengenceran dilakukan dengan cara mengambil 1 mL dari pengenceran sebelumnya dan diencerkan menggunakan larutan garam fisiologis steril sebanyak 9 mL. Diambil 1 mL pada pengenceran  $10^{-3}$  sampai dengan  $10^{-10}$  ke dalam cawan petri untuk ditanam secara *pour plate* menggunakan CMC agar dan diinkubasi selama 24 jam pada inkubator. Tujuan dari pengenceran adalah untuk mengurangi kepadatan koloni sehingga memudahkan proses isolasi.

Untuk memperoleh biakan murni yang diinginkan tanpa ada kontaminasi dengan mikroba yang lain adalah dengan cara pemurnian inokulum bakteri. Pemilihan koloni mikroba yang akan dimurnikan adalah berdasarkan pada perbedaan kenampakan morfologi koloni, baik dari segi warna, bentuk koloni, maupun permukaan koloni. Koloni yang dihasilkan dari isolasi diamati morfologinya, sedangkan koloni yang terpisah dipindahkan ke dalam media NA miring untuk pemurnian. Pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan cara mengambil satu ose isolat bakteri dan ditumbuhkan pada media NA miring

dengan metode *streak* kuadran, kemudian diinkubasi pada inkubator selama 24 jam.

### **3.5.3 Uji Bakteri Penghasil Selulase secara Kualitatif**

Semua isolat murni yang diperoleh diuji kemampuannya untuk menghasilkan enzim selulase. Pengujian pembentukan zona bening dari isolat hasil pemurnian diinokulasikan ke dalam media CMC agar, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 Jam. Visualisasi zona bening menggunakan larutan *Congo red* (1 mg/mL) selama 15 menit, kemudian dicuci menggunakan NaCl 1 M. Indeks zona bening yang tinggi menunjukkan bahwa koloni tersebut diduga memiliki aktivitas enzim selulase yang tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya. Ratio zona bening berupa perbandingan antara diameter zona bening dan diameter koloni. Semakin besar zona bening yang terbentuk disekitar koloni, maka akan semakin besar aktivitas selulolitik yang dihasilkan (Apun, *et al.*, 2000).

### **3.5.4 Karakterisasi Bakteri Selulolitik**

#### **3.5.4.1 Pewarnaan Gram**

Isolat bakteri diambil sedikit menggunakan jarum ose secara aseptis dan suspensikan ke dalam akuades yang terdapat pada kaca preparat. Kemudian preparat difiksasi di atas api bunsen hingga kering. Preparat ditetesi dengan larutan kristal ungu dan didiamkan selama 60 detik, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah kering, preparat ditetesi dengan larutan iodin dan didiamkan selama 60 detik, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah kering, preparat ditetesi dengan larutan alkohol 96% dan didiamkan selama 30 detik, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan

dikeringkan. Selanjutnya preparat ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi minyak imersi dan diamati menggunakan mikroskop. Jika berwarna ungu menunjukkan gram positif, dan berwarna merah menunjukkan gram negatif (Hadioetomo, 1999).

#### **3.5.4.2 Uji Katalase**

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki enzim katalase atau tidak. Cara melakukan uji katalase adalah terlebih dahulu preparat dibersihkan menggunakan etanol 70% sampai tidak terbentuk lapisan minyak. Kemudian, biakan murni isolat bakteri yang berumur 24 jam diambil sedikit secara aseptis menggunakan jarum ose dan disuspensikan ke dalam akuades steril yang ada pada preparat. Suspensi tersebut ditetesi dengan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Uji positif apabila terbentuk gelembung pada koloni maupun sekitarnya (Lay, 1994).

#### **3.5.4.3 Pewarnaan Endospora**

Biakan murni isolat bakteri diambil sedikit menggunakan jarum ose, disuspensikan ke dalam akuades steril yang terdapat pada preparat dan dilakukan secara aseptis. Preparat difiksasi di atas api bunsen, kemudian ditetesi dengan *malachite green* dan dibiarkan di atas penangas air selama 10 menit. Preparat diangkat dan dibiarkan dingin, kemudian dibilas dengan air mengalir. Preparat ditetesi dengan safranin dan didiamkan selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat diamati dengan mikroskop perbesaran

1000x. Uji positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau (Lay, 1994).

### **3.5.5 Produksi Enzim Selulase pada Masing-masing Isolat**

Sebanyak 1 ose masing-masing isolat ditumbuhkan pada 50 mL media pertumbuhan CMC *Broth* 1% kemudian dinkubasi pada *shaker incubator* pada kecepatan 110 rpm selama 18 jam pada suhu ruang. Setelah itu ekstrak kasar enzim selulase diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Kemudian supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim selulase, dan digunakan untuk pengujian karakterisasi enzim selulase (Saropah, *et al.*, 2012).

### **3.5.6 Uji Aktivitas Enzim Selulase Menggunakan Metode DNS**

#### **3.5.6.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa**

Untuk membuat kurva standar terlebih dahulu dibuat larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Setelah itu diambil 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan ke dalam tabung rekasi. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen DNS ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan. Mulut tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit sampai larutan berubah warna menjadi merah-coklat. Kemudian ditambahkan larutan KNa-Tartrat 40% sebanyak 1 mL. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan akuades hingga volumenya menjadi 10 mL dan

dihomogenkan. Selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 540 nm (Rosyada, 2015).

### 3.5.6.2 Uji Aktivitas Enzim Selulase

Sebanyak 1 mL ekstrak kasar enzim selulase dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 1 mL larutan CMC 1% (yang telah dilarutkan pada pH 7). Mulut tabung ditutup dengan aluminium foil, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C, 40°C, 50°C, dan 60°C. Setelah inkubasi berakhir, tabung didinginkan pada suhu ruang. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL reagen DNS dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit sampai berubah warna menjadi merah kecoklatan. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan KNa-Tartrat 40%. Kemudian ditambahkan dengan akuades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan menggunakan vortex. Selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 540 nm (Marantha, 2008).

Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Aktivitas enzim selulase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/mL. Satu unit merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah 1  $\mu$ mol selulosa menjadi gula pereduksi per menit (Gilbert, 2012). Aktivitas enzim selulase ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi yang diperoleh dari konsentrasi glukosa standar, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus Persamaan 3.1 (Irawati, 2016).

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \times (\text{Volume total enzim-Substrat}) \text{ mL}}{\text{Berat molekul glukosa} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times \text{Volume enzim (mL)} \times \text{Waktu inkubasi (menit)}} \dots\dots 3.1$$

### 3.5.8 Analisis Data

Data yang dihasilkan dalam penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis dan mikroskopis dari masing-masing isolat. Sedangkan data kuantitatif diperoleh aktivitas enzim selulase dilakukan analisa menggunakan analisa Two Way ANOVA.

Data yang dihasilkan dari uji aktivitas enzim selulase berupa data absorbansi dan konsentrasi. Pengukuran tersebut dilakukan dengan memplotkan hasil absorbansi ke dalam persamaan kurva standar glukosa. Persamaan standar tersebut adalah  $y = ax + b$ . Absorbansi yang diperoleh diolah menggunakan *Microsoft Excel* dengan nilai absorbansi sebagai sumbu x dan nilai konsentrasi sebagai sumbu y, hingga diperoleh persamaan reaksi dan regresinya. Konsentrasi yang diperoleh kemudian dikalikan faktor pengenceran dan dibagi dengan lama waktu inkubasi dan berat molekul glukosa, sehingga diperoleh nilai aktivitas enzim selulase (Murtyaningsih dan Hazmi, 2017).

Data aktivitas selulase (U/mL) yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara deskriptif dengan menentukan nilai aktivitas selulase tertinggi pada masing-masing perlakuan. Data yang dihasilkan dari analisis serat kasar dan uji aktivitas enzim selulase berupa tabel dan dianalisis menggunakan analisis ragam (uji F) metode Rancangan Acak Kelompok (RAK). Jika terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT dengan taraf 1% untuk melihat perbedaan antar perlakuan menggunakan program SPSS.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Bekatul

Isolasi bakteri dari bekatul dilakukan untuk mendapatkan bakteri yang berpotensi untuk mendegradasi selulosa dengan media selektif CMC. Berdasarkan hasil isolasi yang telah dilakukan, didapatkan enam isolat tumbuh pada media CMC agar dari 11 isolat yang telah ditumbuhkan. Enam isolat yang tumbuh di media CMC agar memiliki karakter makroskopis pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Karakter Makroskopis Isolat Bakteri dari Bekatul

No.	Kode Isolat	Morfologi Koloni			
		Bentuk	Permukaan	Tepi	Warna
1	IR 1	Bulat	Rata	Utuh	Putih
2	IR 2	Bulat	Rata	Utuh	Putih
3	IR 4	Tak Teratur	Rata	Bergelombang	Putih dengan tengah kuning
4	IR 5	Tak Teratur	Cembung	Bergelombang	Putih dengan tengah kuning
5	IR 6	Bulat	Cembung	Utuh	Kuning
6	IR 10	Tak Teratur	Rata	Bergelombang	Putih

Berdasarkan Tabel 4.1 hasil pengamatan morfologi koloni bakteri hasil isolasi dengan kode IR 1 dan IR 2 memiliki karakteristik yang sama yaitu berbentuk bulat, bewarna putih, memiliki permukaan yang rata dan tepian yang utuh. Sedangkan isolat IR 4 dan IR 10 memiliki karakteristik yang mirip, yaitu memiliki bentuk tak teratur, permukaan yang rata dan tepian yang bergelombang, namun keduanya memiliki warna yang berbeda. Isolat IR 4 memiliki warna putih dengan tengah-tengahnya bewarna kuning, sedangkan Isolat IR 10 memiliki warna putih.

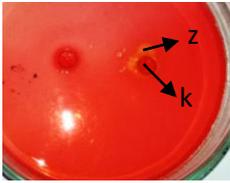
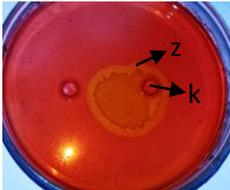
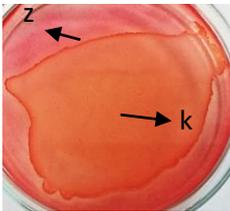
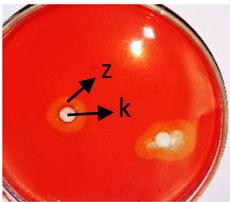
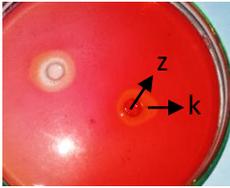
Isolat dengan kode IR 5 memiliki karakteristik bentuk isolat yang tidak teratur, berwarna putih dengan tengah kuning, memiliki permukaan cembung dan tepian yang bergelombang. Isolat dengan kode IR 6 memiliki karakteristik berbentuk bulat berwarna kuning, permukaan cembung dan tepian yang utuh. Isolat dengan kode IR 5 tersebut setelah diremajakan tidak dapat tumbuh lagi pada media CMC agar. Hal tersebut dimungkinkan karena isolat terkontaminasi atau mati. Sehingga tersisa lima isolat yang dapat dilanjutkan untuk uji kualitatif bakteri selulolitik.

#### **4.2 Uji Bakteri Penghasil Selulase secara Kualitatif**

Uji bakteri penghasil selulase secara kualitatif adalah bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim selulase. Uji bakteri selulolitik secara kualitatif dengan CMC agar dilakukan pada lima isolat bakteri yang telah berhasil diisolasi sebelumnya. Dari hasil pengujian pada Tabel 4.2 didapatkan kelima isolat mempunyai aktivitas selulolitik berupa visualisasi zona bening di sekitar koloni. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri selulolitik mampu menghasilkan enzim selulase. Sedangkan media CMC agar yang berwarna merah tidak terhidrolisis (Apun, *et al.*, 2000).

Besar kecilnya zona bening yang terbentuk tergantung dengan banyaknya substrat yang dapat didegradasi oleh enzim selulase. Uji kualitatif ini menguatkan bahwa bakteri yang diisolasi adalah bakteri selulolitik yang dapat menghasilkan zona bening hasil degradasi selulosa. Hasil pengukuran zona bening pada penelitian ini ditampilkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil Pengukuran Zona Bening

Kode Isolat	Hasil Gambar	Indeks Selulolitik
IR 1		1,16
IR 2		0,25
IR 4		0,04
IR 6		0.60
IR 10		2,00

Keterangan: k= Koloni Bakteri ; z= Zona Bening

Dari hasil pengukuran zona bening pada Tabel 4.2 didapatkan indeks selulolitik dengan rentang 0,04 - 2,00. Isolat dengan kode IR 10 memiliki indeks aktivitas selulase tertinggi, sedangkan isolat IR 4 memiliki indeks aktivitas selulase terendah. Hasil uji kualitatif bakteri selulolitik tersebut serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Murtyaningsih dan Hazmi (2017) hasil uji kualitatif bakteri selulolitik dengan media CMC menghasilkan zona bening dengan indeks selulolitik sebesar 0,85. Penelitian yang dilakukan oleh Irawati

(2016) juga menyebutkan bahwa uji kualitatif bakteri selulolitik menggunakan media CMC menghasilkan zona bening dengan indeks selulolitik sebesar 1,43.

### **4.3 Identifikasi Mikroskopis Bakteri Selulolitik**

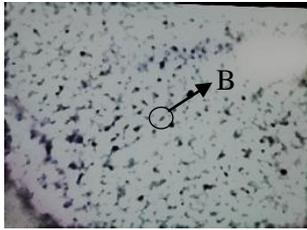
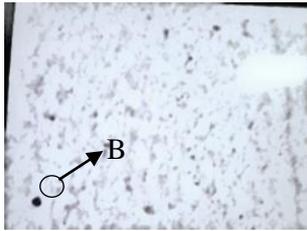
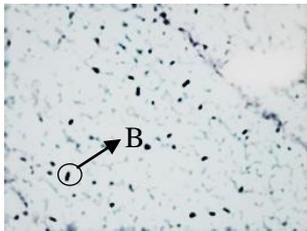
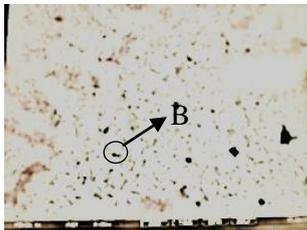
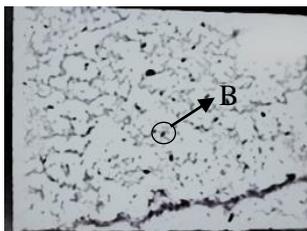
Isolat yang menghasilkan zona bening selanjutnya dilakukan karakterisasi mikroskopis pada selnya. Pengidentifikasian masing-masing karakter sel bakteri diantaranya adalah pewarnaan gram, pewarnaan endospora, dan pengujian katalase.

#### **4.3.1 Pewarnaan Gram**

Pewarnaan gram merupakan proses penentuan karakter sel isolat berdasarkan perbedaan struktur dari dinding sel bakteri. Terdapat dua macam dinding sel yaitu dinding sel bakteri gram positif dan dinding sel bakteri gram negatif. Bakteri gram positif akan mempertahankan warna ungu dari kristal violet, sehingga ketika diamati dibawah mikroskop akan menunjukkan warna ungu. Sedangkan bakteri yang tergolong gram negatif akan mengikat zat warna safranin yang terserap pada dinding sel, sehingga ketika diamati dibawah mikroskop akan tampak bewarna merah.

Hasil pewarnaan gram pada Tabel 4.3, menunjukkan bahwa isolat IR 1, IR 2, IR 4, dan IR 10 merupakan kelompok bakteri gram positif. Dan isolat IR 6 merupakan kelompok bakteri gram negatif. Hasil pewarnaan gram juga menunjukkan bahwa kelima isolat bakteri berbentuk basil.

Tabel 4.3 Hasil Uji Pewarnaan Gram

Kode Isolat Bakteri	Hasil Gambar	Gram	Bentuk
IR 1		+	Basil
IR 2		+	Basil
IR 4		+	Basil
IR 6		-	Basil
IR 10		+	Basil

Keterangan: (B) Basil, (+) Menghasilkan gram positif, (-) Menghasilkan gram negatif

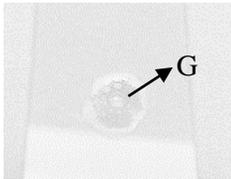
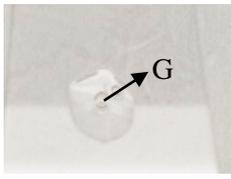
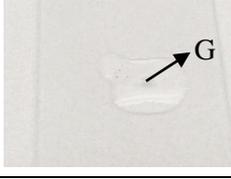
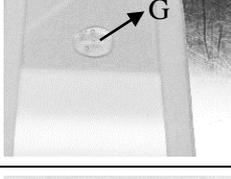
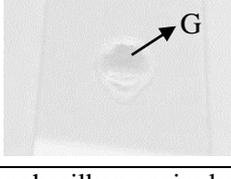
#### 4.3.2 Uji Katalase

Uji katalase bertujuan untuk mengidentifikasi isolat bakteri yang mampu menghasilkan enzim katalase. Enzim katalase dapat memecah hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang terbentuk dari proses respirasi aerob dan bersifat racun menjadi  $H_2O$

dan O<sub>2</sub>. Hasil positif dari uji katalase adalah apabila terbentuk gelembung gas.

Tabel 4.4 menampilkan hasil uji katalase bakteri selulolitik hasil isolasi.

Tabel 4.4 Hasil Uji Katalase

Kode Isolat Bakteri	Hasil Gambar	Hasil
IR 1		+
IR 2		+
IR 4		+
IR 6		+
IR 10		+

Keterangan: (G) Gelembung, (+) Menghasilkan enzim katalase

Berdasarkan Tabel 4.4 tersebut dapat diketahui bahwa kelima isolat dapat menghasilkan enzim katalase. Hal tersebut mengindikasikan bahwa semua isolat mampu mengkatalisis larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi oksigen atau bersifat aerob. Sebaliknya, apabila bakteri tersebut tidak menghasilkan gelembung maka bakteri tersebut tidak memiliki aktivitas katalisis larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atau dapat dikatakan

bakteri tersebut bersifat anaerob. Proses pemecahan hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Reaksi Penguraian Hidrogen Peroksida (Volk dan Wheeler, 1993)

### 4.3.3 Pewarnaan Endospora

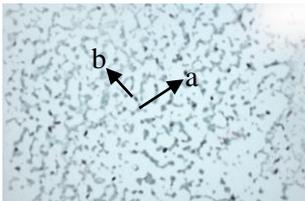
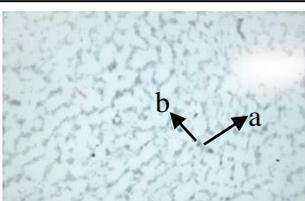
Tujuan dari uji pewarnaan endospora adalah untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan endospora. Uji positif pewarnaan endospora apabila Spora akan terlihat berwarna hijau dan sel vegetatif akan berwarna merah ketika dilihat menggunakan mikroskop. Uji pewarnaan endospora menggunakan *malachite green* yang berfungsi untuk mewarnai endospora yang ada di dalam sel bakteri dan safranin berfungsi untuk memperjelas pengamatan sel vegetatif.

Hasil pewarnaan endospora pada bakteri selulolitik pada Tabel 4.5 menunjukkan bahwa tiga isolat bakteri dengan kode IR 1, IR 2, dan IR 6 tidak menghasilkan endospora. Bakteri tersebut ketika diwarnai dengan pewarna *malachite green*, sel vegetatif akan mampu berikatan dengan pewarna tersebut tetapi dapat dilunturkan ketika pencucian karena tidak berikatan kuat dengan pewarna *malachite green*. Ketika dilakukan pewarnaan menggunakan safranin, sel vegetatif akan berikatan dengan pewarna safranin sehingga warna yang dihasilkan ketika diamati oleh mikroskop adalah merah (Assani, 1994).

Sedangkan dua isolat dengan kode IR 4 dan IR 10 positif menghasilkan endospora. Bakteri yang menghasilkan spora akan mengikat kuat senyawa *malachite green* dan ketika dilakukan pewarnaan selanjutnya menggunakan safranin, sel spora tidak dapat berikatan dengan pewarna lain karena sudah

berikatan dengan *malachite green*. Oleh karena itu warna bakteri spora adalah hijau.

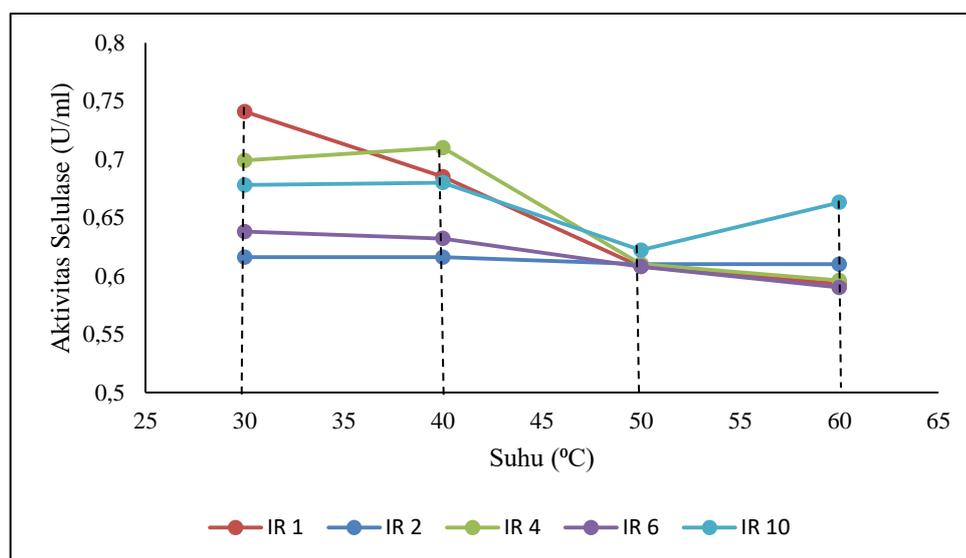
Tabel 4.5 Hasil Uji Pewarnaan Endospora

Kode Isolat Bakteri	Hasil Gambar	Hasil
IR 1		-
IR 2		-
IR 4		+
IR 6		-
IR 10		+

Keterangan: (a) spora, (b) sel vegetatif, (+) Menghasilkan endospora, (-) Tidak menghasilkan endospora

#### 4.4 Uji Aktivitas Enzim Selulase

Pengujian aktivitas selulase menggunakan metode DNS. Sampel yang telah disentrifugasi merupakan enzim ekstrak kasar yang akan diuji aktivitas selulasenya. Uji aktivitas dilakukan dengan variasi suhu untuk mencari pada suhu berapa isolat menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas tertinggi. Variasi suhu dilakukan dengan rentang 30°C sampai dengan 60°C. Gambar 4.2 menampilkan plot hasil uji aktivitas selulase pada kelima bakteri selulolitik hasil isolasi dengan variasi suhu inkubasi.

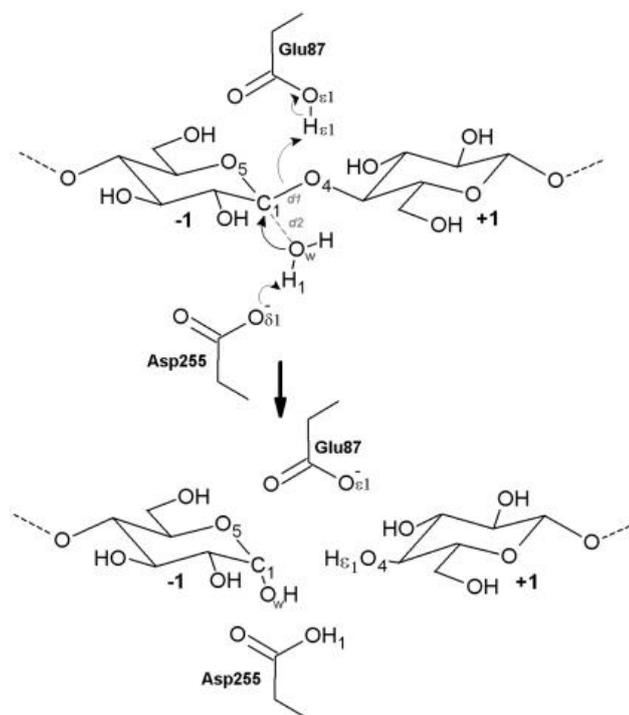


Gambar 4.2 Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Hasil penelitian pada Gambar 4.2 menunjukkan bahwa uji aktivitas enzim selulase pada isolat kode IR 1, IR 2, dan IR 6 mengalami penurunan dari suhu 30°C-60°C. Pada ketiga isolat tersebut aktivitas enzim selulase tertinggi dihasilkan pada suhu 30°C dengan nilai aktivitas enzim selulase masing-masing isolat sebesar 0,741 U/mL, 0,616 U/mL, dan 0,638 U/mL.

Isolat dengan kode IR 4 dan IR 10 mengalami peningkatan aktivitas selulase dari suhu 30°-40°C kemudian cenderung mengalami penurunan pada suhu 50°C dan 60°C. Pada kedua isolat tersebut, aktivitas enzim selulase tertinggi dihasilkan pada suhu 40°C dengan nilai aktivitas selulase masing-masing adalah 0,710 U/mL dan 0,680 U/mL.

Enzim memiliki kekhasan dalam mengenali dan mengikat substrat, karena enzim memiliki sisi aktif yang spesifik. Enzim selulase memiliki gugus –COOH yang merupakan gugus aktif dari asam amino jenis asam aspartat (Asp256) dan asam glutamat (Glu87) (Saharay, *et al.*, 2010). Keduanya bekerja secara sinergi dalam memutus ikatan glikosidik dalam selulosa (Withers, dan Aebersold, 1994). Mekanisme reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Mekanisme Hidrolisis Selulosa Oleh Enzim Selulase (Saharay, *et al.*, 2010)

Gambar 4.3 menjelaskan bahwa terjadi perpindahan elektron dari oksigen pada gugus fungsi asam aspartat (Asp256) dengan hidrogen, sehingga terjadi ikatan antara oksigen pada sisi aktif enzim dengan substrat. Selain itu terjadi ikatan antara oksigen (yang terikat dengan substrat) dengan gugus fungsi dari asam glutamat (Glu87). Sehingga terjadi gaya tarik menarik pada ikatan glikosida yang melibatkan kedua gugus  $-COOH$  dari asam aspartat (Asp256) maupun asam glutamat (Glu87) pada sisi aktif enzim. Pada kondisi intermediet, substrat akan berikatan dengan dua atom oksigen sekaligus. Sedangkan untuk memutuskan ikatan antar keduanya diperlukan molekul  $H_2O$  yang berperan sebagai nukleofil. Sehingga masuknya molekul  $H_2O$  tersebut menyebabkan ikatan glikosida pada rantai selulosa akan putus dan menyebabkan terbentuknya selobiosa atau glukosa.

Hasil Uji TwoWay ANOVA (Lampiran 9) menunjukkan bahwasannya kemampuan degradasi selulosa isolat IR 10 paling tinggi daripada isolat lainnya terdapat dalam Tabel Homogenous dimana nilai aktivitas enzim selulasenya sebesar 0,661 U/mL. Hal tersebut sesuai dengan hasil uji kualitatif enzim selulase menggunakan *Congo red* yang menyatakan bahwa isolat dengan kode IR 10 memiliki Indeks aktivitas selulolitik tertinggi (Lampiran 5).

#### **4.5 Isolasi Bakteri dari Bekatul dalam Pandangan Islam**

Semua yang diciptakan Allah baik di bumi, di langit maupun di antara keduanya memiliki Hikmah dan tidak ada yang sia-sia, sebagai contoh dalam penelitian ini adalah bekatul dan bakteri selulolitik. Walaupun hanya sekecil bekatul dan bakteri, Allah pasti menyimpan manfaat di dalam penciptaanNya

tersebut. Sebagaimana yang dijelaskan pada Qur'an Surah Shad ayat 27, Allah berfirman:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ذَلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا فَوَيْلٌ  
لِّلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ - ٢٧

*Artinya: "Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada di antara keduanya dengan sia-sia. Itu anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang yang kafir itu karena mereka akan masuk neraka." (Q.S. Shad: 27).*

Al-Mahalli dan As-Syuyuti (2017), dalam kitab Tafsir Al-Jalalain menerangkan ayat ini dengan menyebut *bathil* dengan istilah tanpa hikmah. Dalam keterangan ini, hikmah diartikan sebagai manfaat. Tafsir Al-Maraghi (1974) menjelaskan ayat ini dalam tafsirnya bahwa Allah menciptakan langit dan segala isinya berupa perhiasan dan barang-barang yang bermanfaat bagi manusia. Allah menciptakan semua itu memuat hikmah dan rahasia yang sangat berguna bagi manusia, supaya melakukan ketaatan dan mematuhi perintah serta menjauhi larangan Allah.

Banyak manfaat yang bisa diambil dari sebuah bakteri. Bakteri selulolitik mampu menghasilkan enzim selulase. Enzim tersebut dapat bermanfaat untuk mendegradasi serat kasar yang ada pada limbah pertanian. Enzim selulase pada bakteri merupakan salah satu rizqi yang Allah berikan kepada para makhluknya. Bukan hanya untuk dirinya sendiri, melainkan juga bermanfaat untuk semua makhluk hidup lainnya khususnya bagi manusia. Firman Allah pada Q. S. al-Hijr ayat 20:

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعَايِشَ وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ - ٢٠

*Artinya: "Dan Kami telah Menjadikan padanya sumber-sumber kehidupan untuk keperluanmu, dan (Kami Ciptakan pula) makhluk-makhluk yang bukan kamu pemberi rezekinya". (Q.S. Al-Hijr: 20).*

Al-Mahalli dan As-Syuyuti (2017), menjelaskan bahwasannya Allah sudah mencukupi keperluan-keperluan hidup bagi manusia seperti buah-buahan serta biji-bijian sebagai sumber makanan untuk kelangsungan hidupnya, sebagai bekal beribadah kepadaNya. Allah menjadikan makhluk-makhluk seperti manusia, binatang-binatang dan berbagai macam jenis tumbuh-tumbuhan yang mana hanya Allah-lah yang memberi rizqi kepada mereka. Rizqi yang diberikan Allah kepada makhluk ciptaanNya sangat lengkap, termasuk berbagai jenis enzim yang dapat membantu memenuhi kebutuhan hidup makhluk ciptaan Allah.

Sebagai salah satu ciptaan Allah yang sempurna, dalam kehidupannya manusia tetap tidak dapat hidup sendiri melainkan juga harus bermuamalah dengan makhluk ciptaanNya yang lain, termasuk dengan bakteri. Penciptaan bakteri dengan enzim yang terkandung di dalamnya akan membantu manusia dalam memenuhi kebutuhan hidupnya. Selain itu, melalui penelitian ini manusia juga dapat mengkaji dan memikirkan tentang penciptaan makhluk sekecil bakteri yang memiliki banyak manfaat. Hal tersebut dapat menambah keimanan dan rasa syukur kita kepada Allah atas rizqi yang diberikan olehNya. Rasa syukur yang dapat kita tunjukkan salah satunya adalah dengan mengolah kembali limbah pertanian. Hal tersebut merupakan salah satu usaha kita untuk menjaga rizqi yang Allah berikan dengan cara melestarikan dan melindungi lingkungan dari pencemaran dan kerusakan.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Penelitian ini berhasil mengisolasi lima bakteri dari bekatul dengan substrat yang digunakan adalah bekatul. Isolat dengan kode IR 10 memiliki aktivitas selulolitik terbesar dengan karakter mikroskopis Gram positif, sel berbentuk basil, memiliki endospora dan memiliki aktivitas katalase.
2. Suhu inkubasi enzim dari ketiga isolat dengan kode IR 1, IR 2, dan IR 6 adalah suhu 30°C dengan aktivitas selulase tertinggi berturut-turut terbesar 0,741 U/mL; 0,616 U/mL; dan 0,638 U/mL. Sedangkan isolat dengan kode IR 4 dan IR 10 pada suhu 40°C dengan aktivitas selulase tertinggi masing-masing adalah 0,710 U/mL dan 0,680 U/mL.

#### **5.2 Saran**

Saran yang dapat dilakukan dalam penelitian ini adalah:

1. Perlu diperhatikan ketika menggunakan termometer untuk mengukur suhu inkubasi agar suhu yang digunakan tetap stabil
2. Penyamaan *Optical Density* ketika produksi enzim selulase
3. Penelitian ini dapat dilanjutkan untuk identifikasi spesies bakteri secara fenotip dan molekular

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. (2001). *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 2*. Bogor: Pustaka Imam asy-Syafi'i.
- Abdullah. (2005). *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 8*. Bogor: Pustaka Imam asy-Syafi'i.
- Abdushshamad, M. K. (2003). *Mu'jizat Ilmiah dalam Al-Qur'an*. Jakarta: Akbar dan Media Eka Sarana.
- Akhtar, M. S. (1998). Bioconversion of Cellulosic Materials by The Action of Microbial Cellulases. *Thesis*. Institute of Chemistry University of the Punjab.
- Al-Mahalli, J., dan As-Suyuthi, J. (2017). *Tafsir Jalalain Lengkap dan Disertai Asbabun Nuzul*. Jakarta Timur: Pustaka Alkautsar.
- Al-Maraghi, A. M. (1974). *Tafsir al-maraghi*. Semarang: CV. Toha Putra Semarang.
- Andamari, Y. P. (2003). Biokonversi Selulosa dalam Limbah Jerami Padi menjadi Glukosa menggunakan *Aspergillus niger*. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Apun, K., Bor C. J., dan M. A. Salleh. (2000). Screening and Isolation of A Cellulolytic and *Bacillus amylolytic* from Sago Pith Waste. *The Journal of General and Applied Microbiology* 46 (5), 263-267.
- Asadullah, M. (2014). Isolasi Bakteri Amilolitik dari Bekatul dan Uji Kemampuan untuk Produksi Enzim Amilase Kasar pada Berbagai Jenis Media Produksi. *Skripsi*. Malang: UIN Maliki Malang.
- Assani, S. (1994). *Ultrastruktur, Morfologi, dan Pewarnaan Kuman, dalam Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Badan Pusat Statistika (BPS). (2018). *Tanaman Pangan*. Indonesia: Badan Pusat Statistika.
- Chasanah, E. (2018). Identifikasi Fenotip Bakteri Amilolitik dan Selulolitik dari Isolat Bekatul dengan Metode Profile Matching Berdasarkan Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. *Skripsi*. Malang: UIN Maliki Malang.
- Chen, M. H., Suk H. C., Nobuyuke K, Hyun-Jeong K., dan M. Friedman. (2012). Growth-Inhibitory Effects of Pigmented Rice Bran Extracts and Three Red Bran Fractions Against Human Cancer Cells: Relationships with Composition and Antioxidative Activities. *J. Agric. Food Chem.* 60 (36), 9151–9161.
- Coughlan, M. P., dan Hazlewood, G. P. (2001).  $\beta$ -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology, and applications. *Journal Biotechnology applied Biochem* 17, 259-289.
- Dwijoseputro, D. 1994. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.

- Faria, S. A. S. C., Priscila B., dan P. M. D. V. Camargo. (2012). Nutritional composition of rice bran submitted to different stabilization procedures. *Braz. J. Pharm. Sci.* 48 (4), 651–657.
- Fikrinda. (2000). Isolasi dan karakterisasi Bakteri Penghasil Selulase Ekstermofilik dari Ekosistem Air hitam. *Tesis*. Program Pascasarjana IPB, Bogor.
- Fox P. F. (1991). *Food Enzymology: vol 1*. New York: Elsevier Applied Science Ltd.
- Funke, B. R., Tortora G. J., dan Case C. L. (2004). *Microbiology: An Introduction. 8<sup>th</sup> Editions*. San Fransisco: Benjamin Cummings.
- Gilbert, H. J. (2012). *Methods in Enzymology Cellulases*. USA: Academic Press.
- Hadieoetomo, R. S. (1993). *Mikrobiologi Dasar pada Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Hadieoetomo, (1999). Identifikasi Bakteri dari Tinja Pasien Diare di Rumah Sakit Islam Klaten. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Hames, D., dan Hooper, N. (2005). *BioChemistry: Edisi ke-4*. New York: Taylor and Francis Group.
- Hartanti. (2010). Isolasi dan Seleksi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Kawah Air Panas Gunung Pancar, Bogor. *Skripsi*. FMIPA IPB, Bogor.
- Hasanah, N., dan Iwan S. (2015). Aktivitas Selulase Isolat Jamur dari Limbah Media Tanam Jamur Merang. *J. Pros. Sem. Nas. Masy. Biodiv. Indon.* 1 (5), 1110-1115.
- Irawati, R. (2016). Karakterisasi pH, Suhu, dan Konsentrasi Substrat pada Enzim Selulase Kasar yang Diproduksi oleh *Bacillus circulans*. *Skripsi*. Malang: UIN Malang.
- Jannah, A., Aulanni'am, Tri A., dan Suharjono. (2018). Isolation, Cellulase Activity Test and Molecular Identification of Selected Cellulolytic Bacteria Indigenous Rice Bran. *Indon. J. Chem.* 18 (3), 514 – 521.
- Kementrian Agama RI. (2014). *Ar-Rahim Al-Qur'an dan Terjemahan*. Bandung: CV. Mikhraj Khazanah Ilmu.
- Kulp, K. (1984). *Teknologi Pengolahan Jerami sebagai Makanan Ternak*. Bandung: Yayasan Dian Grahita.
- Lay, B. W. (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT Gradindo Persada.
- Luthfianto, D., Retno D. N., dan I. Kurniawati. (2017). Karakterisasi Kandungan Zat Gizi Bekatul pada Berbagai Varietas Beras di Surakarta. *University Research Colloquium*, 371-376.

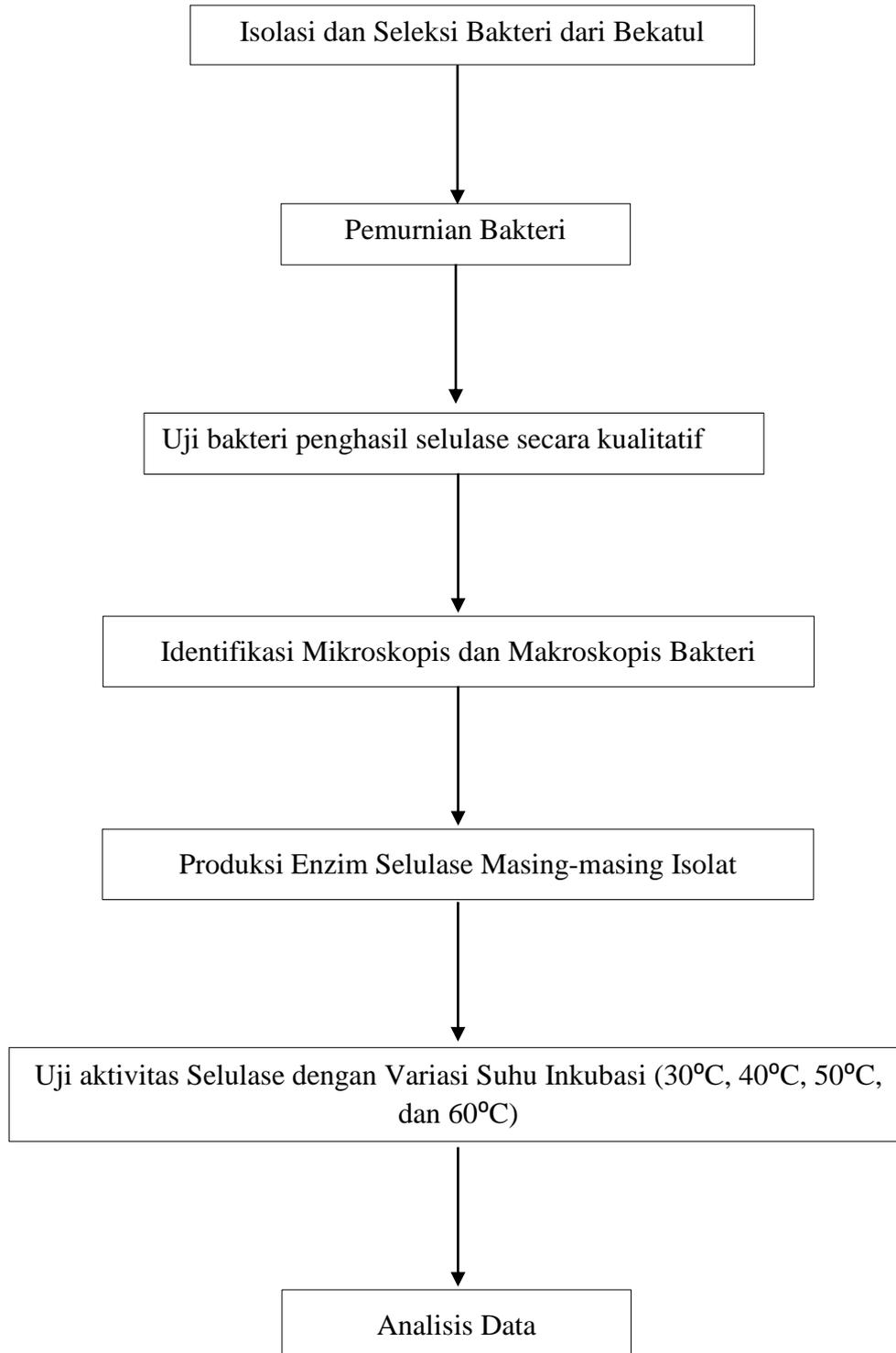
- Lynd, L.R., Paul J. W., Willem H. V. Z., dan I. S. Pretorius. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3), 506-577.
- Marantha, B. (2008). Aktivitas Enzim Selulase Isolat Asal Indonesia pada Berbagai Substrat Limbah Pertanian. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Marina et al 2018
- Marina, Orryani L., dan I. N. Suwastika (2018). Karakterisasi Selulase Asal Bakteri Tanah Danau Kalimpa'a Sulawesi Tengah. *Natural Science: Journal of Science and Technology* 7 (2), 138-147.
- Masfufatun. (2012). Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase. *Jurnal*. Surabaya: Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.
- Meryandini, A., Wahyu W., Besty M., Titi C. S., Nisa R., dan H. Satria. (2009). Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Sains* 13 (1), 33-38.
- Moat AG, Foster JW, dan Spector MP. (2002). *Microbial Physiology Fourth edition*. New York: Wiley-liss, Inc.
- Murtyaningsih, H., dan Hazmi, M. (2017). Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase pada Bakteri Selulolitik Asal Tanah Sampah. *Journal of Agricultural Science* 15 (2), 293-308.
- Nauli, T. (2014). Penentuan Sisi Aktif Selulase *Aspergillus niger* dengan Docking Ligan. *JKTI* 16 (2), 94-100.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2005). *Lehninger: Principles of Biochemistry*. New York: WH Freeman and Company.
- Nursalim, Y., dan Razali, Z., Y. (2007). *Bekatul: Makanan yang Menyehatkan*. Jakarta: Agromedia.
- Oktavia, F. I., Argo, B. D, dan Luthfi, M. (2014). Hidolisis Enzimatik Ampas Tebu (*Bagasse*) Memanfaatkan enzim selulase dari Mikrofungi *trichoderma resei* dan *Aspergillus niger* sebagai Katalisator dengan Pretreatment Microwave Enzymatic Hydrolysis of bagasse. *Jurnal Keteknik Pertanian ropis dan Biosistem* 2 (3), 256-262.
- Ompusunggu, H. E. S., Juwita, dan R. Silaban. (2013). Kajian Biomedik Enzim Amilase dan Pemanfaatannya dalam Industri. *J. Pend. Kimia* 5 (3), 182-191.
- Pelczar, A. D. dan Clark, E. R. (1998). *Dasar-Dasar Mikrobiologi 2*. Jakarta: Universitas Indonesia Perez, et al. (2002)
- Perez, J., Munoz Dorado, J., Rubia, T., dan Martinez, J. (2002). Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicelluloses, and lignin: Overview. *International Microbiology* 5, 53-63.
- Putri, M. H., Sukini, & Yodong. (2017). *Mikrobiologi. Bahan Ajar Keperawatan Gigi*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.

- Putri, S. (2016). Karakterisasi Enzim Selulase Yang Dihasilkan Oleh *Lactobacillus plantarum* Pada Variasi Suhu, pH Dan Konsentrasi Substrat. *Skripsi*. Malang: UIN Malang.
- Rahayu, A., dan Kuswytasari, N. D. (2013). Pengaruh Masa Inkubasi dan Konsentrasi Inokulum *Penicillium* sp. terhadap Aktivitas Enzim Selulase pada Medium Tongkol Jagung. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 2 (1), 1-4.
- Rao, B. S. N. (2000). Nutritive Value of Rice Bran. *Nutrition Foundation of India* : 5-8.
- Retnaningtyas, E., Retno, S., Sudiby, dan Jenie U. A. (2004). Pemanfaatan Bekatul untuk Meningkatkan Produksi Eritromisin dari Biakan *Saccaromyces erythraea* ATCC 11635. *Jurnal Sains dan Sibernatika* 17 (3): 343-361.
- Rosyada, N. (2015). Isolasi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Selulolitik pada Saluran Pencernaan Mentok (*Cairina moschata*). *Skripsi*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Salah, A., Sheble I., dan A. I. El-Diwany. (2007). Isolation and Identification of New Celluloses Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of The Crude Enzyme. *J. Applied Sci.* 1 (4), 473- 378.
- Saropah, D. A., Akyunul J., dan Anik M. (2012). Kenetika Reaksi Enzimatis Ekstrak Kasar Enzim Selulase Bakteri selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul. *Alchemy* 2 (1), 34-35.
- Sharfie, N. H., dan Norhaizan. (2017). *The Healing Components of Rice Bran*.
- Shihab, M. Quraish. (2002). *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian AlQur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, M. Quraish. (2009). *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian AlQur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sukumaran, R. K., Reeta R. S., dan A. Pandey. (2005). Microbial Cellulases, Production, Applications and Challenges. *J. of Science and Industrial Researh* 64 (11), 832-844.
- Supriyatna, A., Ida R., Yani S., dan S. Sa'adah. (2012). Isolation And Identification of Cellulolytic Bacteria From Waste Organic Vegetables and Fruits for Role In Making Materials Biogas. *Edisi Juli* (6) 1-2.
- Thahir, R. (2010). Revitalisasi Penggilingan Padi melalui Inovasi Pendukung Swasembada Beras dan Persaingan Global. *Buletin Pengembangan Inovasi Pertanian* 3 (3), 171-183.
- Volk, W. A., dan M. F. Wheeler. (1988). *Mikrobiologi Dasar*, Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Waluyo, I. (2004). *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press.

- Withers, S.G. dan R. Aebersold. (1995). Approach to Labeling and Identification of Active Site Residues in Glycosidases. *Protein Science* 4, 361-372.
- Zahidah, D., Shovitri, M., dan Domestik, A. L. (2013). Isolasi, Karakterisasi, dan Potensi Bakteri Aerob. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 2 (1), 12-15.
- Zimbro, M. J., David A. P., Sharoon M. M., George E. W., dan J. A. Johnson. (2009). *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media Second Edition*. Sparks: BD Diagnostics.

## LAMPIRAN

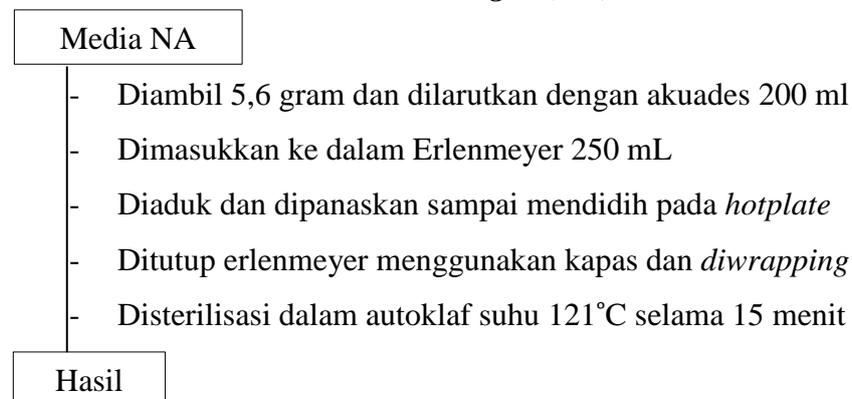
### Lampiran 1. Rancangan Penelitian



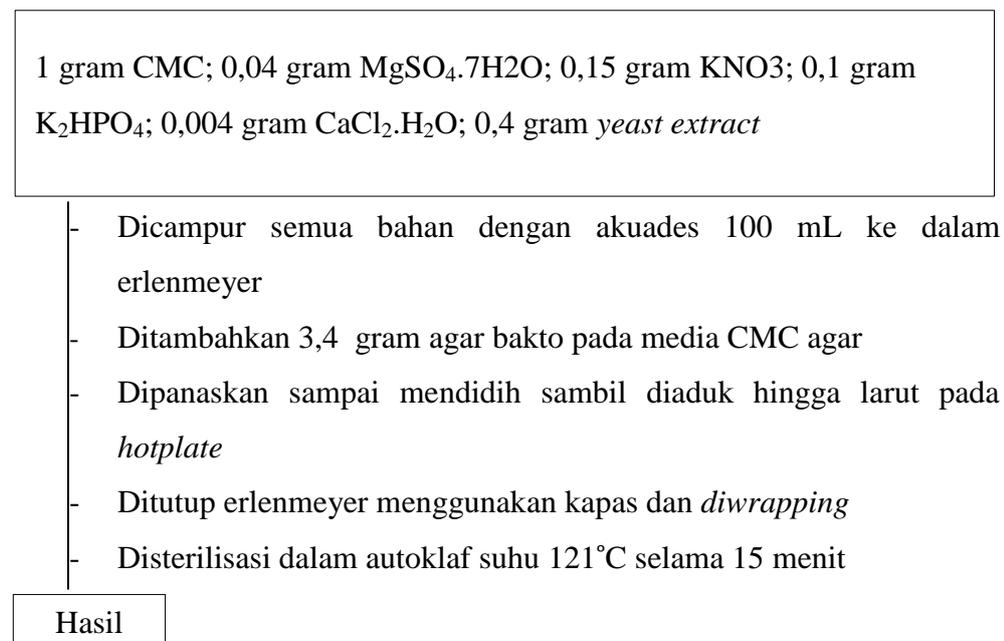
## Lampiran 2. Diagram Alir

### 1. Pembuatan Media

#### a. Pembuatan Media *Natrium Agar* (NA)



#### b. Pembuatan Media CMC Agar dan CMC *Broth*



## 2. Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Bekatul

### Bekatul Beras Putih

Dibersihkan dari pengotor kasarnya dengan cara diayak menggunakan ayakan 40 mesh

Ditimbang sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi NaCl 0.85% steril sebanyak 45 mL

Dikocok dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang

Dilakukan pengenceran bertingkat  $10^{-10}$  (Diambil 1 mL dari pengenceran sebelumnya lalu diencerkan dengan 9 mL NaCl 0.85% steril)

Diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam cawan petri untuk ditanam secara *pour plate* menggunakan media CMC agar (Pengenceran  $10^{-3}$  sampai dengan  $10^{-10}$ )

Diinkubasi selama 24 jam pada inkubator

Diamati morfologinya (koloni yang dihasilkan dari isolasi)

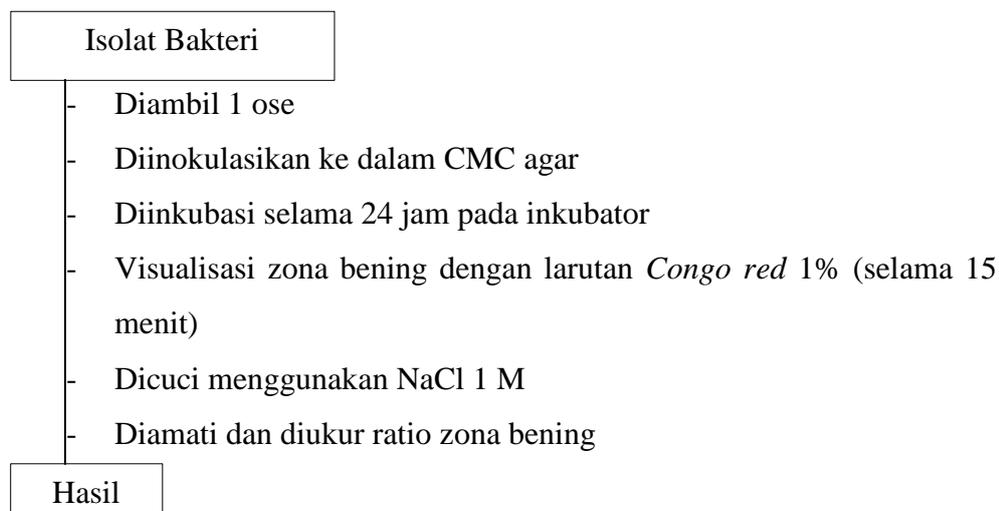
Dipindahkan pada Media NA miring untuk pemurnian (koloni yang terpisah)

Diambil satu ose isolat bakteri

Ditumbuhkan pada media NA miring dengan metode *streak* kuadran

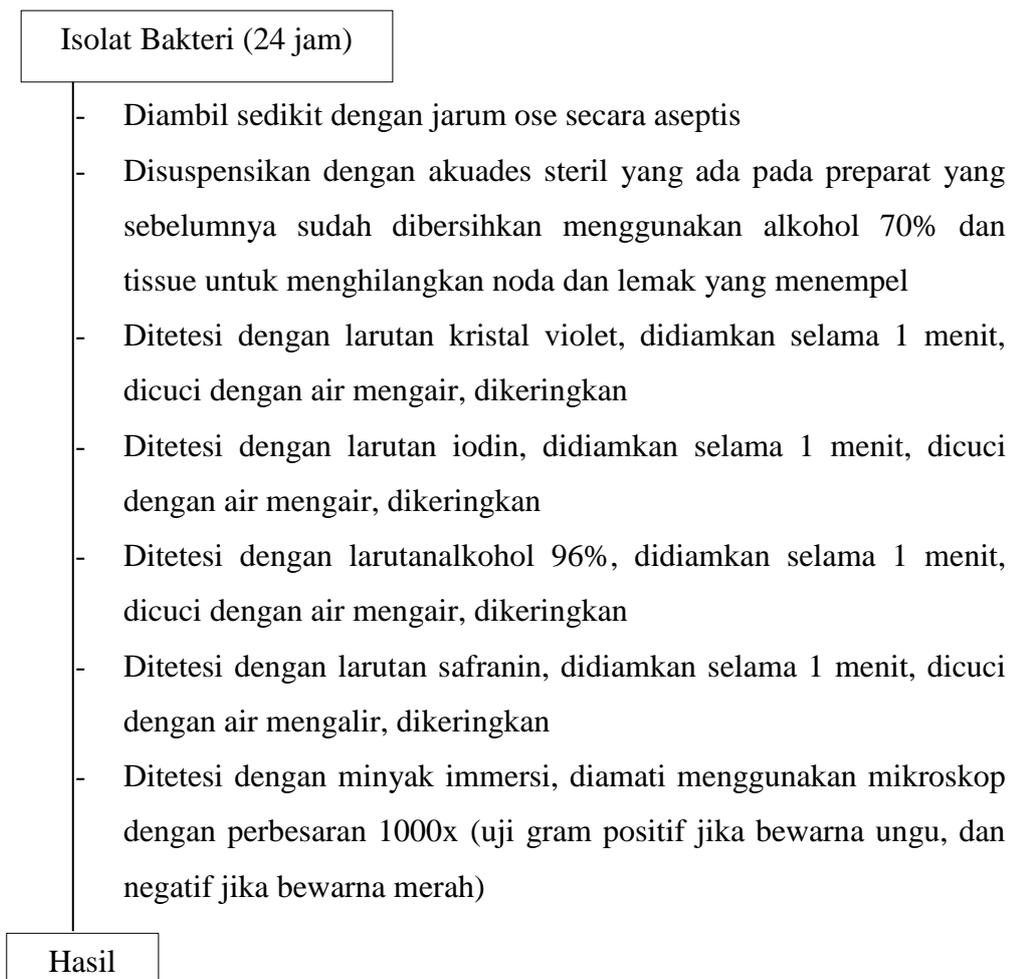
### Hasil

### 3. Uji Bakteri Penghasil Selulase secara Kualitatif



### 4. Identifikasi Mikroskopis dan Makroskopis Bakteri

#### a. Pewarnaan Gram



### b. Uji Katalase

Isolat Bakteri (24 jam)

- Diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis
- Disuspensikan dengan akuades steril yang ada pada preparat yang sebelumnya sudah dibersihkan menggunakan alkohol 70% dan tisu untuk menghilangkan noda dan lemak yang menempel
- Diteteskan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%
- Diamati pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni tersebut dan sekitarnya

Hasil

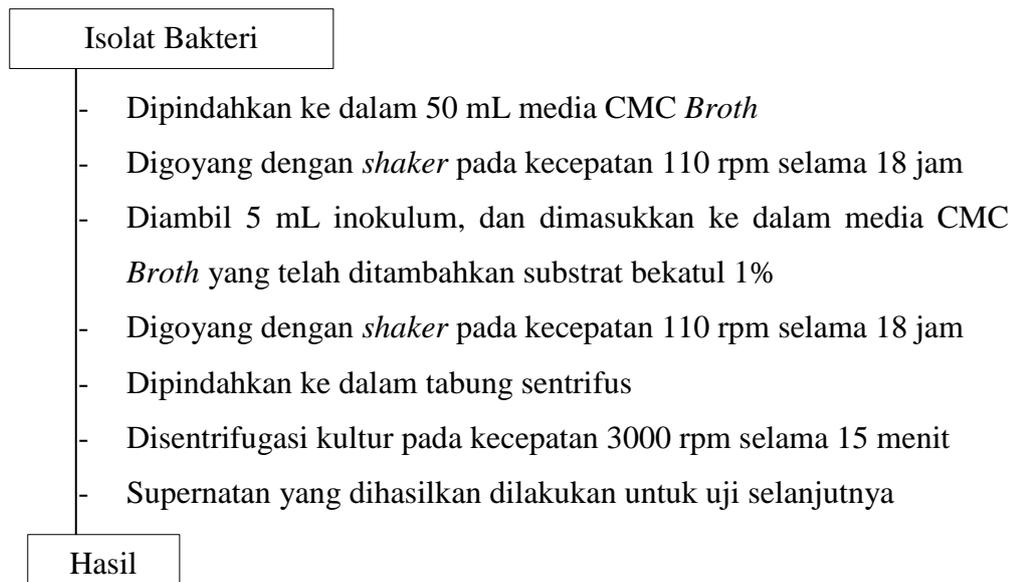
### c. Pewarnaan Endospora

Biakan murni bakteri

- Diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis
- Disuspensikan dengan akuades steril yang ada pada preparat yang sebelumnya sudah dibersihkan menggunakan alkohol 70% dan tisu untuk menghilangkan noda dan lemak yang menempel
- Difiksasi di atas api bunsen
- Disiapkan penangas air dengan *hotplate*
- Diletakkan preparat bakteri diatas beker dan ditutup dengan kertas saring/kertas tisu
- Ditetesi *malachit green* diatas kertas tisu hingga basah
- Dibiarkan di atas penangas air selama 6 menit, ditambahkan tetesan *malachite green* jika kertas tisu mulai terlihat kering (jangan biarkan preparat kering)
- Dipindahkan gelas preparat dan diambil kertas tisu yang menutup preparat
- Dibilas dengan air mengalir
- Ditambahkan 1 tetes safranin, dibiarkan selama 1 menit
- Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan
- Diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x

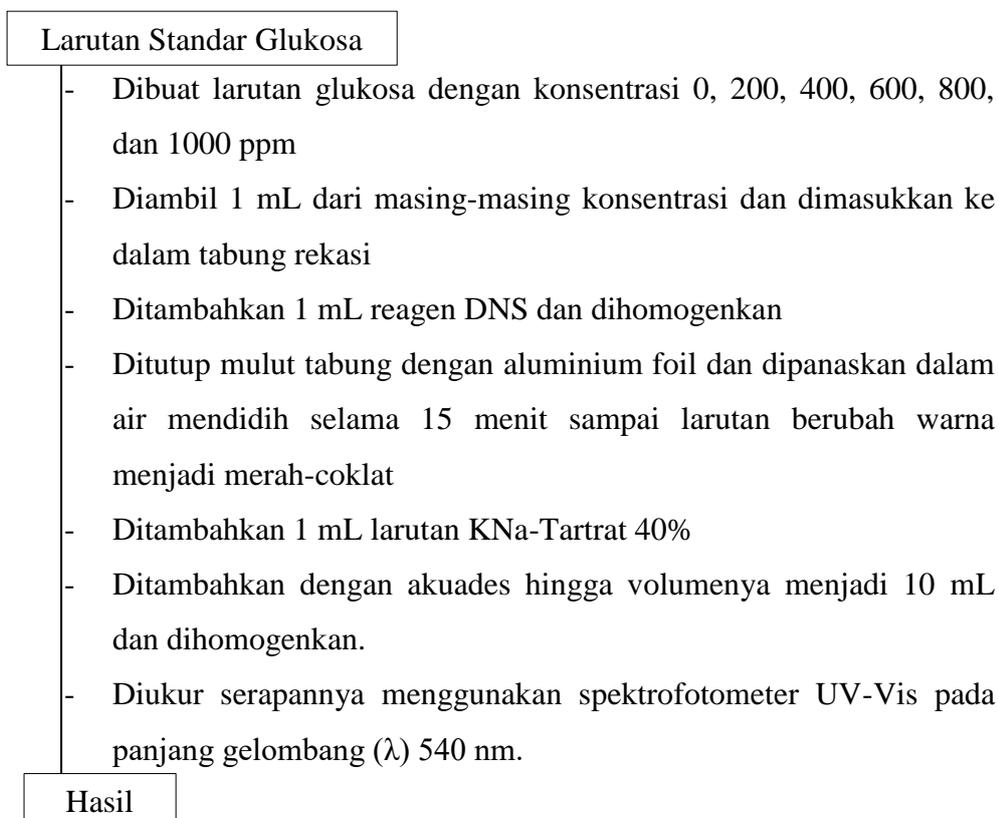
Hasil

## 5. Pembuatan Ekstrak Kasar Enzim Selulase



## 6. Analisa Kadar Gula Pereduksi dengan Metode DNS

### a. Pembuatan Kurva Standar Glukosa



**b. Uji Aktivitas Enzim Selulase****Ekstrak Kasar Enzim Selulase**

- Diambil larutan sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 1 mL CMC 1% yang dilarutkan pada larutan buffer fosfat pH 7
- Diinkubasi selama 30 menit pada variasi suhu (30°C, 40°C, 50°C, dan 60°C)
- Ditambahkan 1 mL reagen DNS dan dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit
- Ditutup mulut tabung dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit sampai larutan berubah warna menjadi merah-coklat
- Ditambahkan KNa-tartrat ke dalam tabung reaksi sebanyak 1 mL
- Ditambahkan akuades hingga volumenya 10 mL, dan dihomogenkan
- Diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 540 nm

**Hasil**

### Lampiran 3. Pembuatan Reagen

#### 1. Pembuatan Reagen DNS (Hasanah dan Iwan, 2015)

Menimbang 1 g DNS (*3,5-dinitrosalisilic acid*), melarutkan ke dalam 20 mL larutan NaOH 2 N dan 50 mL akuades, kemudian menambahkan 30 gram K-Na tartrat dan mengaduk dengan *magnetic stirrer* dan menambahkan akuades hingga volume akhir 100 mL Setelah larut, larutan disimpan dalam botol bewarna gelap.

#### 2. Pembuatan Reagen KNa-Tartrat 40%

Sebanyak 20 gram KNa-Tartrat dilarutkan dalam 50 mL akuades di erlenmeyer. Kemudian diaduk dengan *stirrer*. Setelah larut, larutan disimpan dalam botol bewarna gelap.

#### 3. Pembuatan Larutan Garam 0,85% NaCl

Konsentrasi 0,85% sama dengan 0,85 gram NaCl dalam 100 mL akuades. Sehingga, untuk membuat larutan garam 0,85 % NaCl adalah ditimbang sebanyak 0,85 gram serbuk NaCl, dilarutkan dengan akuades dalam beker gelas kurang dari 100 mL. Dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL, ditandabatkan dengan akuades, dan dihomogenkan.

#### 4. Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 7

Bahan-bahan yang digunakan adalah  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Massa yang dibutuhkan masing-masing bahan (dibuat 50 mL):

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0,1 \text{ mol/L} \times 0,05 \text{ L} \times 178 \text{ g/mol}$   
= 0,89 gram (dilarutkan dalam 50 mL akuades)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0,1 \text{ mol/L} \times 0,05 \text{ L} \times 156 \text{ g/mol}$   
= 0,78 gram (dilarutkan dalam 50 mL akuades)

Kedua larutan yang sudah dibuat tersebut dicampurkan sedikit demi sedikit kedalam beker gelas dan diukur pH nya menggunakan pH meter sampai constan pada pH 7.

#### Lampiran 4. Perhitungan Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Cara membuat larutan stok glukosa standar 1000ppm adalah:

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{1 \text{ g}}{1 \text{ L}} = \frac{0,1 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

Untuk membuat larutan standar 1000 ppm diperlukan 0,1 g glukosa, dilarutkan dengan akuades sebanyak 100 mL. kemudian larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm sebanyak 50 mL dibuat sesuai dengan menggunakan rumus pengenceran berikut:

Misal, menghitung konsentrasi 200 ppm

$$\begin{aligned} \text{Maka, } V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ ppm} &= 50 \times 200 \text{ ppm} \\ V_1 &= 10 \text{ mL} \end{aligned}$$

Konsentrasi Glukosa (ppm)	Volume Glukosa (mL)
200	10
400	20
600	30
800	40
1000	50

## Lampiran 5. Penentuan Indeks Aktivitas Selulase secara Kualitatif

### L.5.1 Tabel Hasil Pengukuran Zona Bening

No.	Kode Isolat Bakteri	Diameter Zona Bening (cm)	Diameter Koloni Bakteri (cm)	Indeks Aktivitas Enzim	Rasio
1.	IR 1	1.3	0.6	1.167	Sedang
2.	IR 2	3.5	2.8	0,250	Rendah
3.	IR 4	7.8	7.2	0,083	Rendah
4.	IR 6	1.6	1	0,600	Rendah
5.	IR 10	1.8	0.6	2.000	Tinggi

### L.5.2 Perhitungan Indeks Aktivitas Enzim Selulase Hasil Isolasi

Rumus:

$$\text{Indeks Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Diameter Zona Bening} - \text{Diameter Koloni}}{\text{Diameter Koloni}}$$

a) Isolat IR 1 = 0.083

$$\text{IAE} = \frac{1.3 \text{ cm} - 0.6 \text{ cm}}{0.6 \text{ cm}} = 1.167$$

d) Isolat IR 6

$$\text{IAE} = \frac{1.6 \text{ cm} - 1 \text{ cm}}{1 \text{ cm}} = 0.6$$

b) Isolat IR 2

$$\text{IAE} = \frac{3.5 \text{ cm} - 2.8 \text{ cm}}{2.8 \text{ cm}} = 0.25$$

e) Isolat IR 10

$$\text{IAE} = \frac{1.8 \text{ cm} - 0.6 \text{ cm}}{0.6 \text{ cm}} = 2.0$$

c) Isolat IR 4

$$\text{IAE} = \frac{7.8 \text{ cm} - 7.2 \text{ cm}}{7.2 \text{ cm}} = 0.083$$

### L.5.3 Tabel Klasifikasi Rasio Enzim Ekstraseluler (Choi, *et al.*, 2005)

Rasio Enzim Ekstraseluler	Reaksi
Tidak ada zona bening	Negatif
$\leq 1$	Rendah
1-2	Sedang
$\geq 2$	Tinggi

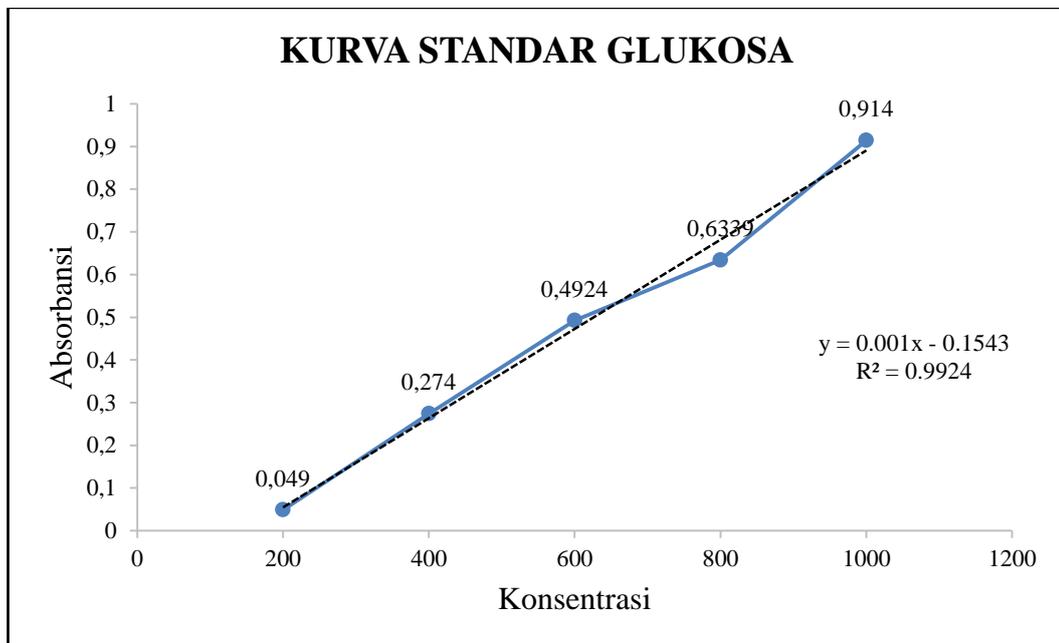
## Lampiran 6. Pembuatan Kurva Standar Larutan Glukosa

### L.6.1 Kurva Standar Larutan Glukosa

Tabel L.6.1 Data Absorbansi Larutan Glukosa pada  $\lambda$  540 nm

Konsentrasi Glukosa (ppm)	Absorbansi
200	0.0490
400	0.2740
600	0.4924
800	0.6339
1000	0.9140

Gambar L.5.1 Grafik Kurva Standar Glukosa



## Lampiran 7. Pengukuran Absorbansi dan Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase

**Tabel L.7.1 Nilai Absorbansi Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim**

Suhu	Kode Isolat	Ulangan			Total	Rata-rata
		1	2	3		
	Blanko	0	0	0	0	0
30°C	IR 1	0.0075	0.0131	0.1164	0.137	0.0457
	IR 2	0,0144	0.0099	0.0118	0.0361	0.0120
	IR 4	0.0049	0.009	0.0895	0.1034	0.0345
	IR 6	0.0127	0.0113	0.0301	0.0541	0.0180
	IR 10	0.003	0.0038	0.0796	0.0864	0.0288
40°C	IR 1	0.0075	0.0054	0.079	0.0919	0.0306
	IR 2	0.0074	0.0119	0.0166	0.0359	0.0120
	IR 4	0.0049	0.0182	0.0891	0.1122	0.0374
	IR 6	0.0067	0.0117	0.0305	0.0489	0.0163
	IR 10	0.0018	0.0099	0.0761	0.0878	0.0293
50°C	IR 1	0.0083	0.0119	0.0092	0.0294	0.0098
	IR 2	0.0079	0.0135	0.0098	0.0312	0.0104
	IR 4	0.0118	0.0077	0.0114	0.0309	0.0103
	IR 6	0.0115	0.01	0.0078	0.0293	0.0098
	IR 10	0,0305	0.003	0.0073	0.0103	0.0136
60°C	IR 1	0.0025	0.0058	0.0088	0.0171	0.0057
	IR 2	0,0151	0.0096	0.0062	0.0309	0.0103
	IR 4	0.0061	0.0118	0.0016	0.0195	0.0065
	IR 6	0.0038	0.0103	0.001	0.0151	0.0050
	IR 10	0,0326	0,0299	0.0117	0.0742	0.0247

### L.6.2 Perhitungan Konsentrasi Glukosa

**Rumus** :  $y = ax + b$

$$y = 0.001x + (- 0.1543)$$

$$y = 0.001x - 0.1543$$

(Dimana y = nilai absorbansi, dan x = konsentrasi glukosa)

### L.7.3 Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \times (\text{Volume total enzim} - \text{Substrat}) \text{ mL}}{\text{Berat molekul glukosa } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times \text{Volume enzim (mL)} \times \text{Waktu inkubasi (menit)}}$$

Dimana:

$$\text{Konsentrasi Glukosa} = \text{Nilai } x$$

$$\text{Volume Total Enzim-substrat} = 2 \text{ mL}$$

$$\text{Berat Molekul Glukosa} = 180 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Volume Enzim} = 1 \text{ mL}$$

$$\text{Waktu Inkubasi} = 30 \text{ menit}$$

Misal absorbansi selulase ekstrak kasar adalah 0.0457

$$\text{Maka } y = ax + b$$

$$0,0457 = 0,001x + (- 0,1543)$$

$$0,0457 = 0,001x - 0,1543$$

$$0,0457 + 0,1543 = 0,001x$$

$$0,1999 = 0,001x$$

$$X = 0,1999/0,001$$

$$X = 199,9 \text{ (Konsentrasi Glukosa)}$$

Sehingga,

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \times (\text{Volume total enzim} - \text{Substrat}) \text{ mL}}{\text{Berat molekul glukosa } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times \text{Volume enzim (mL)} \times \text{Waktu inkubasi (menit)}}$$

$$\text{AE} = \frac{199,9 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 2 \text{ mL}}{180 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times 1 \text{ mL} \times 30 \text{ menit}}$$

$$\text{AE} = 7,41 \times 10^{-2} \text{ U/mL} \times \text{FP}$$

$$\text{AE} = 7,41 \times 10^{-2} \text{ U/mL} \times 10$$

$$\text{AE} = 0,741 \text{ U/mL}$$

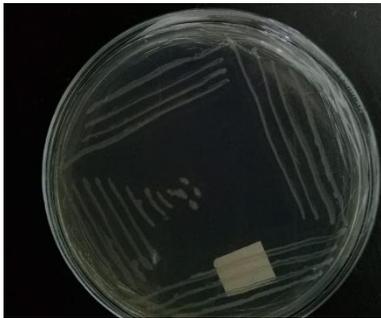
Satu unit aktivitas selulase dinyatakan dengan banyaknya unit mol glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL ekstrak kasar selulase per menit pada kondisi tertentu, sehingga aktivitas yang diperoleh adalah 0,741 U/mL.

**L.7.4 Data Hasil Uji Aktivitas Selulase dengan Variasi Suhu**

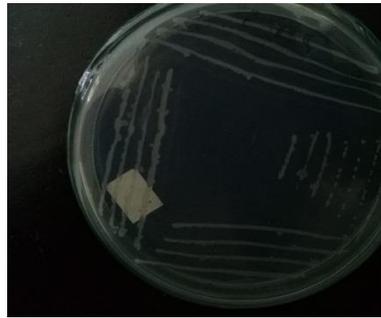
Suhu (°C)	Kode Isolat	Aktivitas Selulase (U/mL)
30 °C	IR 1	0,741
	IR 2	0,616
	IR 4	0,699
	IR 6	0,638
	IR 10	0,678
40 °C	IR 1	0,685
	IR 2	0,616
	IR 4	0,710
	IR 6	0,632
	IR 10	0,680
50 °C	IR 1	0,608
	IR 2	0,610
	IR 4	0,610
	IR 6	0,608
	IR 10	0,622
60 °C	IR 1	0,593
	IR 2	0,610
	IR 4	0,596
	IR 6	0,590
	IR 10	0,663

## Lampiran 8. Dokumentasi

### L.8.1 Bakteri Hasil Isolasi dari Bekatul



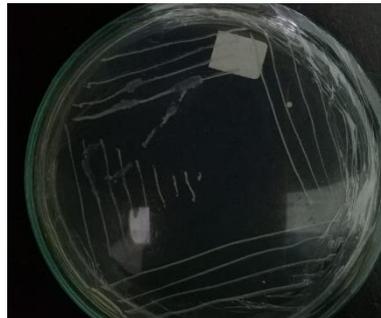
Isolat IR 1



Isolat IR 2



Isolat IR 4



Isolat IR 6



Isolat IR 10



Peremajaan Isolat Bakteri

### L.8.2 Uji Aktivitas Selulase



Ekstrak Kasar Enzim Selulase



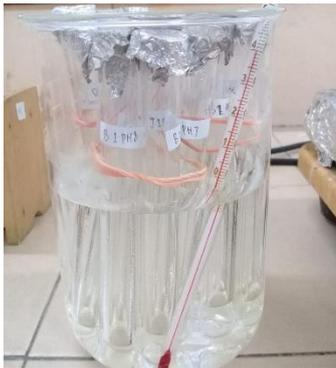
Larutan Glukosa Berbagai Konsentrasi



Kurva Standar Glukosa



Campuran Ekstrak kasar Enzim  
Selulase dan CMC 1% pH 7



Inkubasi dengan Berbagai Suhu



Proses Pemanasan Reagen DNS



Setelah Ditambahkan KNa-Tartrat  
40%



Uji Absorbansi sampel Menggunakan  
Spektrofotometer UV-Vis

**Lampiran 9. Statistik TwoWay ANOVA****Univariate Analysis of Variance**

[Data Set]

**Between-Subjects Factors**

		Value Label	N
Suhu	1	Suhu 30	15
	2	Suhu 40	15
	3	Suhu 50	15
	4	Suhu 60	15
Kode_Isolat	1	IR 1	12
	2	IR 2	12
	3	IR 4	12
	4	IR 6	12
	5	IR 10	12

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: Aktivitas\_Selulase

Suhu	Kode_Isolat	Mean	Std. Deviation	N
Suhu 30	IR 1	.074067	.0227430	3
	IR 2	.061600	.0008544	3
	IR 4	.069933	.0176540	3
	IR 6	.063833	.0038799	3
	IR 10	.067833	.0162531	3
	Total	.067453	.0133895	15
Suhu 40	IR 1	.068467	.0155359	3
	IR 2	.061600	.0017000	3
	IR 4	.071000	.0167215	3
	IR 6	.063167	.0046307	3
	IR 10	.067967	.0150859	3
	Total	.066440	.0111159	15
Suhu 50	IR 1	.060800	.0007211	3
	IR 2	.061000	.0010149	3
	IR 4	.060967	.0008386	3
	IR 6	.060767	.0007095	3
	IR 10	.062200	.0054286	3
	Total	.061147	.0022158	15
Suhu 60	IR 1	.059267	.0011504	3
	IR 2	.060933	.0016623	3
	IR 4	.059533	.0019035	3
	IR 6	.059033	.0017898	3
	IR 10	.066300	.0041869	3
	Total	.061013	.0034665	15
Total	IR 1	.065650	.0133145	12
	IR 2	.061283	.0012074	12
	IR 4	.065358	.0117130	12
	IR 6	.061700	.0033637	12
	IR 10	.066075	.0101923	12
	Total	.064013	.0092065	60

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Aktivitas\_Selulase

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.001 <sup>a</sup>	7	.000	1.378	.234
Intercept	.246	1	.246	3030.836	.000
Suhu	.001	3	.000	2.154	.105
Kode_Isolat	.000	4	6.463E-5	.797	.533
Error	.004	52	8.112E-5		
Total	.251	60			
Corrected Total	.005	59			

a. R Squared = .156 (Adjusted R Squared = .043)

## Post Hoc Tests

### Suhu

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Aktivitas\_Selulase

	(I) Suhu	(J) Suhu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Suhu 30	Suhu 40	.001013	.0032888	.990	-.007715	.009742
		Suhu 50	.006307	.0032888	.233	-.002422	.015035
		Suhu 60	.006440	.0032888	.217	-.002289	.015169
	Suhu 40	Suhu 30	-.001013	.0032888	.990	-.009742	.007715
		Suhu 50	.005293	.0032888	.382	-.003435	.014022
		Suhu 60	.005427	.0032888	.360	-.003302	.014155
	Suhu 50	Suhu 30	-.006307	.0032888	.233	-.015035	.002422
		Suhu 40	-.005293	.0032888	.382	-.014022	.003435
		Suhu 60	.000133	.0032888	1.000	-.008595	.008862
	Suhu 60	Suhu 30	-.006440	.0032888	.217	-.015169	.002289
		Suhu 40	-.005427	.0032888	.360	-.014155	.003302
		Suhu 50	-.000133	.0032888	1.000	-.008862	.008595
LSD	Suhu 30	Suhu 40	.001013	.0032888	.759	-.005586	.007613
		Suhu 50	.006307	.0032888	.061	-.000293	.012906
		Suhu 60	.006440	.0032888	.056	-.000159	.013039
	Suhu 40	Suhu 30	-.001013	.0032888	.759	-.007613	.005586
		Suhu 50	.005293	.0032888	.114	-.001306	.011893
		Suhu 60	.005427	.0032888	.105	-.001173	.012026
	Suhu 50	Suhu 30	-.006307	.0032888	.061	-.012906	.000293
		Suhu 40	-.005293	.0032888	.114	-.011893	.001306
		Suhu 60	.000133	.0032888	.968	-.006466	.006733
	Suhu 60	Suhu 30	-.006440	.0032888	.056	-.013039	.000159
		Suhu 40	-.005427	.0032888	.105	-.012026	.001173
		Suhu 50	-.000133	.0032888	.968	-.006733	.006466

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 8.11E-005.

## Homogeneous Subsets

**Aktivitas\_Selulase**

	Suhu	N	Subset
			1
Tukey	Suhu 60	15	.061013
HSD <sup>a,b</sup>	Suhu 50	15	.061147
	Suhu 40	15	.066440
	Suhu 30	15	.067453
	Sig.		.217

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 8.11E-005.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

## Kode Isolat

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Aktivitas\_Selulase

	(I) Kode Isolat	(J) Kode Isolat	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	IR 1	IR 2	.004367	.0036770	.758	-.006024	.014757
		IR 4	.000292	.0036770	1.000	-.010099	.010682
		IR 6	.003950	.0036770	.819	-.006440	.014340
		IR 10	-.000425	.0036770	1.000	-.010815	.009965
	IR 2	IR 1	-.004367	.0036770	.758	-.014757	.006024
		IR 4	-.004075	.0036770	.801	-.014465	.006315
		IR 6	-.000417	.0036770	1.000	-.010807	.009974
		IR 10	-.004792	.0036770	.690	-.015182	.005599
	IR 4	IR 1	-.000292	.0036770	1.000	-.010682	.010099
		IR 2	.004075	.0036770	.801	-.006315	.014465
		IR 6	.003658	.0036770	.856	-.006732	.014049
		IR 10	-.000717	.0036770	1.000	-.011107	.009674
	IR 6	IR 1	-.003950	.0036770	.819	-.014340	.006440
		IR 2	.000417	.0036770	1.000	-.009974	.010807
		IR 4	-.003658	.0036770	.856	-.014049	.006732
		IR 10	-.004375	.0036770	.757	-.014765	.006015
IR 10	IR 1	.000425	.0036770	1.000	-.009965	.010815	
	IR 2	.004792	.0036770	.690	-.005599	.015182	
	IR 4	.000717	.0036770	1.000	-.009674	.011107	
	IR 6	.004375	.0036770	.757	-.006015	.014765	
LSD	IR 1	IR 2	.004367	.0036770	.240	-.003012	.011745
		IR 4	.000292	.0036770	.937	-.007087	.007670
		IR 6	.003950	.0036770	.288	-.003428	.011328
		IR 10	-.000425	.0036770	.908	-.007803	.006953
	IR 2	IR 1	-.004367	.0036770	.240	-.011745	.003012
		IR 4	-.004075	.0036770	.273	-.011453	.003303
		IR 6	-.000417	.0036770	.910	-.007795	.006962
		IR 10	-.004792	.0036770	.198	-.012170	.002587
	IR 4	IR 1	-.000292	.0036770	.937	-.007670	.007087
		IR 2	.004075	.0036770	.273	-.003303	.011453

	IR 6	.003658	.0036770	.324	-.003720	.011037
	IR 10	-.000717	.0036770	.846	-.008095	.006662
IR 6	IR 1	-.003950	.0036770	.288	-.011328	.003428
	IR 2	.000417	.0036770	.910	-.006962	.007795
	IR 4	-.003658	.0036770	.324	-.011037	.003720
	IR 10	-.004375	.0036770	.240	-.011753	.003003
IR 10	IR 1	.000425	.0036770	.908	-.006953	.007803
	IR 2	.004792	.0036770	.198	-.002587	.012170
	IR 4	.000717	.0036770	.846	-.006662	.008095
	IR 6	.004375	.0036770	.240	-.003003	.011753

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 8.11E-005.

### Homogeneous Subsets

Aktivitas_Selulase			
	Kode_Isolat	N	Subset
			1
Tukey	IR 1	12	.061283
HSD <sup>a,b</sup>	IR 2	12	.061700
	IR 4	12	.065358
	IR 6	12	.065650
	IR 10	12	.066075
	Sig.		.690

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 8.11E-005.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b. Alpha = .05.