

**PENGARUH JENIS SUBSTRAT PADA PRODUKSI ENZIM SELULASE
OLEH BAKTERI SELULOLITIK ASAL BEKATUL DAN PENGUJIAN
AKTIVITAS DENGAN VARIASI PH**

SKRIPSI

**Oleh:
NAJIYATUL FALICHAH
NIM. 16630086**



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

**PENGARUH JENIS SUBSTRAT PADA PRODUKSI ENZIM SELULASE
OLEH BAKTERI SELULOLITIK ASAL BEKATUL DAN PENGUJIAN
AKTIVITAS DENGAN VARIASI PH**

SKRIPSI

**Oleh:
NAJIYATUL FALICHAH
NIM. 16630086**

**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**

**PENGARUH JENIS SUBSTRAT PADA PRODUKSI ENZIM SELULASE
OLEH BAKTERI SELULOLITIK ASAL BEKATUL DAN PENGUJIAN
AKTIVITAS DENGAN VARIASI PH**

SKRIPSI

Oleh:
NAJIYATUL FALICHAH
NIM. 16630086

Telah Diperiksa dan disetujui untuk Diuji
Tanggal 14 Desember 2021

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M. S. I.
NIPT. 201402011409

Mengetahui,
Ketua Program Studi



Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 1 010

**PENGARUH JENIS SUBSTRAT PADA PRODUKSI ENZIM SELULASE
OLEH BAKTERI SELULOLITIK ASAL BEKATUL DAN PENGUJIAN
AKTIVITAS DENGAN VARIASI PH**

SKRIPSI

**Oleh:
NAJIYATUL FALICHAH
NIM. 16630086**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelas Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 14 Desember 2021**

Penguji Utama : Eni Yulianti, M.Si (.....)
NIP. 19760611 200501 2 006

Ketua Penguji : Anik Maunatin, M.P. (.....)
NIDT. 19760105 20180201 2 248

Sekretaris Penguji : Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P. (.....)
NIP. 19750410 200501 2 009

Anggota Penguji : Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I. (.....)
NIPT. 201402011409

**Mengesahkan,
Ketua Program Studi**

**Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 1 010**

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah robbil ‘alamin dengan mengucapkan rasa syukur kepada Allah swt, skripsi saya ini persembahkan untuk:

Kedua orangtua, Bapak Asrul Purnomo dan Ibu, Qona’ah, Kakak saya Muhammad Abu Bakar, Tante saya Sri Amaliyah. Yang telah memberi saya cinta, kasih sayang serta perhatian yang begitu besar. Senantiasa memberi saya nasihat, dukungan dan do’a untuk keberhasilan saya. Selain itu mendukung keputusan yang saya pilih dan memberikan kekuatan mental kepada saya sehingga saya dapat menyelesaikan kewajiban pendidikan saya dalam menempuh S1 Kimia.

Seluruh dosen, staf laboran dan administrasi program studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang yang selalu memberikan bimbingan, arahan dan ilmu yang bermanfaat baik dalam proses saya menempuh pendidikan S1 Kimia. Terkhusus kepada Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P. selaku pembimbing utama saya, Bapak Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I. selaku Pembimbing agama, Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc. selaku dosen wali, Ibu Eni Yulianti, M.Si. dan Ibu Anik Muanatin, M.P selaku dosen penguji yang telah membimbing dan mengarahkan saya mulai dari pembuatan proposal, penelitian di laboratorium hingga saya dapat menyelesaikan naskah skripsi ini.

Teman-teman yang saya cintai dan sayangi.

Yang telah memberikan semangat, dorongan serta motivasi dalam proses penulisan skripsi saya mulai dari awal sampai akhir. Terkhusus teman-teman Oktet-C, Carbon, Keluarga Cemara, Kost-88 dan sahabat saya di rumah yang selalu mendukung saya.

Tiada kata yang bisa saya ucapkan selain terima kasih yang sebanyak-banyaknya.

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Najiyatul Falichah

NIM : 16630086

Program Studi : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Pengaruh Jenis Substrat pada Produksi Enzim Selulase oleh Bakteri Selulolitik Asal Bekatul dan Pengujian Aktivitas Dengan Variasi pH

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 24 Desember 2021

Yang membuat Pernyataan



Najiyatul Falichah

NIM. 16630086

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis sampaikan kehadirat Allah Swt yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal ini dengan judul **“Pengaruh Jenis Substrat pada Produksi Enzim Selulase oleh Bakteri Selulolitik Asal Bekatul dan Pengujian Aktivitas Dengan Variasi pH”**. Pada kesempatan ini penulis juga ingin menyampaikan terimakasih pada berbagai pihak, diantaranya adalah:

1. Prof. Dr. M. Zainuddin, MA selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Rachmawati Ningsih, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P., selaku Dosen Pembimbing I Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I. selaku Dosen Pembimbing I Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Kepada dosen, staf, dan pegawai yang telah banyak membantu dan memberikan pelayanan, pengalaman dan wawasan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
7. Kepada kedua orang tua dan keluarga yang senantiasa memberikan do'a dan motivasi agar senantiasa sabar dan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.
8. Kepada seluruh teman seperjuangan angkatan 2016 yang senantiasa saling memberi semangat dalam menyelesaikan skripsi ini. Terutama kepada teman satu tim saya Lailatul Fitria yang banyak membantu dalam penelitian saya. Semua anggota grup “Gabut Manfaat” yaitu Novia Alfiyansyah Putri, Hani Hardiyani, Fatimatuzzahro' dan grup “Gibah Always” Siska Asy Shofa, Syarifah Nadya, dan Ainun Nadhiroh.

9. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah banyak membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini.

Demikian yang dapat penulis sampaikan, kurang lebihnya penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya. Semoga proposal skripsi ini dapat memberikan manfaat, tambahan ilmu dan dapat menjadi acuan untuk kedepannya.

Malang, 14 Oktober 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
مستخلص البحث.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan	7
1.4 Batasan Masalah.....	7
1.5 Manfaat Penelitian.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Limbah Pertanian	9
2.1.1 Jerami.....	9
2.1.2 Dedak.....	10
2.1.3 Bekatul.....	11
2.2 Selulosa	12
2.3 Degradasi Selulosa	14
2.4 Bakteri Selulolitik.....	17
2.5 Bakteri Selulolitik Asal Bekatul.....	18
2.6 Uji Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode Asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS).....	20
2.7 Integrasi Al-Quran tentang Pemanfaatan Limbah Pertanian	21
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	26
3.1 Pelaksanaan Penelitian.....	26
3.2 Alat dan Bahan	26
3.2.1 Alat	26
3.2.2 Bahan	26
3.3 Rancangan Penelitian.....	27
3.4 Tahapan Penelitian	27
3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	28
3.5.2 Preparasi Jerami Padi.....	28

3.5.3 Pembuatan Media	28
3.5.4 Regenerasi Bakteri Selulolitik.....	29
3.5.5 Pembuatan Inokulum.....	29
3.5.6 Produksi Ektak Kasar Enzim Selulase dari Berbagai Substrat	29
3.5.7 Uji Aktivitas Enzim Selulase	30
3.6 Analisis Data.....	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Pengaruh Delignifikasi terhadap Aktivitas Enzim	32
4.2 Peremajaan Bakteri Selulolitik.....	34
4.3 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase pada Berbagai Jenis Media Pertumbuhan.....	35
4.4 Kurva Standart Glukosa Menggunakan Metode DNS	36
4.5 Pengaruh Jenis Substrat terhadap Aktivitas Enzim Selulase	37
4.6 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Selulase.....	40
4.7 Dialog Hasil Penelitian dalam Prespektif Keislaman.....	42
BAB V PENUTUP	48
5.1 Kesimpulan	48
5.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Serat Kasar Pada Jerami Padi	9
Tabel 2.2 Metode <i>Pre-Treatment</i> untuk Bahan Lignoselulosa (Jerami)	10
Tabel 2.3 Bakteri yang Memproduksi Enzim Selulase	18
Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Variasi pH dan Jenis Substrat	27
Tabel 4.1 Hasil Uji DNMRT Variasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Selulase	39
Tabel 4.2 Hasil Uji DNMRT Variasi pH Terhadap Aktivitas Enzimselulase	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jerami Padi.....	10
Gambar 2.2 Dedak Padi.....	11
Gambar 2.3 Lapisan dalam Bekatul Padi	12
Gambar 2.4 Struktur Selulosa	14
Gambar 2.5 Proses Degradasi Selulosa dengan Bantuan Enzim Selulase	16
Gambar 2.6 Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	18
Gambar 2.7 Reaksi DNS dengan gula pereduksi	21
Gambar 4.1 Proses Delignifikasi pada Jerami Padi	33
Gambar 4.2 Reaksi Delignifikasi dengan NaOH	33
Gambar 4.3 Hasil Regenerasi Bakteri Selulolitik	34
Gambar 4.4 Grafik Kurva Standart Glukosa	37
Gambar 4.5 Aktivitas Enzim Selulase Variasi pH	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	57
Lampiran 2. Diagram Alir	58
Lampiran 3. Pembuatan Reagen	62
Lampiran 4. Perhitungan	63
Lampiran 5. Pembuatan Kurva Standar Larutan Glukosa.....	64
Lampiran 6. Pengukuran Absorbansi dan Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase.....	65
Lampiran 7. Dokumentasi	68
Lampiran 8. Statistik Two a Way ANOVA	70

ABSTRAK

Falichah, Najiyatul. 2021. **Pengaruh Jenis Substrat pada Produksi Enzim Selulase oleh Bakteri Selulolitik Asal Bekatul dan Pengujian Aktivitas Dengan Variasi pH. Skripsi.** Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P. Pembimbing II: Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M. S. I.

Kata Kunci : Limbah pertanian, Selulosa, Bakteri Selulolitik, Enzim Selulase, DNS

Enzim selulase memiliki kemampuan untuk mendegradasi selulosa menjadi gula yang lebih sederhana yaitu glukosa. Salah satu bakteri yang dapat menghasilkan enzim selulase ialah bakteri selulolitik. Bakteri ini didapat dari salah satu limbah pertanian yaitu bekatul. Aktivitas enzim selulase diuji dalam berbagai macam substrat dalam beberapa pH. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh aktivitas selulase dengan variasi pH (6;6,5;7;7,5; dan 8) dan substrat limbah pertanian (jerami padi, bekatul, dan dedak).

Penelitian ini diawali dengan tahapan regenerasi bakteri *Bacillus* dengan menggunakan media pertumbuhan selektif CMC (*Carboxymethyl Cellulose*). Selanjutnya dilakukan pembuatan inokulum dari kultur, sehingga didapatkan produk kasar enzim selulase. Dilakukan uji aktivitas selulase dengan menggunakan metode *3,5-Dinitrosalicylic acid* (DNS) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Two A Way ANOVA dengan metode Rancangan Acaka Kelompok (RAK) dan jika terdapat pengaruh yang signifikan, maka dilanjut dengan uji DNMRT.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulase pada pH 6;6,5;7;7,5; dan 8 substrat Jerami secara berturut-turut adalah 0,352346, 0,454321, 0,612593, 0,783704, 0,824 U/mL. Pada substart dedak diperoleh nilai aktivitas selulase secara berturut-turut ialah 0,370494, 0,515432, 0,667407, 1,03963, 1,084 U/mL. Pada substart bekatul diperoleh nilai aktivitas selulase secara berturut-turut ialah 0,355802, 0,503951, 0,656296, 1,03642, 1,117 U/mL). Aktivitas selulase optimum ditunjukkan pada pH 8 dengan nilai aktivitas sebesar 0,824 U/mL pada substrat jerami; 1,084 U/mL pada substart dedak; dan 1,117 U/mL pada substrat bekatul. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa aktivitas selulase memiliki pengaruh beda nyata signifikan ($\text{sig} < \alpha$) terhadap variasi pH 6;6,5;7 sedangkan tidak berbedanyata pada pH 7,5 dan 8. Substrat jerami tidak memberi pengaruh yang beda nyata terhadap substrat bekatul dan dedak.

ABSTRACT

Falichah. Najiyatul. 2021. **The Effect of Substrate Type on Cellulase Enzyme Production by Cellulolytic Bacteria from Rice bran and Activity Testing with Variations in pH.** Thesis. Departement of Chemistry, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor I: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P. Advisor II: Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M. S. I.

Keywords: Agricultural Waste, Cellulose, Cellulolytic Bacteria, Cellulase Enzymes, DNS

The cellulase enzymes have the ability to degrade cellulose into simpler sugars, namely glucose. One of the bacteria that can produce cellulase enzymes is cellulolytic bacteria. This bacterium is obtained from one of the agricultural wastes, namely rice bran. Cellulase enzyme activity was tested on a variety of substrates in several pHs. The purposes of the study are to determine the influence of cellulase activity with variations in pH (6; 6.5; 7; 7.5; and 8) and agricultural waste substrates (rice straw, rice bran, and bran).

The research was begun with the regeneration of Bacillus bacteria using CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) selective growth media. Furthermore, the inoculum was made from the culture, so that it was obtained the crude product of the cellulase enzyme. Cellulase activity was tested using the 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) method by using a UV-Vis spectrophotometer. The data obtained were analyzed using Two A Way ANOVA with the method of Randomized Block Design (RAK) and if there was a significant effect, then continued with the DNMRT test.

The results showed that the cellulase enzyme activity at pH 6;6.5;7;7.5; and 8 Straw substrates were 0.352346, 0.454321, 0.612593, 0.783704, 0.824 U/mL, respectively. In the bran substrate, the cellulase activity values obtained were 0.370494, 0.515432, 0.667407, 1.03963, 1.084 U/mL. In the rice bran substrate, the cellulase activity values obtained were 0.355802, 0.503951, 0.656296, 1.03642, 1.117 U/mL). The highest cellulase activity was shown at pH 8 with an activity value of 0.824 U/mL on the straw substrate; 1.084 U/mL at bran substrate; and 1.117 U/mL on the rice bran substrate. The results of statistical tests showed that cellulase activity had a significantly different effect ($\text{sig} <$) on variations in pH 6;6.5;7, while there was no significant difference at pH 7.5 and 8. Rice Straw substrate did not give a significantly different effect on rice bran substrate and bran.

مستخلص البحث

فالحة، نجية. 2021. تأثير درجة الحموضة ونوع الركيزة على نشاط السليولاز باستخدام إسولات بكتريا *Bacillus subtilis* أصل البكاتل. رسالة الجامعي. قسم دراسة الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: الدكتور أكيون الجنة، الماجستير. المشرف الثاني: محمد مخلص فخر الدين، الماجستير.

الكلمات المفتاحية: النفايات الزراعية، السليولوز، البكتيريا المحللة للجلد، إنزيم السليولاز، *Dinitrosalicylic acid*

تمتلك إنزيمات السليولوز القدرة على تحلل السليولوز إلى سكريات أبسط وهي الجلوكوز. واحدة من البكتيريا التي يمكن أن تنتج إنزيمات السليولوز هي البكتيريا السليلوليتية. تم الحصول على هذه البكتيريا من أحد المخلفات الزراعية وهي نخالة الأرز. تم اختبار نشاط إنزيم السليولاز على مجموعة متنوعة من الركائز في العديد من الأس الهيدروجيني. كان الهدف من هذا البحث هو تحديد تأثير نشاط السليولاز مع الاختلافات في الأس الهيدروجيني (6؛ 6.5؛ 7؛ 7.5؛ 8) وركائز النفايات الزراعية (قش الأرز ونخالة الأرز والنخالة).

بدأ هذا البحث بتجديد بكتيريا *Bacillus* باستخدام وسائط النمو الانتقائية *CMC* (*Carboxymethyl Cellulose*). علاوة على ذلك، تم إجراء اللقاح من المزرعة، بحيث تم الحصول على المنتج الخام من إنزيم السليولاز. تم اختبار نشاط السليولاز باستخدام طريقة *3,5-Dinitrosalicylic acid* باستخدام مقياس الطيف الضوئي UV-Vis. تم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها باستخدام *Two A Way ANOVA* مع طريقة تصميم الكتلة العشوائية وإذا كان هناك تأثير كبير، فتابع مع اختبار *DNMRT*.

أظهرت النتائج أن نشاط إنزيم السليولاز عند الأس الهيدروجيني 6؛ 6.5؛ 7؛ 7.5؛ و 8 ركائز من القش كانت 0.352346، 0.454321، 0.612593، 0.783704، 0.824 وحدة/ مل على التوالي. في ركيزة النخالة، كانت قيم نشاط السليولاز التي تم الحصول عليها 0.370494، 0.515432، 0.667407، 1.03963، 1.084 وحدة/ مل. في ركيزة نخالة الأرز، كانت قيم نشاط السليولاز التي تم الحصول عليها 0.355802، 0.503951، 0.656296، 1.03642، 1.117 وحدة/ مل. تم عرض أعلى نشاط من السليولاز عند درجة الحموضة 8 بقيمة نشاط تبلغ 0.824 وحدة/ مل على ركيزة القش 1.084 وحدة/ مل في ركيزة

النخالة؛ و 1.117 وحدة/ مل على ركيزة نخالة الأرز أظهرت نتائج الاختبارات الإحصائية أن نشاط السليلاز كان له تأثير مختلف بشكل كبير ($\text{sig} < \alpha$) على جميع الاختلافات في الأس الهيدروجيني وركائز القش، بينما لم يؤثر بشكل كبير على ركائز نخالة الأرز والنخالة.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pemanfaatan limbah pertanian di Indonesia sangat diperlukan oleh masyarakat sekitar terutama banyaknya limbah selulosa yang sulit untuk diuraikan oleh bakteri-bakteri yang telah tersedia di alam. Limbah selulosa yang telah terakumulasi dan diendapkan sehingga mengakibatkan risiko pencemaran lingkungan. Jerami, bekatul, dan dedak adalah satu limbah pertanian yang memiliki kandungan selulosa tinggi. Pemanfaatan limbah selulosa digunakan sebagai biogas, biomassa, dan dapat pula dimanfaatkan dalam bidang industri seperti: tekstil, pulp, industri kertas, detergen, dan pada makanan hewan dengan menghidrolisis selulosa pada dedak yang berguna pada hewan ternak karena dapat menurunkan kadar serat sehingga mudah untuk dicerna. Limbah pertanian yang tidak dimanfaatkan dapat menyebabkan kerusakan alam dan kesetimbangan, sesuai firman Allah dalam QS Al-A'raaf (7) ayat 56:

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

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

Maksud dari kalimat diatas “*dan janganlah kamu membuat kerusakan dimuka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya*” adalah Allah melarang segala perbuatan yang dapat menimbulkan kerusakan di bumi yang dapat membahayakan kelestariannya sesudah diperbaiki. Oleh sebab itu, manusia diperintahkan untuk

mengelola alam dengan cara melestarikan dan mengurangi dampak dari limbah yang dihasilkan. Manusia juga diperintahkan untuk berdoa kepada-Nya serta memohon belas kasih-Nya dengan perasaan takut terhadap siksa-Nya.

Ustman (2008) dalam *Tafsir Al-Qurthubi* juga menjelaskan bahwa dalam Surat Al-A'raaf (7) ayat 56 dibahas satu masalah yaitu Allah melarang melakukan segala kerusakan di bumi meskipun hanya berdampak sedikit. Menurut Adh-Dhahhak arti dari kerusakan tersebut adalah termasuk menghentikan sumber air dan memotong pohon. Berdasarkan beberapa tafsir tersebut, dapat disimpulkan bahwa maksud dari Surat Al-A'raaf (7) ayat 56 adalah Allah melarang manusia untuk berbuat kerusakan di muka bumi, karena bumi sudah diciptakan Allah begitu sempurna untuk manusia. Sehingga kita sebagai manusia dapat memanfaatkan limbah pertanian yang memiliki kandungan selulosanya antara lain: jerami padi, dedak padi, dan bekatul

Jerami merupakan batang dari padi yang memiliki sifat keras dan sulit untuk dihidrolisis. Cara pengomposan alami pada jerami dilakukan dengan didiamkan pada ruangan terbuka selama 1-1,5 setelah terjadi pembusukan dikumpulkan dan dibentuk seperti bola dengan diameter 40-50 cm dengan lama pembusukan kira-kira 2 minggu. Kemudian jerami dibalik dan dibiarkan selama 2 minggu. Selanjutnya dibiarkan pada ruang terbuka dan bagian jerami yang belum terlapuk dipotong-potong atau dikumpulkan membentuk galangan (Warta Penelitian dan pengembangan Pertanian, 2007). Melalui sentuhan teknologi, jerami padi dapat dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan pupuk dan sumber pakan ternak (Pane, 2014; Asmin dan La Karimuna, 2014). Banyak potensi yang bisa dimanfaatkan dari jerami padi diantaranya dapat diolah menjadi sumber energi alternatif seperti biogas

(Romli, 2014 dalam Dehghani, 2015) maupun bioetanol (Yoswathana, 2010 dalam Roslan, dkk., 2011). Pengomposan jerami padi yang membutuhkan waktu lama yang disebabkan karena jerami mengandung senyawa-senyawa yang sulit untuk dihidrolisis, yaitu selulosa 42-45%, hemiselulosa 27-30%, lignin 20-28%, serat kasar 34-40%, protein kasar 3-4% (Soerawidjaja, 2005).

Dedak salah satu hasil dari proses penggilingan pertama pada padi yang terdiri pada lapisan luar butiran beras, sedangkan pada proses penyosohan kedua akan menghasilkan bekatul. Dedak memiliki lapisan yang disebut *aleurone* atau kulit ari yang merupakan protein yang dipakai sebagai cadangan makanan. Aleuron merupakan lapisan terluar endospermium. Penyosohan akan menghasilkan beras sosoh, dedak, dan bekatul di bagian endosperma tersebut. Kandungan yang terdapat dalam dedak padi antara lain selulosa 9-12,8%, hemiselulosa 8,7-11,4% (Astawan, 2009).

Bekatul terdapat pada kulit terdalam padi atau kulit ari dari proses penggilingan kedua. Bekatul memiliki beberapa lapisan yaitu aleuron, perikap, dan bagian endosperma (Oliveira, 2012). Menurut Oktaviyanti (2015) banyak kandungan yang dimiliki oleh bekatul antara lain karbohidrat 22,04%, fosfor 2,39%, serat kasar 8,2-12,2%, protein kasar 12,7-13,5%, protein 14,9%, kalsium 0,13%, kalium 0,14%, natrium 0,24%, silika 4,07%, selulosa 32,8%, hemiselulosa 42,8%, lemak 12,5%, lignin 24,4%, magnesium 0,14% dan air 3,6%. Dapat diketahui beberapa jenis penelitian telah menjelaskan bahwasanya bekatul memiliki nilai gizi tinggi, yang mengandung senyawa bioaktif berfungsi sebagai antioksidan yang bermanfaat dalam pencegahan penyakit termasuk penuaan dini (Irawadi, 1990).

Hidrolisis selulosa menghasilkan glukosa melibatkan enzim multi kompleks selulase yang terdiri dari tiga macam enzim, yaitu *endoglukanase*, *eksoglukanase* dan *β -glukosidase*. Ketiga macam enzim tersebut bekerja secara sinergis untuk hidrolisis lengkap selulosa menjadi glukosa melalui beberapa tahapan hidrolisis. Pertama, serat selulosa dihidrolisis oleh *endoglukanase* melepaskan fragmen selulosa kecil dengan bagian ujung bebas dalam bentuk pereduksi dan non pereduksi, yang kemudian dihidrolisis lebih lanjut oleh *eksoglukanase* melepaskan *oligosakarida* berukuran kecil dan selobiosa. Pada tahap akhir, *β -glukosidase* melengkapi hidrolisis selulosa dengan menghidrolisis selobiosa yang merupakan produk intermediet hidrolisis selulosa sehingga menjadi monomer glukosa (Singhania, 2013). Peran dari enzim selulase yaitu dapat menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik untuk menghasilkan oligosakarida maupun glukosa. Kandungan selulosa dan hemiselulosa yang tinggi pada jerami padi memberikan peluang pemanfaatan bakteri selulolitik untuk mempercepat proses laju dekomposisi (Nur, 2009).

Bakteri selulolitik menghasilkan enzim selulase yang menghidrolisis selulosa kristal menjadi oligosakarida yang lebih kecil, dan akhirnya menjadi glukosa yang dapat digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber hara dalam pertumbuhannya. Bhat (2000) menyatakan bahwa enzim selulase banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri, misalkan industri makanan, minuman, pulp, kertas tekstil, detergen, pakan ternak maupun pertanian. Isolasi bakteri penghasil selulase dari berbagai sumber antara lain lambung sapi (Bai, dkk., 2012), kompos pertanian (Baharuddin, dkk., 2016). Selulolitik sendiri berarti proses pemecahan selulosa menjadi senyawa yang lebih kecil (Anand, dkk., 2009). Terdapat beberapa

bakteri yang dapat menghasilkan enzim selulase yaitu: spesies jamur-*Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Aspergillus*; spesies bakteri-*Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Actinomycetes-Streptomyces*, *Actinomucor*, dan *Strepyomuces*. (Sukumaran, 2009). Beberapa mikroorganisme tersebut dapat menghidrolisis selulosa karena menghasilkan enzim selulase dengan spesifikasi kerja yang berbeda, sehingga enzim tersebut dapat menghidrolisis ikatan β -1,4-D-glukosa yang terdapat pada selulosa (Saralate, 2012). Menurut (Jannah, dkk., 2018) bekatul berpotensi sebagai penghasil bakteri selulolitik dan ditemukan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus*.

Ekstrak kasar enzim selulase dari isolat bakteri selulolitik *indigenous* bekatul yang diduga berpotensi untuk menghidrolisis limbah pertanian karena memiliki aktivitas CMC-ase yang tinggi yang menghasilkan bakteri *Bacillus subtilis* dengan aktivitas enzim sebesar 2,16 U/mL, pada suhu pertumbuhan 45°C (Jannah, dkk., 2018). Selulosa merupakan polimer linier dari D-glukosa yang terikat pada ikatan 1,4 glikosidik dan sangat erat dengan hemiselulosa dan lignin. Karakteristik dari enzim selulase dipengaruhi oleh suhu, pH, lingkungan tempat enzim bekerja, konsentrasi substrat tertentu, dan waktu inkubasi. Sebagian enzim bekerja secara optimum pada suhu 20-50°C (Saropah, 2012). Enzim selulase dapat bekerja dalam pH optimum antara 6 dan 7 (Prima and Devi, 2015).

Sholihati and Baharuddin (2018) melakukan penelitian uji aktivitas selulase menggunakan substrat CMC dengan variasi pH 5-8 didapatkan pH optimum 6 dengan aktivitas enzim selulase sebesar $4,3661 \times 10^{-3}$ U/mL. Penurunan pH dari kondisi optimum dapat terjadi waktu masa inkubasi karena terjadi perubahan lingkungan enzim dari pH normal menjadi pH basa (Megahati, 2001). Aryani

(2012) pada uji aktivitas selulase menggunakan substrat jerami padi dan tongkol jangung dengan bakteri berasal dari kapang *Mucor sp.* dengan variasi pH diamati pada kisaran pH 3-8 didapatkan pH optimum pada pH 5 dengan aktivitas enzim sebesar 0,0935 U/mL. Dilakukan uji aktivitas selulase dengan substrat CMC menggunakan variasi pH dilakukan pada rentang pH 4-10 didapatkan aktivitas selulase optimum pada pH 7 dengan nilai sebesar 0,054 U/mL (Putri, 2016). Hamzah (2018) melakukan penelitian uji aktivitas selulase dengan menggunakan substrat serbuk gergaji kayu dengan variasi pH antara 5,2 - 6,2 menghasilkan pH optimum 5,8 dengan aktivitas enzim selulase sebesar 0,0436 U/mL. Enzim selulase yang didapat dari padang pasir daerah Bromo-Tengger, dilakukan uji aktivitas selulase dengan menggunakan substrat dedak gandum, dedak padi, kertas putih, dan serbuk gergaji dengan menginkubasi pada pH 4-9 pada suhu optimal 85°C dan memiliki aktivitas tertinggi pada pH 8 yakni sebesar 0,034 U/mL, sedangkan pada pH di atas 8 mengalami penurunan aktivitas (Sonia, 2015). Hal ini dikarenakan apabila pH berada di atas atau dibawah pH optimumnya, dapat menyebabkan perubahan bentuk enzim. Sehingga perubahan pH tersebut dapat menyebabkan terganggunya pengikatan enzim dengan substrat yang dapat mengakibatkan denaturasi enzim dan menurunkan aktivitas enzim (Prima and Devi, 2015).

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik pada substrat jerami padi, dedak padi dan bekatul dengan faktor yang mempengaruhi pH. Pengujian dilakukan secara bertahap dengan regenerasi bakteri *Bacillus subtilis*, yang selanjutnya dilakukan pembuatan inokulum dari kultur, sehingga didapatkan produk kasar enzim selulase yang kemudian dilakukan optimalisasi pH dari produksi enzim selulase. Hasil akhir

didapatkan produk glukosa yang difermentasi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bioetanol, biomassa (Goodman, 2020), dan dapat pula meningkatkan nilai gizi pada pakan ternak hewan (Zhang, 2020). Hasil dari glukosa dapat pula dimanfaatkan menjadi sirup glukosa yang merupakan salah satu pemanis dengan bentuk cair tidak berwarna dan tidak berbau, sirup ini mengandung D-Glukosa yang dibuat melalui proses hidrolisis pati (enzimatis dan hidrolisis asam) (Richana, 2009). Glukosa yang dilakukan proses hidrolisis yang kemudian diisomerisasi oleh glukosa isomerase untuk menghasilkan HFS (*High Fructose Syrup*) yang digunakan sebagai pemanis buatan dalam makanan kaleng, produk susu, dan minuman berkarbonasi (Asmarani, 2019).

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh jenis substrat pada produksi enzim selulase oleh bakteri selulolitik asal bekatul, serta pengujian aktivitas dengan variasi pH?

1.3 Tujuan

Untuk mengetahui pengaruh jenis substrat pada produksi enzim selulase oleh bakteri selulolitik asal bekatul, serta pengujian aktivitas dengan variasi pH.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah yang digunakan dalam penelitian ini:

- a. Jenis substrat yang digunakan adalah bekatul, dedak padi, jerami padi yang berasal dari daerah Kabupaten Malang.
- b. Variasi pH 6;6,5;7;7,5; dan 8 dengan suhu 50°C.

- c. Bakteri *Bacillus Subtilis* didapat dari Laboratorium Biokimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- d. Uji aktivitas selulase dengan menggunakan metode DNS.

1.5 Manfaat Penelitian

Mengetahui pada pH berapa dan jenis substrat yang bagaimana untuk dapat mengetahui aktivitas selulosa dengan menggunakan bakteri selulolitik, sehingga dapat menghasilkan glukosa yang dapat difermentasi kembali menjadi bioetanol, biomassa ataupun dapat pula digunakan untuk meningkatkan nilai gizi dan menurunkan emisi pada ruminansia.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Limbah Pertanian

2.1.1 Jerami

Indonesia merupakan salah satu negara agraris yang sebagian besar mata pencaharian masyarakat sebagai petani. Jerami padi merupakan salah satu limbah pertanian yang memiliki manfaat yang dapat digunakan sebagai pakan ternak, selain itu pada jerami memiliki kadar lignoselulosa dengan jumlah yang besar. Lignoselulosa merupakan komponen utama dinding sel tumbuhan yang terdiri dari 3 polimer struktural yaitu: lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Tabel dibawah merupakan kandungan yang terdapat pada jerami padi.

Tabel 2.1 Kandungan serat kasar pada jerami padi

Hemiselulosa	Selulosa	Lignin	Sumber
21,71%	37,71%	16,22%	Pratiwi, 2016
27-30%	42-45%	20-28%	Soerawidjaja, 2005
27,5%	39,1%	12,5%	Karimi, 2006
18-25%	35-45%	10-25%	Razie, 2011
24%	32,1%	18%	Anindyawati, 2010

Pemanfaatan limbah lignoselulosa telah terbukti efisien untuk menghasilkan zat yang digunakan sebagai energi listrik dan panas serta menghasilkan biofuel (Amadi, 2016). Perlu dilakukan proses pre-treatment pada bahan lignoselulosa seperti pada jerami. Tujuannya untuk mempermudah proses hidrolisis dengan membuka struktur lignoselulosa agar selulosa mudah untuk didegradasi oleh enzim sehingga dapat memecah polisakarida menjadi bentuk monomer (Dashtban, 2009).



Gambar 2.1 Jerami Padi

Tabel 2.2 Metode *pre-treatment* untuk bahan lignoselulosa (jerami)

Metode	Contoh
Mekanik panas	Digerus, digiling, digunting, <i>extunder</i>
Autohydrolysis	Tekanan uap, letusan uap, <i>suover critical carbon dioxide explotion</i>
Perlakuan asam	H ₂ SO ₄ dan HCl encer, H ₂ SO ₄ dan HCl pekat
Perlakuan alkali	Sodium hidroksida, amonia, alkali hidrogen peroksida
Perlakuan larutan organik	Metanol, etanol, butanol, phenol

Sumber: Saha, 2003

2.1.2 Dedak

Dedak padi merupakan produk samping yang diperoleh selama penggilingan gabah yang mengandung 12%-15% protein (Zhang, 2012) terdiri atas lapisan luar butiran padi dengan sejumlah lembaga biji (Nasir, dkk., 2009). Banyak diketahui dedak merupakan salah satu limbah dari sektor pertanian yang dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang misal pakan ternak, bioetanol dan manfaat yang lainnya. Dedak padi memiliki kandungan hemiselulosa 8,7%-11,4%, selulosa 9%-12,8% (Astawan, 2009), protein 11,3-14,4%, lemak 15,0- 19,7%, serat kasar 7,0-11,4%, karbohidrat 34,1-52,3% dan abu 6,6-9,9% (Lubis, 2002).



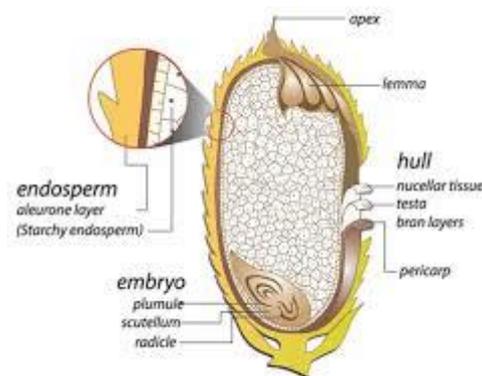
Gambar 2.2 Dedak Padi

Dedak padi mengandung serat kasar yang tinggi. Fermentasi dilakukan untuk menurunkan kadar serat kasar. Dedak padi yang difermentasi akan mempunyai nilai nutrisi yang lebih baik. Mikroorganisme yang ditambahkan pada saat fermentasi dapat memecah komponen yang lebih kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga lebih mudah dicerna. Fermentasi yang dilakukan akan merombak struktur jaringan dinding sel, memutus ikatan lignoselulosa dan menurunkan kadar lignin (Rasyaf, 2002).

2.1.3 Bekatul

Bekatul yang merupakan residu dari produksi beras putih. Bekatul adalah salah satu produk sampingan pertanian yang melimpah di Indonesia dan Malaysia. Jumlah tahunan dedak padi yang dihasilkan adalah diperkirakan 180.000 metrik ton per tahun. Bekatul (*rice bran*) salah satu hasil samping proses penyosohan padi yang berasal dari lapisan kulit paling luar dari beras yaitu antara butir beras dan kulit padi. Warna bekatul bervariasi dari coklat muda hingga coklat tua. Bekatul yang dihasilkan padi dapat mencapai 8-12% jumlah total padi. Hasil samping lainnya adalah 15-20% sekam yang merupakan kulit terluar sedangkan 3% yaitu

menir (BB Pascapanen, 2007). Menurut Suhardiman (2010) banyak kandungan yang dimiliki oleh bekatul antara lain protein 14,9%, selulosa 32,8%, hemiselulosa 42,8%, lignin 24,4%, air 3,6%, dan lemak 12,5%. Bekatul memiliki manfaatnya, seperti mengurangi kejadian aterosklerosis penyakit, menurunkan kolesterol darah dan mencegah kanker, ginjal batu dan penyakit jantung (Jariwalla, 2001).



Gambar 2.3 Lapisan dalam Bekatul Padi

Senyawa bioaktif yang berkontribusi terhadap bekatul menjanjikan manfaat terkait kesehatan terdiri dari asam fenolik, flavonoid, gamma oryzanol, tokoferol, tokotrienol, β -sitosterol dan asam fitat (Widarta, 2013). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa fermentasi dapat meningkatkan senyawa bioaktif dalam bekatul, seperti bekatul difermentasi dengan *Rhizopus oryzae*, yang menunjukkan peningkatan asam fenolik dan aktivitas antioksidan (Oliveira dkk., 2012).

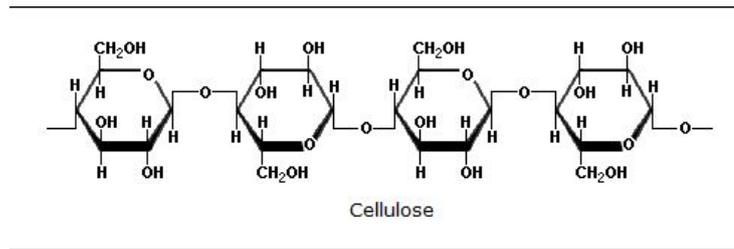
2.2 Selulosa

Selulosa merupakan biopolimer yang berbentuk rantai linier yang dapat diperoleh dari hasil pertanian (Pratiwi, 2018) dan dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glukosidase dengan struktur kristal yang distabilkan oleh ikatan hidrogen antarmolekul dan intramolekuler (Nakazawa, dkk., 2008). Struktur yang linier

menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis. Di alam, selulosa bergabung dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan (Moiser, 2005). Menurut Fitriasaki (2019) terdapat 3 tipe selulosa, yaitu:

- a. α -selulosa, yaitu selulosa berantai panjang yang tidak larut dalam larutan basa kuat dengan DP (Derajat Polimerisasi) lebih dari 200. Dalam bidang industry, α -selulosa digunakan sebagai penduga dan atau penentu tingkat kemurnian selulosa.
- b. β -selulosa, yaitu selulosa berantai pendek, larut dalam basa kuat dengan DP 10-200 dan dapat mengendap bila netral.
- c. γ -selulosa, yaitu selulosa yang larut dalam larutan netral dengan DP kurang dari 10. Dalam bidang industri β dan γ selulosa bisa disebut hemiselulosa.

Selulosa tidak ada secara murni di alam, tetapi selalu berikatan dengan lignin, hemiselulosa, dan xilan. Kebanyakan selulosa yang bergabung dengan lignin disebut lignoselulosa. Pada tumbuhan selulosa tersusun dalam bentuk fibril yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik sehingga sulit untuk diuraikan (Fitriani, 2003). Limbah pertanian termasuk dalam tipe α -selulosa karena memiliki derajat polimerisasi 305-15.300 (Widjaja, 2009). Proses penguraian selulosa dapat dibantu dengan beberapa mikroorganisme yang terdapat di alam seperti bakteri dan jamur (Sukumaran dkk., 2005).



Gambar 2.4 Struktur Selulosa

2.3 Degradasi Selulosa

Degradasi merupakan suatu reaksi perubahan kimia atau penguraian senyawa atau molekul menjadi lebih sederhana. Seperti, penguraian polisakarida selulosa menjadi monosakarida (glukosa). Degradasi polimer pada dasarnya berkaitan dengan terjadinya perubahan sifat karena ikatan rantai utama makromolekul. Pada polimer linear, reaksi tersebut mengurangi massa molekul atau panjang rantainya (Yatim, 2007). Faktor-faktor yang mempengaruhi degradasi antara lain: substrat, sumber nitrogen, pH, suhu, kelembaban (Gandjar, 2006).

Nur, dkk., (2009) mengatakan Bakteri Selulolitik Degradasi (BSD) adalah bakteri yang mempunyai kemampuan untuk mendegradasi serat-serat kasar yang mengandung karbohidrat menjadi sumber karbon dan energi. Pemanfaatan bakteri selulolitik yaitu sebagai penghasil enzim selulase yang digunakan untuk menghidrolisis selulosa. Selulosa merupakan karbohidrat utama yang disintesis oleh tanaman dan menempati hampir 60% komponen penyusun struktur tanaman.

Proses degradasi selulosa menjadi glukosa oleh enzim selulase, terdapat tiga jenis enzim yang bekerja, yaitu (Sakti, 2012):

1. Enzim endoglukonase yang menghidrolisis ikatan glikosidik β -1,4 secara acak dan bekerja terutama pada daerah amorf dari serat selulosa yang menghasilkan oligosakarida dan polimer yang panjangnya tereduksi, seperti pada *Carboxy*

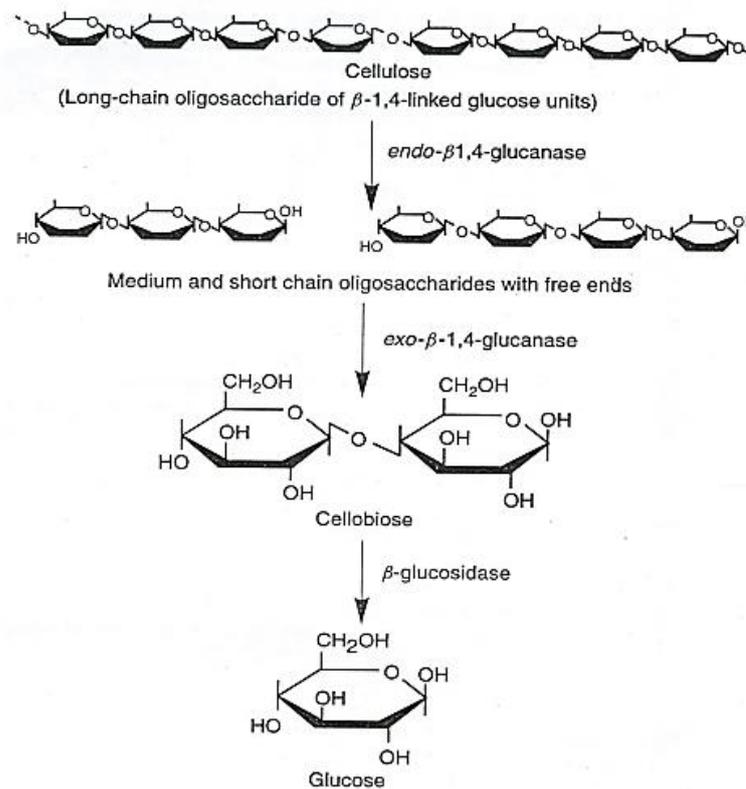
Methyl Cellulose (CMC). Endoglukanase mempunyai afinitas yang tinggi terhadap substrat CMC (CMC-ase).

2. Enzim exoglukanase atau selibiohidrolase menyerang atau memotong residu selubiosil dari rantai selulosa yang ujung rantai selulosanya tidak tereduksi dan menghasilkan selobiosa.
3. Enzim endo β -glukosidase menghidrolisis selobiosa untuk menghasilkan dua unit glukosa.

Degradasi material lignoselulosa dengan tingkat selulosa yang tinggi sehingga bisa dikatakan selulosa tersebut murni (dihasilkan oleh tanaman kapuk), dengan kadar lignin yang sangat sedikit proses degradasi tidak dapat dilakukan dengan memasukkan selulosa ke dalam sel mikroorganisme. Hal ini terjadi karena ukuran selulosa yang cukup besar. Sehingga strategi yang dilakukan oleh mikroorganisme adalah dengan mensekresikan enzim selulase. Hal ini dapat dilihat ketika melakukan isolasi protein yang terdapat pada tanah dan proses pengomposan, enzim selulase adalah komponen utama dari protein yang ditemukan (Ahmed dkk., 2001). Proses degradasi selulosa dengan bantuan enzim selulase dapat dilihat pada gambar 2.5.

Pada degradasi selulosa murni memiliki laju degradasi dan terjadi penurunan yang sangat besar. Penurunan dapat disebabkan karena adanya inhibitor yang sangat banyak jika dibandingkan pada degradasi lignoselulosa. Selobiosa merupakan inhibitor utama dalam degradasi selulosa, oleh karena itu dengan adanya enzim β glukosidase menjadi sangat penting dalam proses degradasi selulosa. Selobiosa diubah menjadi glukosa menyebabkan laju degradasi menjadi jauh lebih cepat. Akhir degradasi lignoselulosa tergantung kepada tipe bahan

mentah yang digunakan. Secara umum dapat dikatakan bahwa faktor pembatas degradasi selulosa dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu struktur dari substrat, dan mekanisme serta interaksi enzim selulase (Hatami dkk., 2008).



Gambar 2.5 Proses Degradasi Selulosa dengan Bantuan Enzim Selulase (Moat, et, al., 2004 dalam Qazi, 2011)

Selulase merupakan enzim hidrolase yang mengkatalis reaksi hidrolisis selulosa. Produksi enzim selulase oleh mikroba membutuhkan substrat yang dapat mempengaruhi produksi enzim oleh mikroba. Pemutusan ikatan glikosidik dimulai dengan menyerang pasangan electron bebas atom O ion karboksilat dari rantai residu asam aspartat terhadap C₁ selulosa, penyerangan ini akan semakin mudah dengan adanya ion H⁺ yang mampu menarik pasangan elektron yang digunakan untuk membentuk ikatan glikosidik, sehingga membentuk intermediet. Setelah

terjadi peutusan iktan glikosidik dan sisi aktif terikat pada atom C₁ selulosa adanya H₂O terjadi proses hidrolisis (Ariani, 2007 dalam Hastutik, 2011).

Enzim selulase berperan penting di alam dalam proses biohidrolisis. Selulase digunakan dalam ekstraksi komponen penting tanaman dan untuk meningkatkan nilai nutrisi pada pakan ternak (Palonen, 2004). Saadoun, dkk (2013) menyampaikan enzim selulase menempati 20% perdagangan enzim di dunia. Shaikh, dkk (2013) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa enzim selulase merupakan salah satu kompleks enzim yang dalam sistem sinergis dan secara bertahap dapat mengubah selulosa menjadi sumber energi dan glukosa yang tersedia sehingga berperan penting dalam pemanfaatan biomassa. Acharya, dkk (2012) berhasil mengisolasi bakteri *Bacillus subtilis* termofilik yang berpotensi mendegradasi limbah selulosa dengan memproduksi enzim selulase termotoleran. Hal ini dapat menjadi alternatif konversi lignoselulosa menjadi gula sederhana dan bahan bakar etanol.

2.4 Bakteri Selulolitik

Bakteri selulolitik merupakan salah satu bakteri yang dapat menghidrolisis kompleks selulosa menjadi menjadi glukosa. Glukosa tersebut digunakan sebagai sumber nutrisi dan karbon bagi pertumbuhan organisme. Bakteri selulolitik dapat mensintesis enzim sehingga menghidrolisis selulosa. Enzim tersebut adalah enzim selulase. Mikroba mensintesis enzim selulase selama tumbuh pada media selulosa (Ibrahim dan El-diwany, 2007).

Bakteri selulolitik mendegradasi senyawa selulosa dan akan menghasilkan air dan karbondioksida pada kondisi aerob, sedangkan pada kondisi anaerob akan

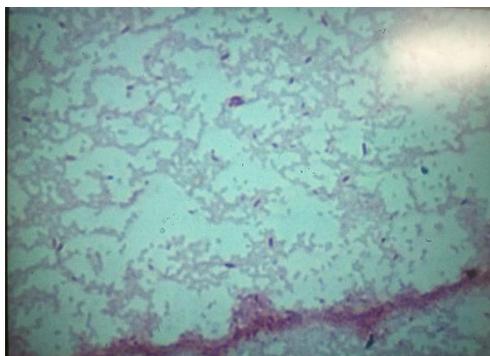
menghasilkan molekul hidrogen dan senyawa metana. Bakteri selulolitik anaerob hanya dapat tumbuh pada sumber selulosa dan produk selulolitiknya. Bakteri ini tidak dapat tumbuh pada oligosakarida, monosakarida dan polisakarida yang berasal dari gula lain selain glukosa (Lynd, dkk., 2002). Bakteri selulolitik aerob dapat menggunakan sumber karbon lain di samping glukosa. Menurut penelitian Jannah (2018) bekatul memiliki potensi sebagai penghasil bakteri selulolitik yang didasarkan pada metode identifikasi molekuler sehingga ditemukan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus*. Bakteri yang digunakan dalam produksi enzim selulase dapat dilihat pada tabel 2.3.

Tabel 2.3 Bakteri yang memproduksi enzim selulase

<i>Genus</i>	<i>Spesies</i>
<i>Acidothermus</i>	<i>A. Cellulolyticus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Clostridium</i>	<i>C. cetobutylicum</i>
	<i>C. thremocellum</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cellulosa</i>
<i>Rhodothermus</i>	<i>R. marinus</i>

Sumber: Sukumaran, 2005

2.5 Bakteri Selulolitik Asal Bekatul



Gambar 2.6 Bakteri *Bacillus subtilis* (Putra dan Kosim, 2010)

Kingdom : Bacteria
Divisi : Firmicutes
Class : Bacilli
Ordo : Bacillales
Familia : Bacillaceae
Genus : *Bacillus*
Spesies : *Bacillus subtilis*
(Putra dan Kosim, 2010)

Bacillus subtilis merupakan jenis bakteri *Bacillus sp.* Bakteri ini adalah bakteri gram positif, dengan katalase positif yang umum ditemukan di tanah, air, udara, dan materi tumbuhan yang terdekomposisi (debu). *Bacillus sp.* bersifat aerobik oleh karena itu dalam proses fermentasi harus diperhatikan dengan baik. Bakteri ini memiliki kemampuan membentuk endospora ketika dalam kondisi lingkungan yang tertekan. Spora ini dapat bertahan 60 tahun atau lebih pada kondisi lingkungan ekstrim (Sakti, 2012).

Menurut penelitian Jannah (2018) isolat bakteri *indigenous* bekatul yang didapat diidentifikasi berpotensi sebagai bakteri selulolitik dari hasil pengamatan terhadap koloni yang menunjukkan banyak kesamaan, yaitu bersifat gram positif, berbentuk batang, dan endosporik. Dari 22 isolat bakteri selulolitik yang diperoleh dari *indigenous* bekatul, menurut identifikasi molekuler pada isolate BE 8 memiliki kesamaan 99,9% kesamaan dengan *Bacillus subtilis* reagen 168, *Bacillus subtilis* J5 dengan kesamaan 100%, *Bacillus subtilis* ZJ2 dengan kesamaan 100%. Sedangkan pada isolat BE 14 memiliki kesamaan 94,9% dengan bakteri *Bacillus cereus* SE05, *Bacillus cereus* 14759, *Bacillus cereus* IIF4SW B1, *Bacillus cereus* LC19, *Bacillus cereus* saring MER 27, *Bacillus cereus* XH05 dan *Bacillus cereus* Y3. Isolat BE 8 memiliki aktivitas CMC-ase tertinggi sebesar 2,16 U/mL, sedangkan pada isolat BE 14 memiliki aktivitas sebesar 1,31 U/mL. Aktivitas β -glukosidase tertinggi

berdasarkan metode identifikasi molekuler terlihat bahwasanya isolat BE 8 merupakan *Bacillus subtilis* dan isolat BE 14 adalah *Bacillus Cereus*.

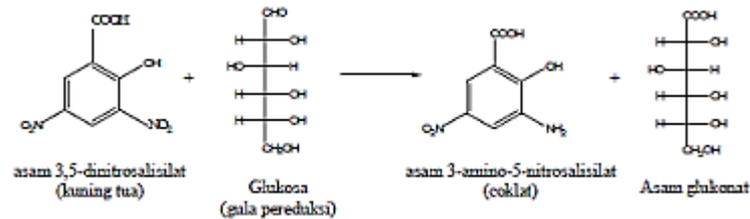
2.6 Uji Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode Asam 3,5-dinitrosalisilat

(DNS)

Metode DNS merupakan metode penentuan gula reduksi dengan menggunakan sampel yang mengandung karbohidrat dengan pereaksi asam dinitrosalisilat atau asam 3,5-dinitrosalisilat. Metode ini adalah metode kimiawi, dimana DNS adalah senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya dan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalicylic, senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang 540 nm. Semakin banyak komponen pereduksi yang terdapat dalam sampel semakin banyak pula molekul asam 3-amino-5-nitrosalicylic yang terbentuk sehingga mengakibatkan serapan semakin tinggi (Kusmiati dan Agustini N. W.S, 2010). Reaksi DNS dengan gula reduksi dapat dilihat pada gambar 2.7.

Reaksi gula reduksi dengan DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehyd gula yang teroksidasi menjadi gugus karboksil. DNS yang berperan sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalicylic. Prinsip dari metode ini yaitu reaksi ini berjalan dalam suasana basa, bila terdapat gula reduksi pada sampel maka larutan DNS membentuk senyawa asam 3-amino-5-nitrosalicylic yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan (Pratiwi, 2016). Semakin gelap warna DNS maka jumlah gula yang direduksi semakin banyak (Rosyada, 2015).

Adanya penambahan KNa-tartart yang berfungsi untuk menstabilkan senyawa sehingga kompleks warna tetap stabil.



Gambar 2.7 Reaksi DNS dengan gula pereduksi (Rahayu, 2013)

2.7 Integrasi Al-Quran tentang Pemanfaatan Limbah Pertanian

Ilmu pengetahuan modern diperoleh melalui kreativitas manusia dan Al-Quran yang diturunkan langsung oleh Allah swt yang tidak dapat dipertentangkan. Kebenaran Al-Quran bersifat mutlak sebagaimana firman Allah: *Kebenaran itu dari Tuhanmu, sebab itu jangan sekali-kali kamu termasuk orang yang ragu.* Sedangkan kebenaran pada ilmu pengetahuan bersifat akumulatif, dimana akhir pencarian ilmu pengetahuan akan berakhir pada suatu kebenaran akhir yang sesuai dengan kebenaran wahyu. Ilmu pengetahuan merupakan alat atau metode untuk membuktikan keaslian wahyu (Habibie, 1992).

Alam semesta diciptakan Allah swt dan lingkungan sebagai tempat manusia hidup dan menjalankan kehidupan manusia secara menyeluruh. Kita beriman bahwa alam semesta ini adalah ciptaan Allah swt, dan kita meyakini bahwa manusia sebagai ciptaan Allah swt di muka bumi ini dengan tugas utamanya adalah memakmurkan bumi, yang intinya meliputi (Shihab, 1999) :

- a. *Al-Intifa'* yang artinya mengambil manfaat dan mendayagunakan sebaik-baiknya

- b. *Al-I'tibar* yang artinya mengambil pelajaran, memikirkan, mensyukuri, seraya menggali rahasia-rahasia dibalik alam ciptaan Allah swt
- c. *Al-Islah* yang artinya memelihara dan menjaga kelestarian alam sesuai dengan maksud sang pencipta, untuk kemaslahatan dan kemakmuran manusia.

Adanya berbagai jenis makhluk hidup yang diciptakan Allah swt pada alam semesta ini, merupakan tanda kekuasaan Allah bagi orang yang mau berpikir. Karena setiap sesuatu yang diciptakan Allah pasti memiliki manfaat yang sangat berguna bagi kesejahteraan manusia. Maka seharusnya manusia untuk berikhtiar memikirkan penciptaan Allah SWT dengan melakukan peninjauan lanjut terhadap alam semesta sehingga diperoleh hal baru dalam mengkaji ilmu yang selaras dengan Al-Qur'an (Shihab, 1999). Allah berfirman dalam QS. Ali-Imron ayat 190-191, berbunyi:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ۚ 190 الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَفُجُوءًا عَلَيَّ جُنُودًا وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا ۖ سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ 191

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, 191. (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau maka peliharalah Kami dari siksa neraka”.*

Asy-Syuyuti dan Al-Mahalliy (1505) dalam Tafsir Jalalain menjelaskan bahwa Allah SWT telah menjadikan kebutuhan hidup bagi manusia berupa buah-buahan, biji-bijian, dan tumbuh-tumbuhan. Allah Swt menjadikan makhluk-makhluk misal berupa hamba-hamba sahaya, binatang-binatang dan berbagai macam ternak yang mana hanya Allah yang akan memberi rezeki kepada mereka. Sebagaimana

manusia di haruskan untuk menjaga keseimbangan alam dengan memanfaatkan limbah yang dihasilkan oleh tumbuhan sehingga Allah menciptakan tumbuhan tidak dengan sia-sia. Sehingga Allah Swt memberikan manfaat baik itu tumbuhan hewan, maupun limbah yang dihasilkan. Manusia diperintahkan untuk menuntut ilmu supaya dapat mempelajari segala hal yang telah diciptakan.

Dari penjelasan diatas kedua ayat dapat dipahami sebagai tanda kebesaran ciptaan Allah baik langit maupun bumi dan seisinya. Bagi orang yang berakal akan selalu mengingat dan memikirkan dalam keadaan duduk, berbaring, berdiri, dan sebagainya. Sehingga sebagai manusia kita dapat menyeimbangkan alam dengan cara memanfaatkan dengan sebaik-baiknya. Dalam tafsir Prof. Dr. Hamka menjelaskan bahwa Langit dan bumi dijadikan oleh sang Khaliq, sangat indah dengan tersusun tertib dan sesuai aturan. Silih bergantinya malam dengan siang, betapa besar pengaruhnya terhadap kehidupan segala yang bernyawa. Terkadang malamnya pendek, siangnya panjang atau sebaliknya. Terdapat musim panas, musim dingin, musim hujan, musim gugur, musim semi, bahkan musim salju selamanya seperti yang terjadi di kutub. Semua ini menjadi ayat, tanda bagi orang yang berpikir, bahwa tidaklah semuanya ini terjadi dengan sendirinya. Sempurnanya ciptaan-Nya tandanya menjadikan indah. Mulia belaka, tanda yang melindunginya mulia adanya. Orang yang melihatnya dan mempergunakan pikiran meninjaunya, masing-masing sesuai bakat pikirannya. Entah seorang ahli ilmu alam, ahli ilmu binatang, ahli ilmu tumbuh-tumbuhan, ahli pertambangan, ahli filosof, ataupun seorang penyair dan seniman sekalipun. Semuanya akan dipesona oleh keteraturan alam semesta yang luar biasa. Terasa kecil dihadapan keajaiban alam, terasa kecil alam dihadapan kebesaran penciptanya. Pada akhirnya tiada arti

diri, tiada arti alam, yang ada hanyalah Dia, yaitu yang sebenarnya Dia. Karena kita manusia (*al-hayawan an-nathiq*) kita berpikir Layaknya *ulul-albab* memiliki intisari, mempunyai pikiran. Mempunyai biji akal (potensi) yang bila ditanam dengan baik akan tumbuh.

Pada surat Ali-Imran ayat 190 terdapat kata “penciptaan langit dan bumi, silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda orang-orang berakal”. Serta pada ayat 191 terdapat kata “tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia”. Kalimat diatas dapat dikorelasikan dengan penelitian yang dilakukan. Point pertama penulis melakukan penelitian dengan menggunakan bahan dari limbah pertanian yaitu jermai padi, dedak padi, dan bekatul. Bahan tersebut merupakan bagian sisa tumbuhan yang dapat dimanfaatkan karena limbah pertanian tersebut mengandung selulosa yang tinggi.

Allah menciptakan mikroorganisme sebagai makhluk-Nya yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis atau memecah suatu ikatan selulosa dalam tumbuhan dengan bantuan dari enzim selulase. Keberadaan mikroorganisme ini juga bisa didapat dari limbah pertanian dan dari mikroorganisme tersebut didapatkan enzim selulase untuk membantu memecah sumber karbon berupa selulosa menjadi bentuk yang lebih sederhana yaitu glukosa dengan proses fermentasi lebih lanjut sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bioetanol, biomassa (Goodman, 2020), dan dapat pula meningkatkan nilai gizi pada pakan ternak hewan (Zhang, 2020).

Berdasarkan ayat diatas bahwasanya Allah SWT memerintahkan kepada manusia yang telah diberikan kelebihan akal untuk berpikir segala sesuatu yang ada di langit dan di bumi, karena tidak ada ciptaan Allah swt di dunia ini yang sia-sia, artinya Allah swt menciptakan segala sesuatu dengan memberikan kegunaan

didalamnya untuk kesejahteraan manusia di muka bumi. Dengan adanya rahasia-rahasia Allah melalui hasil penelitian, akan menambah keyakinan akan kebesaran dan kekuasaan Allah swt (Abdushshamad, 2003).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Juni 2021. Bertempat di Laboratorium Biokimia dan Biotek Program Studi Kimia 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 penelitian ini antara lain: autoklaf, *petridish*, Erlenmeyer 250 mL, *magnetic stirrer*, *hotplate*, jarum ose, bunsen, tabung reaksi, rak tabung, *incubator*, *shaker*, *sentrifuge*, *Laminar Air Flow* (LAF), plastic wrap, oven, pH indikator, blender, wadah. tabung reaksi, rak tabung reaksi, *vortex mixer*, pipet ukur, mikro pipet, bola hisap, neraca analitik, spatula, gelas arloji, penangas air, aluminium foil, dan spektrofotometer Uv-Vis.

3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini antara lain jerami padi, dedak padi, dan bekatul yang diperoleh di Kecamatan Tunggulwulung Malang. Media yang digunakan antara lain CMC agar, CMC borth, NA (*Nutrient Agar*), isolat bakteri selulolitik dari bekatul yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, NaOH 4%, aquades steril dengan variasi pH bahan yang diperlukan antara lain: Reagen DNS, KNa-Tartrat, aquades, buffer fosfat.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial dengan dua variasi yakni dengan variasi pH yaitu ($P_1=6$; $P_2=6,5$; $P_3=7$; $P_4=7,5$; dan $P_5=8$). Sedangkan variasi yang kedua adalah jenis substrat yaitu (J=jerami, B=bekatul, dan D=dedak). Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Kombinasi perlakuan variasi pH dan jenis substrat dapat dinyatakan pada Tabel 3.1

Tabel 2.1 Kombinasi perlakuan variasi pH dan jenis substrat

Variasi pH	Jenis Substrat		
	J	B	D
$P_1=6$	P_1J	P_1B	P_1D
$P_2=6,5$	P_2J	P_2B	P_2D
$P_3=7$	P_3J	P_3B	P_3D
$P_4=7,5$	P_4J	P_4B	P_4D
$P_5=8$	P_5J	P_5B	P_5D

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu:

1. Preparasi sampel (jerami padi, dedak padi, dan bekatul)
2. Regenerasi bakteri selulolitik
3. Pembuatan inokulum bakteri
4. Uji aktivitas selulase dengan menggunakan variasi pH 6;6,5;7;7,5; dan 8 pada suhu 50°C dengan konsentrasi substrat masing-masing 1%
5. Analisis data dengan menggunakan SPSS

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas bungkus lalu dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.5.2 Preparasi Jerami Padi (Budi, 2018)

Jerami direndam dalam larutan NaOH 4% pada pH 10-11 dengan perbandingan jerami dan larutan NaOH 4% sebesar 1:10 (w/v). Jerami dicuci berkali-kali dengan aquades hingga pH netral. Kondisi pH netral dinyatakan bila air cucian jerami sama dengan pH aquades, jerami hasil delignifikasi dikeringkan menggunakan oven hingga kering selama 24 jam pada suhu 50°C. Tahap selanjutnya jerami dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan saringan ukuran 100 mesh hingga mendapatkan serbuk atau bubuk jerami.

3.5.3 Pembuatan Media

3.5.3.1 Pembuatan Media CMC Agar (Saropah, 2012)

Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri selulolitik adalah media CMC *agar* yang terdiri dari 1 g CMC; 0,04 g MgSO₄.7H₂O; 0,15 g KNO₃; 0,1 g K₂HPO₄; 0,004 g CaCl₂.2H₂O; 0,4 g *yeast extract* dan 3,4 g agar. Semua bahan dimasukan dalam beaker glass 250 ml dan dicampur dengan aquades sebanyak 100 ml, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditutup kapas, kemudian disterilisasi dalam autoklaf menggunakan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.5.3.2 Pembuatan Media CMC Cair (Saropah, 2012)

Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri selulolitik adalah media CMC *agar* yang terdiri dari 1 g CMC; 0,04 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,15 g KNO_3 ; 0,1 g K_2HPO_4 ; 0,004 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,4 g *yeast extract*. Semua bahan dimasukkan dalam beaker glass 250 ml dan dicampur dengan aquades sebanyak 100 ml, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditutup kapas, kemudian disterilisasi dalam autoklaf menggunakan suhu $121^\circ C$ dan tekanan 1 atm selama 15 menit

3.5.4 Regenerasi Bakteri Selulolitik (Murtiyaningsih, 2017)

Peremajaan isolat bakteri dilakukan pada media agar CMC 1% (b/v). Diambil 1 ose bakteri dari stok. Media yang digunakan merupakan media agar miring. Isolat bakteri disimpan dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 24 jam.

3.5.5 Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum yaitu dengan mengambil masing-masing 1 ose bakteri selulolitik dari hasil regenerasi kemudian diinokulasikan pada 50 mL media CMC cair 1% hasil preparasi, lalu diinkubasi bergoyang selama 18 jam dengan kecepatan 200 rpm.

3.5.6 Produksi Ektak Kasar Enzim Selulase dari Berbagai Substrat

Hasil inokulum ditambahkan masing-masing substrat (jerami padi, dedak padi, dan bekatul) sebanyak 1% (b/v) atau 0,5 g pada Erlenmeyer 100 mL. ditambahkan 5 mL inokulum dan dimasukkan ke dalam 100 mL media CMC cair, kemudian shaker kembali dengan kecepatan 200 rpm selama 18 jam dalam suhu ruang.

Kemudian diambil kultur sebanyak 45 mL ke dalam *falcon* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim selulase.

3.5.7 Uji Aktivitas Enzim Selulase

3.5.7.1 Pembuatan Reagen DNS (Saqib, 2011)

Menimbang 1 g DNS (*3,5-dinitrosalisilic acid*), 0,2 g fenol, 0,05 g Na-Sulfit dan 1 g NaOH kemudian ditambahkan aquades 100 mL dipanaskan perlahan untuk melarutkan reagen. Larutan disimpan dalam botol berwarna gelap.

3.5.7.2 Pembuatan Reagen KNa-Tartrat 40%

Sebanyak 40 g KNa-Tartrat dilarutkan dalam 100 mL akuades di Erlenmeyer. Kemudian diaduk dengan *stirrer*. Setelah larut, larutan disimpan dalam botol berwarna gelap.

3.5.7.3 Pembuatan Kurva Standar Glukosa (Murtiyaningsih, 2017)

Untuk membuat kurva standar terlebih dahulu dibuat larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm. Setelah itu diambil 1 ml dari masing-masing konsentrasi dan masukkan ke dalam tabung rekasi. Kemudian ditambahkan 2 ml reagen DNS dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Ditutup mulut tabung dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit sampai larutan berubah warna menjadi merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 ml larutan KNa-Tartrat 40%. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 ml dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 540 nm.

3.5.7.4 Uji Aktivitas Enzim Selulase (Maftukhah, 2018)

Pada penentuan aktivitas optimum dilakukan dengan cara menyediakan tabung reaksi, masing-masing diisi 1 mL media CMC 1%, kemudian ditambahkan 1 ml buffer fosfat pH 6;6,5;7;7,5 dan 8. Pada masing-masing tabung ditambah 1 ml ekstrak kasar enzim selulase. Kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Kemudian ditambahkan 2 ml reagen DNS dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Ditutup mulut tabung dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit sampai larutan berubah warna menjadi merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 ml larutan KNa-Tartrat 40%. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 ml lalu dihomogenkan. Selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 540 nm.

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa (ppm)} \times (\text{Volume enzim} - \text{substrat})(\text{ml})}{\text{Berat molekul glukosa} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times \text{Volume enzim (ml)} \times \text{waktu inkubasi (menit)}}$$

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) yaitu dengan analisis ragam (uji F). Apabila terdapat perbedaan nyata dilanjut dengan uji Jarak Berganda Duncan (*Duncan's New Multiple Range Test*) atau DNMRT dengan taraf nyata $\alpha = 0,05$ atau tingkat kepercayaan 95%. Serta dilakukan analisis data dengan integrasi sains dan islam yang mengacu pada Al-qur'an atau hadist.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini digunakan bakteri selulolitik yang dihasilkan dari bekatul. Bakteri tersebut merupakan salah satu dari golongan *Bacillus sp.* yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim selulase yang dapat membantu dalam proses degradasi selulosa. Dilakukan pengujian aktivitas enzim selulase dengan menggunakan variasi pH dan variasi substrat. Jerami padi, dedak dan bekatul merupakan substrat yang berasal dari limbah pertanian. Limbah pertanian tersebut didapat dari ladang pertanian di daerah Tunggulwulung Malang. Sebelum dilakukan uji aktivitas enzim selulase pertama dilakukan proses *pre-treatment* untuk delignifikasi pada jerami padi dengan menggunakan larutan NaOH 4%. Penelitian ini dilakukan pengujian secara kuantitatif dengan menggunakan metode *3,5-dinitrosalicylic acid* (DNS) pada uji aktivitas enzim selulase.

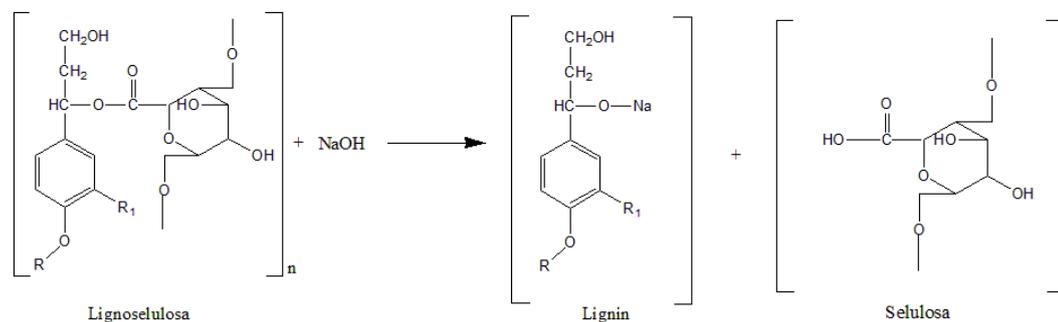
4.1 Pengaruh Delignifikasi terhadap Aktivitas Enzim

Delignifikasi merupakan langkah pertama yang diperlukan untuk memecah lignoselulosa menjadi komponen utama, yaitu: lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Menurut Saha (2003) Ada beberapa metode yang digunakan untuk *pretreatment* lignoselulosa: mekanik panas, autohydrolysis, perlakuan asam, perlakuan alkali, dan perlakuan larutan organik. Pada penelitian menggunakan perlakuan alkali yang dilakukan dengan perendaman pada jerami menggunakan larutan NaOH 4%. Delignifikasi berfungsi untuk memisahkan komponen lignin yang menyelubungi selulosa yang terkandung dalam jerami (Budi, 2018).



Gambar 4.1 Proses Delignifikasi pada Jerami Padi

Setelah dilakukan delignifikasi warna jerami menjadi lebih kuning dan beratnya menjadi lebih ringan. Pemilihan pretreatment menggunakan larutan basa menurut Hamisan (2009) karena larutan NaOH dapat menghilangkan fraksi lignin lebih banyak dari biomassa karena kelarutan lignin dalam larutan alkali. Adanya safonifikasi ikatan ester dari residu lignin atau hemiselulosa sehingga mengakibatkan selulosa menjadi lebih mudah untuk berinteraksi dengan enzim, sehingga menurunkan derajat polimerisasi dan kristalinitas dari struktur selulosa (Sun, 2002). Reaksi delignifikasi dengan NaOH dapat dilihat pada gambar dibawah ini,



Gambar 4.2 Reaksi delignifikasi dengan NaOH

4.2 Peremajaan Bakteri Selulolitik

Pertumbuhan suatu mikroorganisme membutuhkan media pertumbuhan. Media yang digunakan mengandung semua zat yang diperlukan untuk proses pertumbuhan mikroorganisme tersebut, antara lain, senyawa organik (karbohidrat, lemak, protein), vitamin dan mineral. Media yang digunakan pada penelitian ini adalah NA (*Nutrien Agar*), CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) Agar dan CMC cair. Peremajaan bakteri *Bacillus* dilakukan dengan menggunakan isolat yang ditumbuhkan dalam media selektif CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) agar miring selama 24 jam dalam *incubator*. Peremajaan bakteri selulolitik bertujuan untuk meregenerasi sel bakteri, menjaga ketersediaan nutrisi dan untuk menghindari adanya perubahan karakteristik dari selulolitik yang ditanam. Peremajaan dilakukan secara aseptis untuk menghindarkan dari kontaminasi yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Cara melakukan aseptis dengan mijarkan jarum ose diatas api sebelum dan sesudah memindahkan bakteri dan melewati mulut tabung diatas api sebelum dan sesudah pengambilan bakteri dan segera mungkin menutup mulut tabung. Gambar dibawah merupakan hasil regenerasi bakteri selulolitik.



Gambar 4.3 Hasil Regenerasi Bakteri Selulolitik

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kondisi optimum pada kerja enzim selulase yang telah diproduksi oleh bakteri *Bacillus*. Karakteristik yang diuji merupakan kondisi optimum dari kerja enzim selulase yaitu meliputi pH dan jenis substrat. Penelitian ini meliputi beberapa tahapan pembuatan kurva standart glukosa produksi ekstrak kasar enzim selulase, karakterisasi enzim selulase menggunakan metode analisis DNS.

4.3 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase pada Berbagai Jenis Media

Pertumbuhan

Media merupakan suatu bahan pertumbuhan yang terdiri atas nutrisi yang dipakai untuk pertumbuhan mikroba. Medium sebagai tempat tumbuh dan berkembang harus menjamin ketersediaan dan kebutuhan nutrisi dan oksigen yang dibutuhkan oleh mikroba untuk hidup. Medium kebanyakan berasal dari tumbuhan dan sedikit dari hewani, antara lain: biji-bijian, susu, atau ada yang berasal dari *Natural raw material* hasil limbah pertanian dan hutan sebagai contoh: karbohidrat, gula, pati (tepung), selulosa, hemiselulosa, dan lignin.

Substart limbah pertanian dipilih yaitu jerami, dedak, bekatul digunakan sebagai media pertumbuhan karena memiliki kebutuhan nutrisi yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Selain itu substrat yang digunakan memiliki kandungan selulosa yang tinggi dan mudah untuk didapatkan. Substrat atau medium yang berperan sebagai nutrisi dan sumber karbon untuk menunjang pertumbuhan merupakan salah satu faktor dalam mencukupi produktivitas enzim. Jika dalam substrat tersebut kelebihan sumber karbon akan memperlambat pertumbuhan sel bakteri sehingga menurunkan jumlah oksigen dalam substrat tersebut, dengan demikian akan terjadi penurunan produksi selulase (Susanti, 2011). Enzim selulase

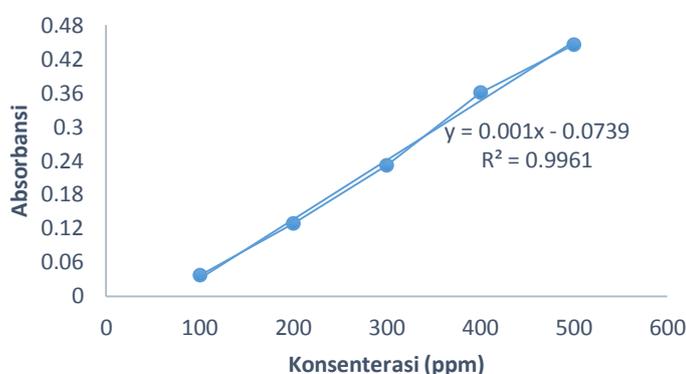
merupakan salah satu enzim ekstraseluler yang disekresikan pada bakteri selulolitik dan media produksi. Media produksi yang digunakan ditambahkan dengan substrat terpilih. Untuk mendapatkan enzim selulase dilakukan proses sentrifugasi. Supernatan yang didapat digunakan untuk pengujian aktivitas enzim selulase dengan menggunakan metode DNS (Aryani, 2012).

4.4 Kurva Standart Glukosa Menggunakan Metode DNS

Analisis glukosa dengan menggunakan ekstrak kasar enzim selulase dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan metode DNS. Pengujian ini digunakan untuk menentukan kadar gula reduksi yang dihasilkan dari aktivitas enzim. Kadar gula reduksi ditentukan dengan membuat kurva standart glukosa yang berfungsi untuk mengetahui konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya. Larutan glukosa dipilih sebagai kurva standart dikarenakan termasuk salah satu gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa oleh enzim selulase.

Kurva standart dibuat dengan menentukan terlebih dahulu gelombang maksimumnya. Dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum untuk mengetahui daerah serapan dan menghasilkan nilai absorbansi dari larutan baku glukosa ditera dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada 540 nm (Sukmawati, 2018). Panjang gelombang (λ) maksimum pada penelitian ini adalah 540 nm. Kurva standart glukosa yang digunakan dengan variasi konsentrasi glukosa 100; 200; 300; 400; 500 (ppm). Hasil kurva standart glukosa yang diperoleh memiliki persamaan linier $y = 0,001 x - 0,0739$ dengan nilai kolerasi (R^2) 0,9961. Nilai absorbansi sampel dapat disubstitusikan kedalam persamaan linier dan diplotkan terhadap kurva standart glukosa, sehingga dapat mengetahui konsentrasi glukosa pada sampel.

Reaksi gula reduksi dengan DNS merupakan reaksi redoks pada gugus aldehid gula yang teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino dan 5- nitrosalisilat. Reaksi ini berlangsung dalam suasana basa pada suhu tinggi. Apabila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan berubah menjadi warna jingga kemerahan. Semakin gelap warna DNS maka semakin banyak kandungan gula yang tereduksi.



Gambar 4.4 Grafik Kurva Standart Glukosa

4.5 Pengaruh Jenis Substrat terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Pengujian aktivitas enzim selulase pada variasi substrat digunakan pada saat bakteri mampu memproduksi enzim selulase secara maksimal yaitu berada pada fase eksponensial menuju stasioner. Substrat digunakan sebagai media karena memiliki kandungan karbohidrat yang terdiri dari pati (tepung), selulosa, hemiselulosa, dan lignin (Nurchayyo, dkk., 2011). Komposisi yang terdapat pada substrat dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme serta produksi enzim karena memiliki sumber energi dalam proses pembentukan sel mikroorganisme. Substrat memiliki pengaruh terhadap aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri.

Aktivitas enzim selulase diuji pada berbagai substrat (jerami padi, dedak, dan bekatul). Substrat bekatul memiliki aktivitas enzim yang lebih tinggi, yang dapat diartikan proses degradasi selulosa oleh enzim selulase menghasilkan gula reduksi yang lebih banyak dibandingkan dengan substrat jerami padi yang memiliki aktivitas selulase kecil ini dapat disebabkan oleh adanya proses pemecahan lignin yang kurang maksimal. Sehingga selulosa yang terdapat dalam jerami padi belum keluar secara maksimal jadi pada hasil degradasi selulosa menjadi gula reduksi sedikit. Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri berpengaruh terhadap kandungan serat pada substrat selulosa. Menurut Irawati (2016) hampir semua enzim telah membentuk kompleks enzim dan substrat. Menurut Melati (2014) semakin tinggi kadar gula reduksi yang dihasilkan menunjukkan semakin tinggi aktivitas hidrolisis serat kasar yang dapat diartikan bahwasanya telah terjadi proses degradasi oleh enzim selulase menjadi bentuk lebih sederhana yaitu gula reduksi pada kandungan serat kasar.

Aktivitas enzim selulase pada substrat jerami padi yang memiliki nilai terlampau jauh dengan dedak bekatul yaitu 0,824444 U/mL karena jerami padi merupakan limbah pertanian yang memiliki kandungan lignin yang tinggi sebanyak 16,22% (Pratiwi, 2016) sehingga perlu dilakukan proses delignifikasi. Delignifikasi dengan menggunakan NaOH. Pada penelitian yang dilakukan Meryandini (2009) aktivitas selulase yang dihasilkan oleh jerami padi yang memiliki aktivitas selulase yang relatif rendah, ini sebabkan adanya lignin yang menyelubungi dan mengikat selulosa secara fisik sehingga menghalangi enzim selulase bekerja pada substrat. Hasil penelitian yang dilakukan dapat diartikan bahwasanya variasi substat dengan menggunakan jerami padi sebagai pengganti CMC belum optimum untuk

meningkatkan aktivitas selulase. Diduga bahwasanya substrat jerami yang digunakan terlalu sedikit dan mengakibatkan selulase yang dihasilkan secara optimum tidak tercukupi dalam medium produksinya (Budi, 2018). Baharuddin (2014) melakukan penelitian uji aktivitas enzim selulase dengan menggunakan substrat jerami menghasilkan aktivitas enzim selulase yang kecil karena jerami padi masih memiliki kandungan lignin meskipun telah dilakukan proses delignifikasi. Substrat bekatul memiliki nilai aktivitas lebih tinggi karena bakteri yang digunakan diisolasi dari bekatul itu sendiri.

Tabel 4. 1. Hasil Uji DNMRT Variasi Jenis Substat Terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Substrat	Notasi
Jerami	A
Dedak	B
Bekatul	B

Berdasarkan hasil analisis statistika (Lampiran 8) uji ANOVA dengan ketelitian 5% pada variasi jenis substrat menghasilkan, F_{hitung} sebesar 24,660 dengan probabilitas (sig.) sebesar 0,000 $F_{hitung} > F_{tabel}$ (2,03742) atau probabilitas $< \alpha$ ($\alpha=0,05$), sehingga H_0 ditolak. Sehingga dapat dinyatakan ada satu pasang jenis substrat yang menghasilkan aktivitas selulase yang berbeda signifikan. Nilai aktivitas selulase yang didapatkan dengan variasi substrat jerami, bekatul, dan dedak secara berturut-turut ialah 0,60548148; 0,73395062; 0,73555556. Dengan demikian dapat dinyatakan minimal ada satu pasang jenis substrat yang menghasilkan aktivitas enzim selulase yang berbeda signifikan. Karena terjadi perbedaan nyata yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji DNMRT (*Duncan's New Multiple Range Test*) pada substrat jerami memiliki perbedaan nyata signifikan sehingga pada

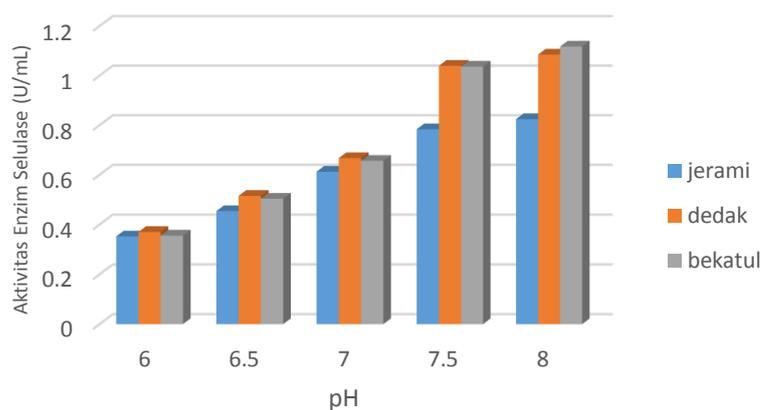
substrat jerami dinotasikan “a” dan pada substrat dedak dinotasikan “b”. Berbeda dengan substrat dedak padi dan bekatul yang tidak beda nyata sehingga dinotasikan “b”.

4.6 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Derajat keasaman (pH) merupakan faktor utama yang harus diketahui, karena setiap enzim akan bekerja optimum pada pH tertentu. Menurut Murrya, dkk., (2013) menyatakan bahwa sedikit pergeseran nilai pH dari pH optimum maka akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi katalisasi enzim, dengan begitu penelitian tentang aktivitas enzim selulase yang diperoleh dari *B. subtilis* yang perlu dibahas lebih lanjut. Meningkatnya aktivitas enzim ditentukan pada gugus aktif rantai samping enzim yang berfungsi untuk mengikat substrat. Ketika aktivitas enzim mengalami penurunan menunjukkan bahwa terjadi perubahan molekul enzim dengan substrat sehingga diantara keduanya semakin melemah (Purkan, dkk. 2015).

Faktor derajat keasaman (pH) berpengaruh terhadap struktur dan aktivitas enzim. Perubahan pada pH akan menyebabkan denaturasi protein penyusun enzim sendiri, oleh sebab itu setiap enzim akan dihasilkan oleh bakteri yang memiliki pH optimum yang berbeda-beda (Kartika, 2021). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Meryandini (2009) kisaran pH untuk bakteri *Bacillus* sp. dengan rentang pH 5-10, sedangkan untuk rentang kisaran pH pada CMC-ase ialah 4-6,5. Hasil dari penelitian Kartika (2021) menunjukkan nilai aktivitas enzim dengan substrat CMC memiliki pH optimum sebesar 0,070 U/mL. Hasil penelitian Nadhifah (2021) menunjukkan aktivitas enzim selulase lebih tinggi pada dedak sebesar $316,6 \times 10^{-4}$ U/mL dari pada bekatul sebesar $153,6 \times 10^{-4}$ U/mL. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sonia (2015) menunjukkan hasil aktivitas enzim optimum pada pH 8 sebesar

0,336 U/mL. Susanti (2011) menjelaskan bahwa bakteri *Bacillus* dapat menghidrolisis substrat selulase pada rentang pH 4-9, sedangkan menurut Gozan, dkk.. (2011) bahwasanya aktivitas selulase *Bacillus sp.* optimum pada kisaran pH 4-8.



Gambar 4.5 Aktivitas Selulase Variasi pH

Berdasarkan gambar 4.5 menunjukkan hasil aktivitas selulase tertinggi pada pH 8 dengan nilai aktivitas sebesar 0,824 U/mL pada substrat jerami; 1,084 U/mL pada substrat dedak; dan 1,117 U/mL pada substrat bekatul. Aktivitas enzim selulase dipengaruhi pH karena memiliki sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah untuk dipengaruhi oleh pH. Perubahan pH juga menyebabkan denaturasi enzim yang dapat menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Selain itu apabila terdapat pergeseran pH dari pH optimum akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi katalisis enzim, hal ini disebabkan karena asam amino yang merupakan pusat aktif enzim harus berada dalam keadaan ionisasi tetap agar menjadi aktif (Meryandini, 2009).

Tabel 4. 2 Hasil Uji DNMRT Variasi pH terhadap Aktivitas Enzim Selulase

pH	Notasi
6	A
6,5	B
7	C
7,5	D
8	D

Berdasarkan hasil analisis statistika (Lampiran 8) uji ANOVA dengan ketelitian 5% pada variasi pH menghasilkan, F_{hitung} sebesar 213,564 dengan probabilitas (sig.) sebesar 0,000 $F_{hitung} > F_{tabel}$ (2,03742) atau probabilitas $< \alpha$ ($\alpha=0,05$) sehingga H_0 ditolak. Dengan demikian dapat dinyatakan minimal ada satu pasang pH yang menghasilkan aktivitas enzim selulase yang berbeda signifikan. aktivitas selulase yang didapatkan pada pH 6 sebesar 0,35954733, pada pH 6,5 sebesar 0,49123457, pada pH 7 sebesar 0,64543210, pada pH 7,5 sebesar 0,95325103, dan pada pH 8 sebesar 1,00884774. Dengan demikian dapat dinyatakan minimal ada satu pasang jenis substrat yang menghasilkan aktivitas enzim selulase yang berbeda signifikan. Karena terjadi perbedaan nyata yang signifikan maka dilanjut dengan uji DNMRT (*Duncan's New Multiple Range Test*) pada setiap variasi pH menghasilkan nilai yang berbeda nyata akan disimbolkan dengan notasi yang berbeda (6 "a"; 6,5 "b"; 7 "c") akan tetapi pada pH 7,5 dan 8 tidak memiliki perbedaan nyata akan disimbolkan "d".

4.7 Dialog Hasil Penelitian dalam Prespektif Keislaman

Allah swt mengajarkan kita agar tidak lupa akan kewajiban manusia sebagai hamba-Nya dalam hal menuntut ilmu agama maupun ilmu pengetahuan. Salah satu ilmu pengetahuan ialah mengenai mikrobiologi yang mempelajari tentang makhluk-makhluk kecil seperti halnya bakteri, virus, jamur, dll. Allah swt telah

memperhatikan semua hal yang Ia ciptakan di muka bumi ini, hal kecil maupun besar pasti memiliki manfaat yang terpendam salah satunya adalah bakteri. Bakteri merupakan benda terkecil yang dapat dilihat dari mikroskop. Namun, bakteri dalam penelitian ini merupakan bakteri yang memiliki manfaat untuk menghasilkan enzim yang dapat dimanfaatkan secara lebih luas. Allah SWT telah menjelaskan dalam Al-Quran mengenai benda terkecil yang memiliki manfaat yang terdapat dalam QS. Yunus ayat 61 yang berbunyi:

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

Artinya: “Engkau (Nabi Muhammad) tidak berada dalam suatu urusan, tidak membaca suatu ayat Al-Qur’an, dan tidak pula mengerjakan suatu pekerjaan, kecuali Kami menjadi saksi atasmu ketika kamu melakukannya. Tidak ada yang luput sedikit pun dari (pengetahuan) Tuhanmu, walaupun seberat zarah, baik di bumi maupun di langit. Tidak ada sesuatu yang lebih kecil dan yang lebih besar daripada itu, kecuali semua tercatat dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuz).”

Menurut tafsir Al-Aisar bahwasanya Allah swt adalah zat yang maha luas ilmu dan pengetahuan-Nya. Allah juga memberitahukan kepada semua makhluk-Nya atas semua kekuasaan-Nya. Makhluk Allah yang paling kecil atau *dzarrah* pun tidak pernah luput dari kuasa dan pengetahuan-Nya. *Dzarrah* adalah semut kecil yang baik. Dia diciptakan Allah di muka bumi atau di atas langit. *Dzarrah* dapat berupa suatu yang lebih kecil atau lebih besar dari semut kecil itu. Semua itu sudah ditetapkan Allah dalam kitab-Nya yaitu *Lauhul Mahfudz* (Al-Jazairi, 2007).

Berdasarkan tafsir diatas, *dzarrah* merupakan makhluk kecil ciptaan Allah baik di bumi atau di langit. *Dzarrah* berukuran sangat kecil, ada yang bisa dilihat

langsung dengan mata telanjang atau ada juga yang memerlukan bantuan alat bantu untuk melihat. Salah satu makhluk Allah yang dinamakan dzarrah adalah bakteri. Bakteri merupakan salah satu makhluk Allah yang tidak bisa dilihat dengan mata telanjang namun memiliki banyak manfaat dalam kehidupan manusia. Dalam penelitian ini bakteri yang digunakan merupakan golongan bakteri *Bacillus sp.* bakteri ini dapat menghasilkan enzim selulase yang digunakan untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa.

Kegunaan bakteri yang dapat memproduksi enzim sehingga dapat menjadi penyeimbang alam sehingga limbah pertanian dapat dimanfaatkan dengan baik. Salah satu ayat dalam Al-quran menjelaskan bahwa kerusakan di alam merupakan perbuatan manusia dan akan berdampak pada manusia itu sendiri, seperti tertulis dalam QS Ar-Rum ayat 41 yang berbunyi:

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ

Artinya: *“Telah tampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan perbuatan tangan manusia. (Melalui hal itu) Allah membuat mereka merasakan sebagian dari (akibat) perbuatan mereka agar mereka kembali (ke jalan yang benar).”*

Pada kata *ظَهَرَ* yang dapat diartikan terjadi sesuatu dimuka bumi yang tampak jelas. Pada kata *الْفَسَادُ* menurut al-ashfahni yaitu keluarnya sesuatu dari keseimbangan baik sedikit maupun banyak. *الْفَسَادُ* merupakan antonim dari as-salah yang berarti manfaat atau berguna. Sedangkan menurut Al-Biqa’i yaitu kekurangan salam segala hal yang diutuhkan semua makhluk bukan hanya manusia saja.

Menurut M. Quraish Shihab **الْفَسَادُ** merupakan kerusakan di darat maupun di laut dan terjadi ketidakseimbangan serta kekurangan manfaat. Terjadi ketidakseimbangan di alam mengakibatkan siksa terhadap manusia. Semakin banyak kerusakan terhadap lingkungan semakin banyak pula dampak buruknya pada manusia. Allah menciptakan makhluk saling berkaitan satu dengan yang lain.

Ayat diatas menjelaskan bahwa kerusakan muka bumi disebabkan oleh ulah manusia. Asy-Syuyuti dan Al-Mahalliy (1505) menjelaskan dalam tafsir jalalain yang dimaksud dengan kerusakan bumi ini adalah kerusakan di darat yang disebabkan karena terhentinya hujan, menipisnya tumbuh-tumbuhan, serta kerusakan di laut yaitu kekeringan sungai dan kurangnya sumber air. Dalam kata **أَعْلَهُمْ يَرْجِعُونَ** menjelaskan bahwa Allah memberikan sanksi kepada manusia supaya merasakan akibat dari perbuatannya dan agar manusia bertaubat dari segala perbuatannya. Oleh karena itu, manusia diperintahkan untuk melakukan perbaikan dengan cara menjaga dan melestarikan lingkungan agar dapat terus seimbang.

Pada penelitian ini limbah pertanian jerami, dedak, dan bekatul dimanfaatkan sebagai substrat yang digunakan untuk menghasilkan ekstrak kasar enzim selulase yang berguna untuk mendegradasi selulosa menjadi gula yang lebih sederhana dengan menggunakan pengujian aktivitas enzim selulase. Nilai aktivitas enzim selulase yang didapat menunjukkan aktivitas enzim selulase yang lebih tinggi pada bekatul yang dapat diartikan bahwa pemecahan selulosa pada bekatul lebih banyak.

Allah swt menganugerahkan akal kepada manusia sebagai makhluk hidup untuk berpikir dan senantiasa mempelajari apa saja yang dapat dimanfaatkan dilangit maupun di bumi. Manusia telah ditunjuk oleh Allah swt untuk menjadi pemimpin

karena dengan menjadi pemimpin manusia sebagai pengganti umat-umat terdahulu dalam mengembangkan alam. Allah swt berfirman dalam QS. Al-An'am ayat 165:

وَهُوَ الَّذِي جَعَلَكُمْ خَلَائِفَ الْأَرْضِ وَرَفَعَ بَعْضَكُمْ فَوْقَ بَعْضٍ دَرَجَاتٍ لِّيَبْلُوكُمْ فِي مَا آتَاكُمْ ۗ إِنَّ رَبَّكَ سَرِيعُ الْعِقَابِ وَإِنَّهُ لَغَفُورٌ رَّحِيمٌ

Artinya: "Dialah yang menjadikan kamu sebagai khalifah-khalifah di bumi dan Dia yang mennggikan sebagian kamu beberapa derajat atas sebagian (yang lain) unntuk menguji kamu atas apa yang diberikan-Nya kepadamu. Sesungguhnya Tuhanmu sangat cepat hukuman-Nya. Sesungguhnya Dia Maha Pengampun lagi Maha Penyayang.

Tafsir Quraish Shihab menjelaskan bahwasanya Allah swt menjadikan manusia sebagai khalifah untuk pengganti umat-umat terdahulu dalam mengembangkan alam. Dia menginginkan derajat kesempurnaan materi dan maknawi sebagai kalian diatas yang lain. Itu semua agar Dia menguji kalian atas nikmat yang telah dikaruniakan-Nya, apakah kalian bersyukur atau tidak. Allah maha cepat hukumannya terhadap orang-orang yang melanggar. Sebab hukuman-Nya pasti akan datang. Segala yang akan datang adalah dekat. Sesungguhnya-Nya ampunannya terhadap pelanggaran yang dilakukan oleh orang-orang yang bertaubat dan berbuat baik sangat besar. Kasih sayang-Nya kepada mereka amat luas. Dalam ringkasan tasfir Al-Azhar tugas menjadi khalifah ialah meramaikan bumi, memeras akal budi untuk mencipta, berusaha, mencari dan menambah ilmu dan membangun, berkemajuan dan berkebudayaan, mengatur siasat negeri, bangsa dan benua. Didalam memikul kewajiban menjadi khalifah itu ditakdirkan, derajat manusia tidak sama, sebab yang setengah dlebihkan dari yang lain. Ada yang pintar, bodoh, kuat, lemah, mulia, hina, ada yang menjadi penguasa, ada yang menjadi rakyat jelata. "Untuk menguji kamu pada apa-apa yang telah Dia datangkan

kepada kamu." Artinya, sesungguhnya derajat manusia tidak sama, tetapi seluruh manusia diberi akal dan diberi pula petunjuk dengan agama, diutus rasul-rasul diturunkan kitab-kitab.

Manusia sebagai khalifah di bumi memiliki tugas untuk menyampaikan ilmu pengetahuan yang telah dimilikinya seperti halnya memanfaatkan limbah pertanian yang biasanya dibuang secara sia-sia. Melalui ilmu pengetahuan kita dapat menghambat kerusakan alam dengan cara pemanfaatan yang lebih baik dan kita sebagai manusia dapat menjadi penyeimbang supaya tidak terjadi kerusakan alam yang berlebihan. Berdasarkan penelitian ini bahwasanya kita dapat memanfaatkan bakteri (*dzarrah*) yang dapat menghasilkan enzim selulase sehingga dapat mendegradasi selulosa yang terdapat pada jerami, dedak, bekatu sehingga dapat menjadi gula yang lebih sederhana.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian didapatkan nilai aktivitas enzim selulase tertinggi pada pH 8 dengan nilai aktivitas sebesar 0,824 U/mL pada substrat jerami; 1,084 U/mL pada substrat dedak; dan 1,117 U/mL pada substrat bekatul. Hasil uji statistik menunjukkan adanya pengaruh berbeda nyata yang signifikan pada variasi pH. Sedangkan pada variasi substrat antara bekatul dan dedak tidak ada perbedaan nyata, tetapi ada beda nyata antara substrat jerami dengan dedak.

5.2 Saran

Saran yang dapat dilakukan dari penelitian ini adalah:

1. Pada penelitian ini dapat digunakan jenis substrat lainnya yang mengandung kadar selulosa yang tinggi
2. Untuk penelitian selanjutnya pengambilan bakteri dapat diisolasi dari limbah pertanian lain
3. Melakukan pretreatment pada ketiga substrat
4. Penyamaan OD ketika produksi enzim selulase

DAFTAR PUSTAKA

- Abd Razak, D.L.; Nur Y. Abd. Rashid; Anisah J.; Shaiful A. S. and Kamariah L. 2014. Enhancement of Phenolic Acid Content and Antioxidant Activity of Rice Bran Fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- Abdushshamad, M. K. 2003. *Mukjizat Ilmiah Dalam Al-Qur'an*. Jakarta: Akbar Media Eka Sarana.
- Acharya, A., D.R. Joshi., K. Shrestha, and D.R. Bhatta. 2012. Isolation and Screening of Thermophilic Cellulolytic Bacteria from Compost Piles. *Scientific World* 10 (10): 43-46.
- Ahmed, Z., Banu, H., Rahmna, M. M. Akhtier, F., Haque, M., S. 2001. Microbial Activity on the Degradation of Lignocellulosic Polysaccharides. *Journal Steptomyces Science*. 1(10):993-997.
- Amadi, P.U., and M.O. Ifeanacho. 2016. Impact of Changes in Fermentation Time, Volume of Yeast, and Mass of Plantain Pseudo-Stem Substrate on the Simultaneous Saccharification and Fermentation Potentials of African Land Snail Digestive Juice and Yeast. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 14 (2): 289–97.
- Anand, dkk., 2009. Isolation and Characterization of Bacteria From The Gut of Bombyx Mori That Degrade Cellulose, Xylan, Pectin and Starch and Their Impact on Digestion. *Journal of Insect Science*: Vol. 10. ISSN: 1536-2442
- Anindyawati, Trisanti. 2010. *Potensi Selulase dalam Mendegradasi Lignoselulosa Limbah Pertanian Untuk Pupuk Organik*. 45 (2): 8.
- Aryani, Siska Winda. 2012. “*Selulase dari Kapang Selulolitik Mucor sp.B2*,” 76.
- Asmin dan La Karimuna, 2014. Kajian Pemupukan Kalium dengan Aplikasi Jerami Padi Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Padi Sawah pada Lahan Sawah Bukaan Baru Di Kabupaten Buton, Sulawesi Tenggara. *Jurnal Agroteknos*. 4 No. (3) : 180-188
- Astawan, Made dan Andi Early Febrinda. 2010. Potensi Dedak dan Bekatul Sebagai Ingredient Pangan dan Produk Pangan Fungsional. (Artikel Pangan). Vol. 19. No.1.
- Asmarani, One. dkk. 2019. Heating Cell Immobilization of *Streptomyces greuseus* and Its Variant of Economical Fructose Production. *Malaysian Journal of Microbiology*. Vol. 15 (4).
- Baharuddin, Maswati, Sappewali Sappewali, Karisma Karisma, and Jeni Fitriyani. 2016. Produksi Bioetanol dari Jerami Padi (*Oryza Sativa L.*) dan Kulit

Pohon Dao (*Dracontamelon*) melalui Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS). *Chimica et Natura Acta* 4 (1): 1.

- Bai, et. al. 2012. Cellulases Production by *Bacillus Subtilis* Isolated from Cow Dung. *Departement and Biotechnology KSR Collage Of Art And Science Tiruchengode*. TN. India.
- Baharuddin, Maswati; Abdul Rauf, Patong; Ahyar Ahmad; Nursiah La Nafie. 2014. Aktivitas Enzim Selulase dari Isolat Bakteri Larva *Cossus cossus* dalam Hidrolisis Jerami Padi. *Jurnal Kimia Valensi*. Vol. 4 No. 2. ISSN: 1978-8193.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and Related Enzymes and Biotechnology. *Biotechnol Adv*. 18. 355-383.
- B.J. Habibie. 1992. *Memahami Al-Quran Dan Mengimplementasikannya: Akumulasi Pengalaman Keagamaan*. Jakarta: Penerbit Bangkit, Cetakan Pertama. H.22.
- Budi, L.K.; Wijanarka; Endang Kusdiyantini. 2018. Aktivitas Enzim Selulase yang Dihasilkan oleh Bakteri *Serratia marcescens* pada Substrat Jerami. *Jurnal Biologi*. Vol. 17. No. 1.
- Dashtban, Mehdi; Heidi Schraft and Wensheng Qin. 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*. 578–95.
- Dehghani, M., K. Karimi and M.Sadeghi. 2015. Pretreatment Of Rice Straw For The Improvement Of Biogas Production. *Energy Fuels*. 29 (6):3770–3775.
- Fitriani, E. 2003. *Aktivitas Enzim Karboksimetil Selulase Bacillus Pumilis Galur 55 Pada Berbagai Suhu Inkubasi*. Bogor: Kimia FMIPA IPB.
- Fitriasari, Widya; Nanang Masruchin dan Euis Hermiati. 2019. *Selulosa: Karakteristik dan Pemanfaatannya*. Jakarta: LIPI Press.
- Gandjar, I., S. Wellyzar dan O. Ariyani. 2006. *Mikrobiologi Dasar dan Terapan*, Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Goodman, Bernard A. 2020. Utilization of Waste Straw and Husks from Rice Production: A Review. *Journal of Bioresources and Bioproducts* 5 (3): 143–62.
- Hamisan, A.H. 2009. *Delignification of Oil Palm Fruit Buch using Chemical and Microbial Pretreatment Methode*. University Putra Malaysia. Malaysia
- Hamzah, hasty. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase dari Keong Sawah *Pila Ampullaceal* menggunakan Substrat Serbuk Gergaji Kayu. *Jurnal Farmasi, Sains Dan Kesehatan*. Vol. 4 No. 1. ISSN 2442-9791.

- Hatami, S.; dkk. 2008. Investigation on Aerobic Cellulolytic Bacteria in Some of North Forest and Farming Soils. *American-Eurasian J. Agric. & Environ Sci.*, 3 (5). ISSN: 1818-6769.
- Ibrahim A.S.S and Al Dewany. 2007. Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. *AustRAKian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4): 473-478
- Irawadi, T.T. 1990. *Selulase*. Bogor: IPB PAU Bioteknologi.
- Irawati, Rosyida, Karakterisasi pH, Suhu, dan Konsentrasi Substrat pada Enzim Selulase Kasar yang Diproduksi oleh *Bacillus cirnulans*. [skripsi]. Malang: Jurusan Kimi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Jannah, A.; Aulanni`am A.; Tri A.; and Suharjono S. 2018. Isolation, Cellulase Activity Test and Molecular Identification of Selected Cellulolytic Bacteria Indigenous Rice Bran.” *Indonesian Journal of Chemistry* 18 (3): 514.
- Jariwalla, R.J. 2001. Rice-Bran Products: Phytonutrients with Potential Applications in Preventive and Clinical Medicine. *Drugs Under Experimental And Clinical*. 27(1):17-26.
- Karimi, K.; Kheradmandinia, S.; And Taherzadeh, M.J. 2006. Conversion of Rice Straw to Sugar by Diluteacid Hydrolysis. *Biomass Bioenergy*, 30: 247 - 253.
- Kartika, Ismi Nurul dan Musliin Ibrahim. 2021. Efek Manipulasi pH pada Aktivitas Enzim Selulase Bakteri *Bacillus subtilis* FNCC 0059 dalam Mendegradasi Selulosa. *LenteraBio*. Vol 10 No. 1: 51-57.
- Kusmiati & Agustini, N.W.S. 2010. Ekstraksi Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Antibakteri dari Kultur Mikroalga *Spirulina Platensis*. (SN-KPK II). 1(1):179 - 185.
- Lubis, S.; R. Rachmat; Sudaryono.; S. Nugraha. 2002. *Pengawetan Dedak Dengan Metode Inkubasi*. Kerawang: Balitpa Sukamandi.
- Lynd, Lee R., Paul J. Weimer, Willem H. van Zyl, and Isak S. Pretorius. 2002. “Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3): 506–77.
- Maftukhah, Siti dan Abdullah Abdullah. 2018. Cellulase Enzyme Production From Rice Straw Using Solid State Fermentation and Fungi *Aspergillus niger* ITBCC L74. MATEC Web of Conferences 156.

- Megahati, R.R.P. 2001. Deteksi Mutasi Gen Penisilin Penisilin G Asilase Dari *Escherichia Coli* B130 Hasil PCR Mutagenik dengan Metode Single Strand Comformation Polymorphism (SSCP). [tesis]. Bandung: Biologi Institut Teknologi Bandung.
- Meryandini, A.; dkk. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara, Sains*, Vol. 13 No. 1: 33-38.
- Murtiyaningsih, Hidayah dan Muhammad Hazmi. 2017. Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase pada Bakteri Selulolitik Asal Tanah Sampah. *Agritop*. Vol. 15 (2):293-308. ISSN 1693-2877.
- Mosier, N. 2005. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*. 96 (6): 673–86.
- Nadhifah, M. 2021. Isolasi Bakteri Selulolitik dari Jerami Padi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase pada Berbagai Substrat. [skripsi]. Malang: Program Studi Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Nasir, Subriyer, and Hilma Kamila. 2009. *Ekstraksi Dedak Padi Menjadi Minyak Mentah Dedak Padi (Crude Rice Bran Oil) Dengan Pelarut N-Hexane Dan Ethanol*. 16 (2): 10.
- Nakazawa, H. dkk., 2008. Characterization of the Catalytic Domains of *Trichoderma Reesei* Endoglucanase I, II, and III Expressed in *Escherichia Col*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 81 (4), 681–689.
- Richana, N.; Budiyanto, A.; dan Arief R.W. 2009. *Ubikayu Inovasi Teknologi dan Kebijakan Pengembangan Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Nurhadiyanti, V.; Chandrawati C.; Wa O.C.N.; Luthfi K.D. 2018. *Pengantar teknologi fermentasi skala industry*. Malang: Universitas Brawijaya press.
- Nur, H.S.; Anja Meryandini; dan Hamim. 2009. Pemanfaatan Bakteri Selulolitik dan Xilanolitik yang Potensial untuk Dekomposisi Jerami Padi. *J. Tanah Trop*. Vol. 14. No. 1. Hal: 71-80. ISSN 0852-257X.
- Oktaviyanti, N.D. dan Destya W.E. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan Dedak Padi Varietas IR64 Terhadap Radikal Bebas DPPH. *Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi*. Vol. 9. No. 1. Hal: 22-30. ISSN 0216-1540.
- Oliveira, Melissa dos S.; Eliane P.C.; Eliana B.F. and Leonor de S.S. 2012. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Fermented Rice Bran (*Oryza sativa*). *Food Science and Technology (Campinas)*. 32 (3): 531–37.
- Palonen, Hetti; Folke Tjerneld; Guido Zacchi and Maija Tenkanen. 2004. Adsorption of *Trichoderma Reesei* CBH I and EG II and Their Catalytic

Domains on Steam Pretreated Softwood and Isolated Lignin. *Journal of Biotechnology*. 107 (1): 65–72.

- Pane, M.A.; M.M.B. Damanik Dan B.Sitorus. 2014. Pemberian Bahanorganik Kompos Jerami Padi dan Abu Sekam Padi dalam Memperbaiki Sifat Kimian Tanah Ultisol Serta pertumbuhan Tanaman Jagung. *Jurnal Online Agroekoteknologi*. 2.(4): 1426 – 1432.
- Percival Zhang, Y.-H., Michael E. Himmel, and Jonathan R. Mielenz. 2006. Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Selection Strategies. *Biotechnology Advances* 24 (5): 452–81.
- Pratiwi, Rimadani, Driyanti Rahayu, and Melisa Intan Barliana. 2016. Pemanfaatan Selulosa dari Limbah Jerami Padi (*Oryza sativa*) sebagai Bahan Bioplastik. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 3 (3): 83.
- Pratiwi, Y. H.; O. Ratnayani and I N. Wirajana. 2018. Perbandingan Metode Uji Gula Pereduksi Dalam Penentuan Aktivitas β -L-Arabinofuranosidase Dengan Substrat Janur Kelapa (*Cocos Nucifera*). *Jurnal Kimia*, July, 134.
- Prima, Ajaib and Silvera Devi. 2015. *Optimalisasi Ph Produksi Enzim Selulase Dari*. 2 (1): 6.
- Purkan, Purnama HD dan Sumarsih S. 2015. Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* Menggunakan Sekam PAdi dan Ampas Tebu sebagai Induser. *Jurnal Biologi Indonesia*. Vol 11 (2): 215-224
- Putra, S.R. dan Kosim, M. 2010. Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus Subtillis*. [skripsi]. Surabaya: FMIPA ITS Surabaya Jurusan Kimia.
- Putri, Syarafina. 2016. Karakterisasi Enzim Selulase yang dihasilkan oleh *Lactobacillus Plantarum* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat. [skripsi]. Malang: UIN Malang.
- Qazi, J.I.; Naureen C. and Saima S.M. 2011. Biofuel from Cellulosic Mass with Incentive for Feed Industry Employing Thermophilic Microbes. Biofuel Production - Recent Developments and Prospects, Marco Aurelio dos Santos Bernardes, *IntechOpen*, DOI: 10.5772/16534
- Rahayu, Azizah; Nengah D.K. 2013. Pengaruh Masa Inkubasi dan Konsentrasi Inokulum *Penicillium Sp.* terhadap Aktivitas Enzim Selulase pada Medium Tongkol Jagung. *Jurnal sains dan Seni POMITS*. Vol. 2. No. 1. ISSN; 2301-9271.
- Rasyaf, M. 2002. *Bahan Makanan Unggas Di Indonesia, Cetakan Ke-9*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

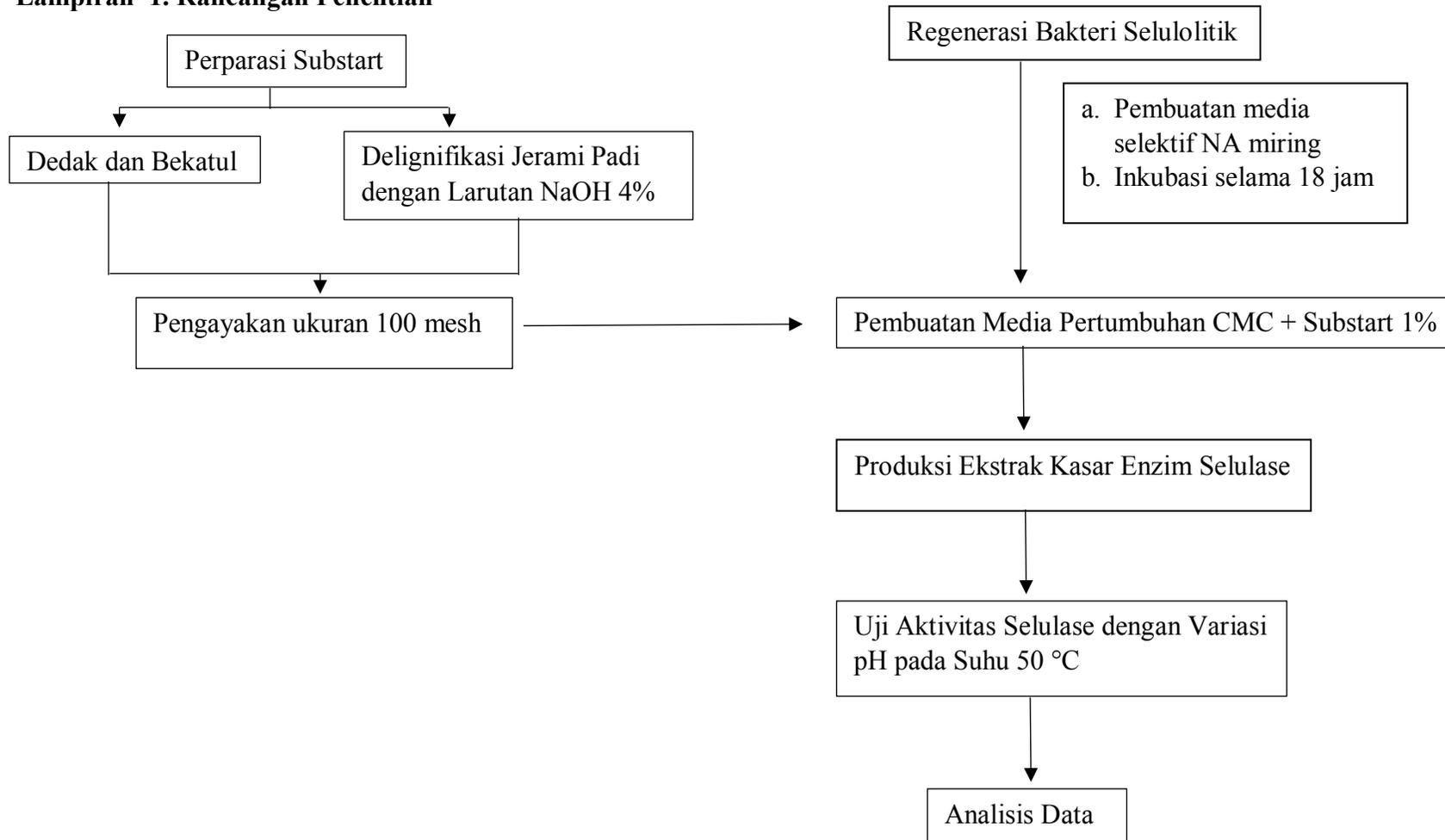
- Razie, Fakhrur; Iswandi Anas; Atang Sutandi; Lukman Gunarto and Sugiyanta Sugiyanta. 2011. Aktivitas Enzim Selulase Mikroba Yang Diisolasi Dari Jerami Padi Di Persawahan Pasang Surut Di Kalimantan Selatan. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan* 13 (2): 43.
- Romli, M.; Suprihatin, N. S.; Indrasti dan A.Y. Aryanto. 2014. Pembentukan Biogas dari Jerami Padi dan Sampah Pasar di dalam Sistem Fermentasi Semi Kering. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. 24 (2):97-104.
- Roslan, A.M.; P.L. Ye; U.K.M. Shah; S.A. Aziz And M.A. Hasan. 2011. Production of Bioethanol from Rice Straw using Cellulase by Local *Aspergillus Sp.* *International Journal of Agricultural Research*. 6(2):188- 193.
- Saadoun, I.; Ahlam D.; Ziad J. and Qotaiba A. 2013. Influence of Culture Conditions on Pectinase Production by *Streptomyces Sp.* (Strain J9). *International Journal of Life Science and Medical Research*. 3 (4): 148–54.
- Sakti., P.C. 2012. Optimasi Produksi Enzim Selulase dari *Basillus Sp.* BPPT CC RK2 dengan Variasi pH dan Suhu menggunakan Response Surface Methodology. [skripsi]. Depok: Fakultas Teknik Indonesia.
- Saha, Badal C. 2003. Hemicellulose Bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30 (5): 279–91.
- Santoso. 2010. *Biokimia Kedokteran I*. Jakarta: EGC.
- Saratale, G.D., Saratale, R.G., Oh, S.E. 2012. Production and Characterization of Multiple Cellulolytic Enzymes by Isolated *Streptomyces sp.* *MDS. Biomass and Bioenergy*. 47: 302-315
- Saritha, M.; R. Tiwari; S. Singh; S. Rana; A. Adak; A. Sharma; A. Arora and L. Nain. 2015. Bioprospecting for Superior Biomass Hydrolysing Fungi from Diverse Habitats. *J Biodivers Biopros Dev*. 2 (2): 1-7
- Saqib, Abdul Aala Namjus dan Philip John Whitney. 2011. Differential Behavior of the Dinitrosalicylic Acid (DNS) Reagent Towards Mono-and Disaccharide Sugar. *Biomass and Bioenergy* 35.
- Saropah, D. 2012. *Penentuan Kondisi Optimal Ekstrak Kasar Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul*. Malang: UIN Malang.
- Shaikh, N.M.; A.A. Patel; S.A. Mehta; and N.D. Petel. 2013. Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria Inhabiting Different Environment and Optimization of Cellulase Production. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*. 3(1):39–49.
- Sholihati, Al Maratun, and Maswati Baharuddin. 2018. “Produksi Dan Uji Aktivitas Enzim Selulase,” 13.

- Singhania, Reeta Rani. 2013. Role and Significance of Beta-Glucosidases in the Hydrolysis of Cellulose for Bioethanol Production. *Bioresource Technology*, 8.
- Sukmawati. 2018. Isolasi Bakteri Selulolitik dari Limbah Kulit Pisang. *BIOTROPIC The Journal of Tropical Biology*. Vol. 2 No. 1: 46-52.
- Sukumaran, Rajeev K.; Reeta R.S.; and Ashok Pandey. 2005. Microbial Cellulases Production. *Applications and Challenges*. 14.
- Suhardiman, Heni. 2010. Bekatul Sumber Prebiotik. www.bekatul.net. Diakses 5 Januari 2020.
- Sun, Y. 2002. Enzymatic Hydrolysis of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production, Ph. D. [thesis]. NC State University, Raleigh, NC.
- Susanti, Evi. 2011. Optinasi Produksi dan Karakterisasi Sistem Selulase dari *Bacillus circulans* Strain Lokal dengan Induser Aviciel. *Jurnal Ilmu dasar Vol. 12 No. 1*.
- Soerawidjaja, Tatang H. 2005. *Minyak-lemak dan Produk-Produk Kimia Lain dari Kelapa, Handout Kuliah Proses Industri Kimia*. Bandung: Program Studi Teknik Kimia, Institut Teknologi Bandung.
- Sonia, N.M.O.; dan Joni Kusnadi. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Selulase dari Isolat Bakteri OS-16 Asal Padang Pasir Tengger-Bromo. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol. 3 No 4.
- Ustman, M. H. 2008. *Tafsir Al Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Wanapat, M.; S. Kang; N. Hankla and K.Phesatcha. 2013. Effect of Rice Straw Treatment on Feed in take, Rumen Fermentation and Milk Production in Lactatingdairy Cows. *Afr. J. Agric. Res.* Vol. 8(17):1677-1687.
- Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2007. Konservasi Lahan Pasang Surut Dengan Teknologi Tradisional "Tepulikampar". *Balai Penelitian Pertanian Lahan Rawa*. Banjarbaru. Hlm 10.
- Watanabe, K. and K. Hayano. 1993. Distribution and Identification of Proteolytic *Bacillus Sp.* in Paddy Field Soil Under Rice Cultivation. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(7):674-680.
- Widarta, I.W.R.; Nocianitri K.A. dan Sari L.P.I.P. 2013. Ekstraksi Komponen Bioaktif Bekatul Beras Lokal Dengan Beberapa Jenis Pelarut. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. Vol. 2.No 2.
- Yoswathana, N.; P. Phuriphipat; P. Treyawutthiwat And M.N. Eshtiaghi. 2010. Bioethanol Production From Rice Straw. *Energy Research Journal 1 (1)*: 26-31

- Zhang, H.J.; H. Zhang; L. Wang; and X.N. Guo. 2012. Preparation and Functional Properties of Rice Bran Proteins from Heat-Stabilized Defatted Rice Bran. *Food Research International* 47 (2): 359–63.
- Zhang, Xiu Min. 2020. Liquid Hot Water Treatment of Rice Straw Enhances Anaerobic Degradation and Inhibits Methane Production during in Vitro Ruminant Fermentation. *J. Dairy Sci.* 103 (5): 1

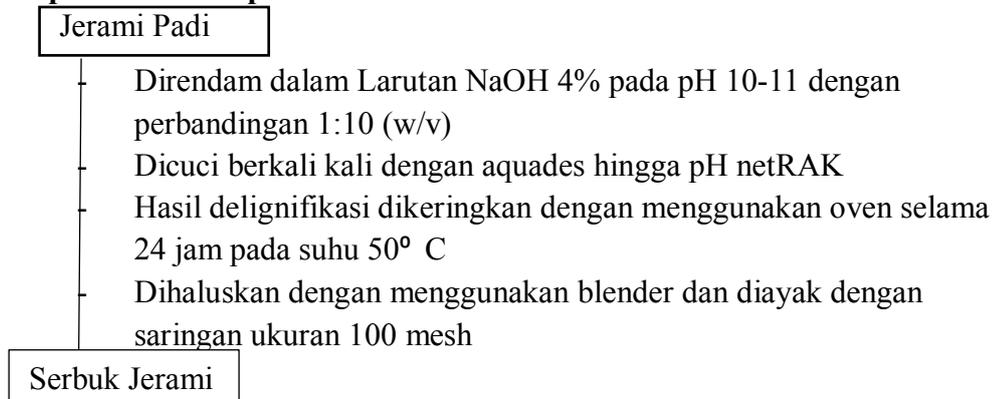
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Diagram Alir

1. Preparasi Jerami padi



2. Pembuatan Media

a. Pembuatan Media CMC Agar

1 g CMC; 0,04 g MgSO₄.7H₂O; 0,15 g KNO₃; 0,1 g K₂HPO₄; 0,004 g CaCl₂.2H₂O; 0,4 g *yeast extract* dan 3,4 g agar

- Dicampurkan semua bahan dengan akuades 100 mL ke dalam erlenmeyer 250 mL
- Dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk hingga larut dengan menggunakan hotplate
- Ditutup mulut erlenmeyer dengan menggunakan kapas
- Disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 1 atm selama 15 menit

Hasil

b. Pembuatan Media CMC Cair 1%

1 g CMC; 0,04 g MgSO₄.7H₂O; 0,15 g KNO₃; 0,1 g K₂HPO₄; 0,004 g CaCl₂.2H₂O; 0,4 g *yeast extract*

- Dicampurkan semua bahan dengan akuades 100 mL ke dalam erlenmeyer 250 mL
- Dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk hingga larut dengan menggunakan hotplate
- Ditutup mulut erlenmeyer dengan menggunakan kapas
- Disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 1 atm selama 15 menit

Hasil

3. Regenerasi Bakteri Selulolitik

Bakteri Selulolitik

- Diambil 1 ose bakteri
- Digoreskan pada media CMC miring dan CMC plate
- Diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam

Hasil

4. Pembuatan Inokulum dari Kultur Bakteri selulolitik

Bakteri Selulolitik

- Diambil masing-masing 2 ose dari media regenerasi
- Diinokulasi pada 50 mL CMC cair 1% hasil preparasi
- Ditambahkan masing-masing substrat pada erlenmeyer
- Diinkubasi dalam inkubator bergoyang selama 30 menit dengan kecepatan 200 rpm
- Diinokulasi sebanyak 10 mL ke dalam 100 mL media CMC cair
- Diinkubasi dalam inkubator begoyang selama 24 jam
- Diambil 45 mL dimasukkan kedalam falcon
- Disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit

Hasil

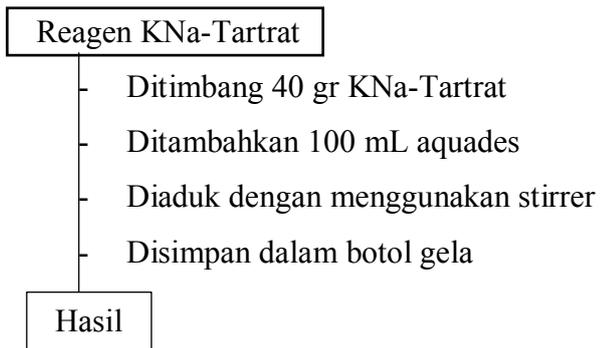
5. Pembuatan Reagen DNS

Reagen DNS

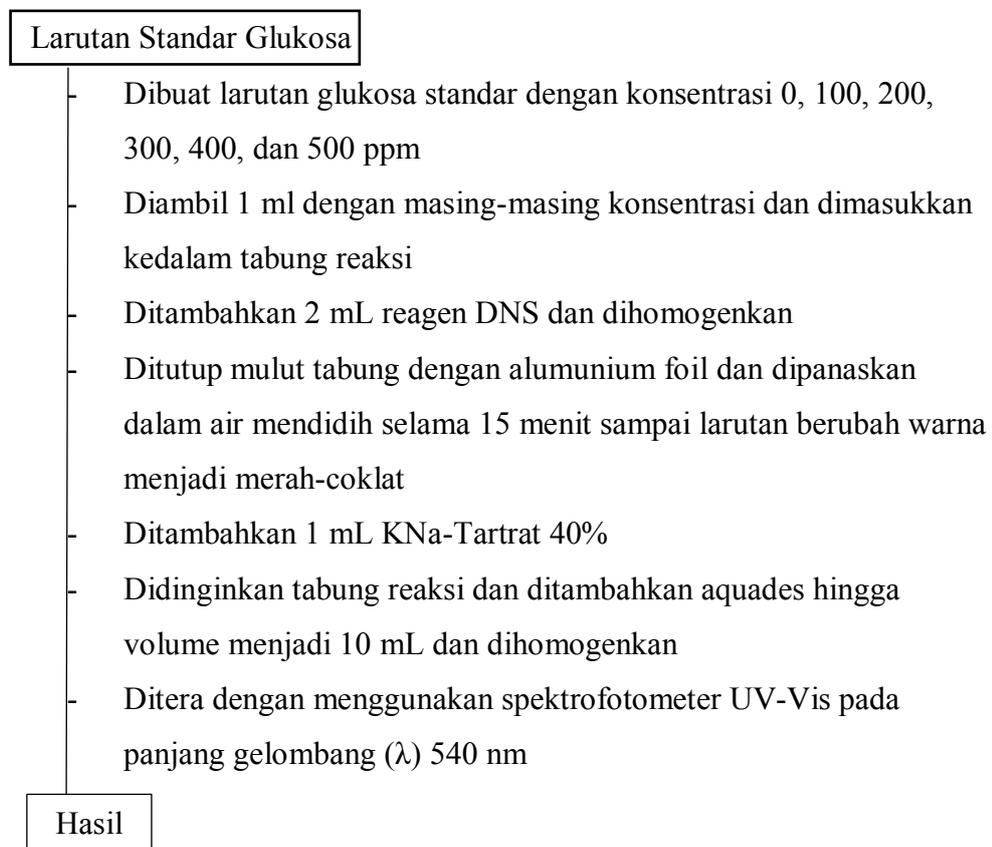
- Ditimbang 1 gr DNS
- Ditambahkan 30 gr K-Na Tartrat
- Ditambahkan ke dalam 80 mL larutan NaOH 0,5 N
- Dipanaskan perlahan hingga reagen larut
- Ditambahkan aquades hingga volume akhir 100

Hasil

6. Pembuatan Reagen KNa-Tartrat 40%



7. Pembuatan Kurva Standar Glukosa



8. Uji Aktivitas Enzim Selulase

Media CMC 1%

- Diambil 1 mL kedalam tabung raksi
- Ditambahkan 1 mL buffer fosfat pH 6;6,5;7;7,5 dan 8
- Ditambahkan 1 mL ekstrak kasar enzim selulase dan dikocok dengan menggunakan vortex
- Diinkubasi selama 30 menit pada suhu 40° C
- Ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex
- Ditutup mulut tabung dengan alumunium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selam 15 menit sampai larutan berubah warnah merah-coklat
- Ditambahkan 1 mL larutan KNa-Tartrat 40%
- Didinginkan tabung reaksi
- Ditambahkan aquades hingga volume menjadi 10 mL lalu dihomogenkan
- Ditera dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada pada panjang gelombang (λ) 540 nm

Hasil

Lampiran 3. Pembuatan Reagen

1. Pembuatan Reagen DNS (Saqib, 2011)

Menimbang 1 gr DNS (*3,5-dinitrosalisilic acid*) dan 30 gr K-Na Tartrat (*Rochellesalt*) ditambahkan ke dalam 80 mL NaOH 0,5 N dan dipanaskan perlahan untuk melarutkan reagen kemudian ditambahkan aquades hingga volume 100 mL.

2. Pembuatan Reagen KNa-Tartrat 40%

Sebanyak 40 g KNa-Tartrat dilarutkan dalam 100 mL akuades di erlenmeyer. Kemudian diaduk dengan *stirrer*. Setelah larut, larutan disimpan dalam botol berwarna gelap.

3. Pembuatan Larutan Buffer Phospat Berbagai pH

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 100 mL):

- a. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0,1 \text{ mol/L} \times 178 \text{ g/mol} \times 0,1 \text{ L}$
 $= 1,78 \text{ gram (dilarutkan dalam 100 mL akuades)}$
- b. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0,1 \text{ mol/L} \times 156 \text{ g/mol} \times 0,1 \text{ L}$
 $= 1,56 \text{ gram (dilarutkan dalam 100 mL akuades)}$

Kedua larutan tersebut dicampurkan sedikit demi sedikit kedalam gelas beaker dan diukur pH nya menggunakan pH meter sampai mencapai pH yang diinginkan.

Lampiran 4. Perhitungan

1. Pembuatan Konsentrasi Inokulum 1%

Larutan konsentrasi inokulum 1% (v/v) dibuat dengan memasukkan kedalam substrat jerami, dedak, dan bekatul. Volume substrat yang digunakan adalah 50 ml dan volume inokulum yang diambil adalah sesuai dengan ketentuan berikut:

$$\% (b/v) = \frac{\text{Volume inokulum}}{\text{Volume Substrat}} \times 100\%$$

$$1\% = \frac{\text{Volume inokulum}}{50 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$50 \text{ mL} = \text{Volume inokulum} \times 100$$

$$0,5 \text{ gram} = \text{Volume inokulum}$$

2. Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Cara membuat stok glukosa 1000 ppm adalah:

$$500 \text{ ppm} = \frac{500 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{0,5 \text{ gr}}{1 \text{ L}} = \frac{0,5 \text{ gr}}{1000 \text{ mL}}$$

Untuk membuat larutan standar 500 ppm diperlukan 0,1 gr glukosa, dilarutkan dengan akuades sebanyak 200 mL. Kemudian larutan glukosa dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm sebanyak 50 mL. kemudian dibuat sesuai pengenceran berikut:

- a. Konsentrasi 100 ppm

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

$$V_1 \times 500 \text{ ppm} = 50 \text{ mL} \times 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$
- b. Konsentrasi 200 ppm

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

$$V_1 \times 500 \text{ ppm} = 50 \text{ mL} \times 200 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 20 \text{ mL}$$
- c. Konsentrasi 300 ppm

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

$$V_1 \times 500 \text{ ppm} = 50 \text{ mL} \times 300 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 30 \text{ mL}$$
- d. Konsentrasi 400 ppm

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

$$V_1 \times 500 \text{ ppm} = 50 \text{ mL} \times 400 \text{ mL}$$

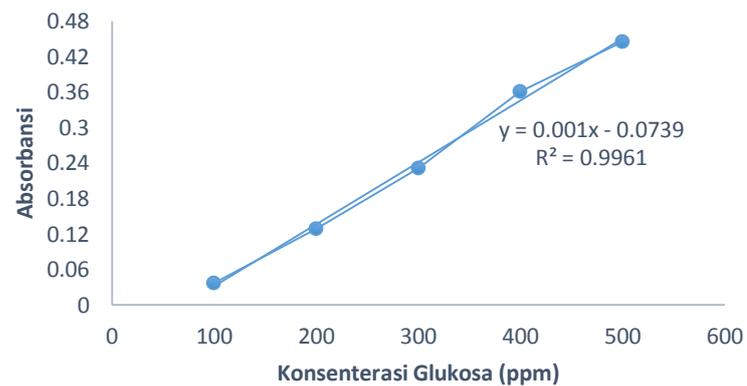
$$V_1 = 40 \text{ mL}$$

Lampiran 5. Pembuatan Kurva Standar Larutan Glukosa

Tabel L.5.1. Data Absorbansi Larutan Glukosa pada λ 540 nm

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
100	0,0372
200	0,1285
300	0,2315
400	0,3605
500	0,4453

Gambar L.5.1. Grafik Kurva standar Glukosa



L.4.1. Perhitungan Konsentrasi Glukosa

Rumus: $y = ax + b$

$$y = 0,001x + (-0,0739)$$

$$y = 0,001x - 0,0739$$

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

Lampiran 6. Pengukuran Absorbansi dan Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Tabel L.6.1. Nilai Absorbansi Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Selulase

pH	Substrat	Ulangan		
		1	2	3
Blanko		0	0	0
6	Jerami	0,0161	0,02	0,0276
	Dedak	0,0289	0,0249	0,0246
	Bekatul	0,0284	0,0219	0,0162
6,5	Jerami	0,0564	0,0495	0,0404
	Dedak	0,0801	0,0648	0,0509
	Bekatul	0,0704	0,066	0,0501
7	Jerami	0,0995	0,0805	0,0945
	Dedak	0,1336	0,09	0,0953
	Bekatul	0,1257	0,0862	0,098
7,5	Jerami	0,1424	0,1306	0,1401
	Dedak	0,2275	0,2008	0,1921
	Bekatul	0,2295	0,1987	0,1896
8	Jerami	0,1707	0,1428	0,1326
	Dedak	0,2423	0,2039	0,2108
	Bekatul	0,2356	0,2485	0,1992

L.6.1. Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase

Aktivitas Enzim =

$$\frac{\text{Konsentrasi glukosa (ppm)} \times (\text{Volume total enzim-Substrat}) \text{ mL}}{\text{Berat molekul glukosa} \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) \times \text{Volume enzim (mL)} \times \text{Waktu inkubasi (menit)}} \times Fp$$

Dimana:

Konsentrasi Glukosa = Nilai x

Volume Total Enzim-Substrat = 2 mL

Berat Molekul Glukosa = 180 gr/mL

Volume Enzim = 1 mL

Waktu Inkubasi = 30 menit

Faktor Pengenceran (Fp) = 10 mL

Misal absorbansi selulase ekstrak kasar adalah 0,021233

Maka $y = ax + b$

$$0,021233 = 0,001x + (-0,0739)$$

$$0,021233 = 0,001x - 0,0739$$

$$0,021233 + 0,0739 = 0,001x$$

$$0,095133 = 0,001x$$

$$X = 0,095133/0,001$$

$$X = 95,133$$

Tabel L.6.2. Hasil Perhitungan Konsentrasi Glukosa

pH	Substrat	Ulangan		
		1	2	3
6	Jerami	90	93,9	101,5
	Dedak	102,8	98,8	98,5
	Bekatul	102,3	95,8	90,1
6,5	Jerami	130,3	123,4	114,3
	Dedak	154	138,7	124,8
	Bekatul	144,3	139,9	124
7	Jerami	173,4	154,4	168,4
	Dedak	207,5	163,9	169,2
	Bekatul	199,6	160,1	171,9
7,5	Jerami	216,3	272,6	214
	Dedak	301,4	274,7	266
	Bekatul	303,4	272,6	263,5
8	Jerami	244,6	216,7	206,5
	Dedak	316,2	277,8	284,7
	Bekatul	309,5	322,4	273,1

Sehingga,

Aktivitas Enzim =

$$\frac{\text{Konsentrasi glukosa (ppm)} \times (\text{Volume total enzim-Substrat}) \text{ mL}}{\text{Berat molekul glukosa } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) \times \text{Volume enzim (mL)} \times \text{Waktu inkubasi (menit)}} \times Fp$$

$$AE = \frac{90 \text{ (ppm)} \times 2 \text{ mL}}{180 \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) \times 1 \text{ (mL)} \times 30 \text{ (menit)}} \times 10 \text{ mL}$$

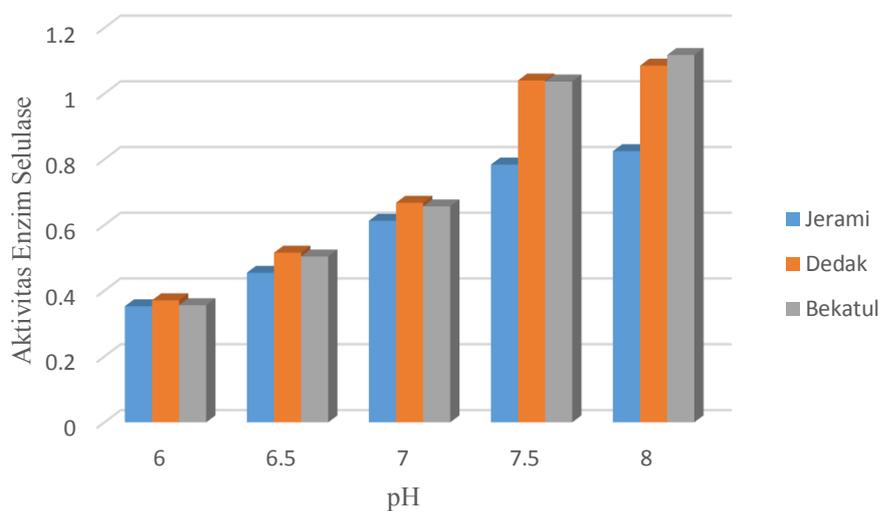
$$AE = 0,333333 \text{ U/mL}$$

Satu unit aktivitas selulase dinyatakan dengan banyaknya unit mol glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL ekstrak kasar selulase permenit pada kondisi tertentu, sehingga aktivitas yang diperoleh adalah 0,333333 U/mL.

Tabel L.5.3. Data Hasil Uji Aktivitas Selulase dengan Variasi pH

pH	Substrat	Ulangan			Rata-rata
		1	2	3	
6	Jerami	90	93,9	101,5	0,352346
	Dedak	102,8	98,8	98,5	0,370494
	Bekatul	102,3	95,8	90,1	0,355802
6,5	Jerami	130,3	123,4	114,3	0,454321
	Dedak	154	138,7	124,8	0,515432
	Bekatul	144,3	139,9	124	0,503951
7	Jerami	173,4	154,4	168,4	0,612593
	Dedak	207,5	163,9	169,2	0,667407
	Bekatul	199,6	160,1	171,9	0,656296
7,5	Jerami	216,3	272,6	214	0,783704
	Dedak	301,4	274,7	266	1,03963
	Bekatul	303,4	272,6	263,5	1,03642
8	Jerami	244,6	216,7	206,5	0,824444
	Dedak	316,2	277,8	284,7	1,084815
	Bekatul	309,5	322,4	273,1	1,117284

Gambar L.5.1 Grafik Aktivitas Enzim Selulase



Lampiran 7. Dokumentasi

a. Proses Delignifikasi Jerami Padi



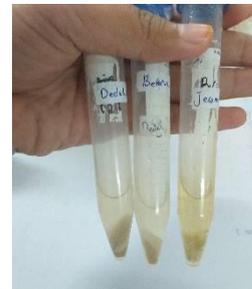
b. Substrat Limbah Pertanian



c. Regenerasi Bakteri Selulolitik



d. Kultur Bakteri Selulolitik



e. Larutan Kurva Standar Berbagai Konsentrasi



f. Kurva Standar Glukosa



g. Campuran Ekstrak Enzim dan CMC 1% dengan berbagai Variasi pH

h. Inkubasi Suhu 50



i. Proses Penambahan Reagen DNS

j. Proses Pemanasan Reagen DNS



k. Penambahan KNa-Tartrat 40%



l. Pengukuran Absorbansi dengan UV-vis



Lampiran 8. Statistik Two a Way ANOVA

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Substrat	1 Jerami	15
	2 Dedak	15
	3 Bekatul	15
pH	1 pH 6	9
	2 pH 6,5	9
	3 pH 7	9
	4 pH 7,5	9
	5 pH 8	9

Descriptive Statistics

Dependent Variable: AE_Selulase

Substrat	pH	Mean	Std. Deviation	N
Jerami	pH 6	,35234567	,021660762	3
	pH 6,5	,45432099	,029722848	3
	pH 7	,61259259	,036477251	3
	pH 7,5	,78370370	,023168140	3
	pH 8	,82444444	,073049394	3
	Total	,60548148	,192199605	15
Dedak	pH 6	,37049383	,008891461	3
	pH 6,5	,51543210	,054094787	3
	pH 7	,66740741	,088113127	3
	pH 7,5	1,03962963	,068322041	3
	pH 8	1,08481481	,075819257	3
	Total	,73555556	,298185741	15
Bekatul	pH 6	,35580247	,022608778	3
	pH 6,5	,50395062	,039552249	3
	pH 7	,65629630	,075097559	3
	pH 7,5	1,03641975	,077445794	3
	pH 8	1,11728395	,094690553	3
	Total	,73395062	,312413803	15
Total	pH 6	,35954732	,018289164	9
	pH 6,5	,49123457	,046202869	9
	pH 7	,64543210	,065675763	9
	pH 7,5	,95325103	,137740160	9
	pH 8	1,00884774	,156006450	9
	Total	,69166255	,273676158	45

**Levene's Test of Equality of Error
Variances^a**

Dependent Variable: AE_Selulase

F	df1	df2	Sig.
,758	14	30	,702

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Substrat + pH

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: AE_Selulase

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3,062 ^a	6	,510	83,010	,000
Intercept	21,528	1	21,528	3501,783	,000
Substrat	,167	2	,084	13,593	,000
pH	2,895	4	,724	117,719	,000
Error	,234	38	,006		
Total	24,823	45			
Corrected Total	3,296	44			

a. R Squared = ,929 (Adjusted R Squared = ,918)

Estimated Marginal Means

Grand Mean

Dependent Variable: AE_Selulase

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
,692	,012	,668	,715

Post Hoc Tests

Substrat

Multiple Comparisons

Dependent Variable: AE_Selulase

	(I) Substrat	(J) Substrat	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	Jerami	Dedak	-,13007408*	,028630259	,000	-,18803301	-,07211515
		Bekatul	-,12846914*	,028630259	,000	-,18642807	-,07051021
	Dedak	Jerami	,13007408*	,028630259	,000	,07211515	,18803301
		Bekatul	,00160494	,028630259	,956	-,05635399	,05956387
	Bekatul	Jerami	,12846914*	,028630259	,000	,07051021	,18642807
		Dedak	-,00160494	,028630259	,956	-,05956387	,05635399

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,006.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Homogeneous Subsets

		AE_Selulase	
Duncan ^{a,b}	Substrat	N	Subset
			1 2
	Jerami	15	,60548148
	Bekatul	15	,73395062
	Dedak	15	,73555556
	Sig.		1,000 ,956

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,006.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15,000.

b. Alpha = ,05.

pH

Multiple Comparisons

Dependent Variable: AE_Selulase

	(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	pH 6	pH 6,5	-,13168725*	,036961506	,001	-,20651190	-,05686259
		pH 7	-,28588478*	,036961506	,000	-,36070943	-,21106012
		pH 7,5	-,59370371*	,036961506	,000	-,66852836	-,51887905
		pH 8	-,64930042*	,036961506	,000	-,72412507	-,57447576
	pH 6,5	pH 6	,13168725*	,036961506	,001	,05686259	,20651190
		pH 7	-,15419753*	,036961506	,000	-,22902219	-,07937287
		pH 7,5	-,46201646*	,036961506	,000	-,53684112	-,38719180
		pH 8	-,51761317*	,036961506	,000	-,59243783	-,44278851
	pH 7	pH 6	,28588478*	,036961506	,000	,21106012	,36070943
		pH 6,5	,15419753*	,036961506	,000	,07937287	,22902219
		pH 7,5	-,30781893*	,036961506	,000	-,38264359	-,23299427
		pH 8	-,36341564*	,036961506	,000	-,43824029	-,28859098
	pH 7,5	pH 6	,59370371*	,036961506	,000	,51887905	,66852836
		pH 6,5	,46201646*	,036961506	,000	,38719180	,53684112
		pH 7	,30781893*	,036961506	,000	,23299427	,38264359
		pH 8	-,05559671	,036961506	,141	-,13042136	,01922795
pH 8	pH 6	,64930042*	,036961506	,000	,57447576	,72412507	
	pH 6,5	,51761317*	,036961506	,000	,44278851	,59243783	
	pH 7	,36341564*	,036961506	,000	,28859098	,43824029	
	pH 7,5	,05559671	,036961506	,141	-,01922795	,13042136	

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,006.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Homogeneous Subsets

		AE_Selulase					
		Subset					
	pH	N	1	2	3	4	
Duncan ^{a,b}	pH 6	9	,35954732				
	pH 6,5	9		,49123457			
	pH 7	9			,64543210		
	pH 7,5	9				,95325103	
	pH 8	9				1,00884774	
	Sig.			1,000	1,000	1,000	,141

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,006.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.