

**KARAKTERISASI ENZIM SELULASE YANG DIHASILKAN OLEH
Lactobacillus plantarum PADA VARIASI SUHU, PH
DAN KONSENTRASI SUBSTRAT**

SKRIPSI

Oleh :
SYARAFINA PUTRI
NIM. 12620060



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016**

**KARAKTERISASI ENZIM SELULASE YANG DIHASILKAN OLEH
Lactobacillus plantarum PADA VARIASI SUHU, PH
DAN KONSENTRASI SUBSTRAT**

SKRIPSI

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

Oleh:
SYARAFINA PUTRI
NIM. 12620060

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016**

**KARAKTERISASI ENZIM SELULASE YANG DIHASILKAN OLEH
Lactobacillus plantarum PADA VARIASI SUHU, PH
DAN KONSENTRASI SUBSTRAT**

SKRIPSI

Oleh:
SYARAFINA PUTRI
NIM. 12620060

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :
Tanggal 20 Juni 2016

Dosen Pembimbing I

Ir. Liliek Harianie A.R. M.P.
NIP. 19620901 199803 2 001

Dosen Pembimbing II

Dr. Ahmad Barizi, M.A.
NIP. 19731212 199803 1 001

Tanggal 20 Juni 2016

Mengetahui
Ketua Jurusan Biologi

Dr. Evita Saadti Savitri, M.P.
NIP. 19741018 200312 2 002

**KARAKTERISASI ENZIM SELULASE YANG DIHASILKAN OLEH
Lactobacillus plantarum PADA VARIASI SUHU, PH
DAN KONSENTRASI SUBSTRAT**

SKRIPSI

Oleh:
SYARAFINA PUTRI
NIM. 12620060

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal 01 Juli 2016

Susunan Dewan Penguji

- | | |
|-----------------------|---|
| 1) Penguji Utama | <u>Dr. Hj Ulfah Utami, M.Si</u>
NIP. 196 50509 199903 2 002 |
| 2) Ketua Penguji | <u>Anik Maunatin, M.P</u>
NIK. 2014 0201 2412 |
| 3) Sekretaris Penguji | <u>Ir. Liliek Harianie A.R, M.P</u>
NIP. 19620901 199803 2 001 |
| 4) Anggota Penguji | <u>Dr. Ahmad Barizi, M.A</u>
NIP. 19731212 199803 1 001 |

Tanda Tangan

.....
.....
.....
.....

Mengetahui dan Mengesahkan
Ketua Jurusan Biologi


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

PERNYATAAN ORISINALITAS TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Syarafina Putri

NIM : 12620060

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Karakterisasi Enzim Selulase yang Dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat

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

Malang, 16 Juli 2016

Yang Membuat Pernyataan,



Syarafina Putri
NIM. 12620060

MOTTO

Bismillahirrahmanirrahim

"Satu kata yang harus selalu kau sematkan dalam bibirmu disela perjuanganmu,
dimanapun dan kapanpun"



LEMBAR PERSEMBAHAN

Karya ini saya persembahkan untuk :

Allah Subhanahu wata'ala dan Rasulullah Muhammad Salallahu 'alaihi wasallam

Kedua orang tua saya, Ayah H. Imron Rosyadi dan Ibu Hj. Siti Rohmah yang dengan penuh doa, kasih sayang dan kesabaran telah memberikan segala bentuk dukungan kepada saya

Kedua adik saya, Aida Khorida dan Muhammad Shohibul Afkar Dzikrullah yang selalu menjadi penyemangat dalam hidup saya

Keluarga besar Biologi 2012, terimakasih telah menjadi teman, sahabat, keluarga yang telah mendukung dan menjadi tempat berbagi suka maupun duka

Dan untuk semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini

KATA PENGANTAR

Puji syukur *Alhamdulillah* penulis ucapkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufiq serta hidayah dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul “Karakterisasi Enzim Selulase yang Dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat” ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana dalam bidang Biologi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

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

1. Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.Si, selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ir. Liliek Harianie A.R, M.P dan Dr. Ahmad Barizi, M.A, selaku dosen pembimbing yang dengan penuh keikhlasan serta kesabaran telah memberikan bimbingan, pengarahan dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini.
5. Anik Maunatin, M.P dan Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si, selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritik yang membangun sehingga membantu terselesainya skripsi ini.
6. drg. Risma Aprinda K, selaku dosen wali yang telah memberikan dukungan dan semangat sehingga penulisan skripsi dapat terselesaikan.
7. Lusty Istiqomah, S.Pt., M.Biotech, selaku dosen pembimbing PKL yang telah bersedia memberikan waktu, ilmu dan bimbingannya sampai skripsi.
8. Seluruh dosen, Laboran Jurusan Biologi dan Staf Administrasi yang telah membantu dan memberikan kemudahan, terimakasih atas semua ilmu dan bimbingannya.

9. Peneduh jiwaku Ayah H. Imron Rosyadi dan Ibu Hj. Siti Rohmah, yang selalu memberikan doa, semangat, serta motivasi kepada penulis sampai saat ini.
10. Seluruh teman-teman Jurusan Biologi angkatan 2012, yang berjuang bersama-sama menyelesaikan studi sampai memperoleh gelar S.Si.
11. Semua pihak yang ikut membantu dan memberikan dukungan baik moril maupun materiil dalam menyelesaikan skripsi ini.

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

Malang, Juli 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan	5
1.4 Hipotesis.....	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
1.6 Batasan Masalah.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pemanfaatan Limbah dalam Islam.....	8
2.2 Bakteri dalam Islam	9
2.3 Selulosa	11
2.4 Enzim Selulase	12
2.5 Mekanisme Kerja Enzim Selulase	14
2.6 Aktivitas Enzim Selulase	15
2.7 Penentuan Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS.....	16
2.8 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim Selulase.....	18
2.9 Morfologi dan Karakteristik <i>Lactobacillus plantarum</i>	22
2.10 Potensi Bakteri Asam Laktat sebagai Penghasil Selulase.....	24
2.11 Aktivitas Enzim Selulase dari <i>Lactobacillus plantarum</i>	25
2.12 Potensi <i>Lactobacillus plantarum</i> dalam Mendegradasi Serat.....	27

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian	29
3.2 Waktu dan Tempat	29
3.3 Variabel Penelitian	30
3.3.1 Variabel Bebas	30
3.3.2 Variabel Terikat	30
3.3.3 Variabel Kontrol.....	30
3.4 Alat dan Bahan	30
3.4.1 Alat.....	30
3.4.2 Bahan	31
3.5 Prosedur Penelitian.....	31
3.5.1 Pembuatan Media.....	31
3.5.1.1 Sterilisasi Alat	31
3.5.1.2 Media MRS Agar dan MRS <i>Broth</i>	31
3.5.1.3 Media CMC Agar dan <i>Broth</i>	32
3.5.2 Uji Pendahuluan Identifikasi BAL Genus <i>Lactobacillus</i>	32
3.5.2.1 Pengamatan Makroskopis	32
3.5.2.2 Pengamatan Mikroskopis	33
3.5.3 Pengujian Aktivitas Selulase secara Kualitatif	34
3.5.4 Peremajaan Isolat Bakteri	35
3.5.5 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase	35
3.5.6 Pembuatan Larutan Standar Glukosa	35
3.5.7 Pembuatan Kurva Standar Glukosa	36
3.5.8 Pengujian Aktivitas Selulase dengan Metode DNS.....	36
3.5.10 Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Selulase	38
3.5.10.1 Pengaruh Suhu	38
3.5.10.2 Pengaruh pH.....	39
3.5.10.3 Pengaruh Konsentrasi Substrat	39
3.6 Teknik Analisis Data.....	39
3.7 Alur Penelitian	40

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Pendahuluan Identifikasi Genus BAL.....	41
4.2 Uji Kualitatif Enzim Selulase Ekstraseluler.....	44
4.3 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase	47
4.4 Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS	49
4.5 Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Selulase dari <i>L. plantarum</i>	51
4.5.1 Pengaruh Suhu	52
4.5.2 Pengaruh pH.....	56
4.5.3 Pengaruh Konsentrasi Substrat	60

4.5 Kajian Keislaman tentang Enzim Selulase dari Bakteri 63

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan 65
5.2 Saran..... 65

DAFTAR PUSTAKA 66

LAMPIRAN..... 75



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Indeks Aktivitas Selulase <i>Lactobacillus plantarum</i>	46
-----------	--	----



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Kimia Selulosa	12
Gambar 2.2 Kompleks Enzim Selulase.....	15
Gambar 2.3 Morfologi <i>Lactobacillus plantarum</i>	25
Gambar 4.1 Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Selulase.....	46
Gambar 4.2 Kurva Standar Glukosa	51
Gambar 4.3 Reaksin Glukosa dan DNS.....	52
Gambar 4.4 Kurva Pengaruh Suhu.....	55
Gambar 4.5 Kurva Pengaruh pH.....	59
Gambar 4.6 Kurva Pengaruh Konsentrasi Substrat.....	63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Pembuatan Reagen dan Media	81
Lampiran 2	Penentuan Indeks Aktivitas Selulase secara Kualitatif	84
Lampiran 3	Pembuatan Kurva Standar Glukosa	85
Lampiran 4	Penentuan Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS	88
Lampiran 5	Data Aktivitas Enzim Selulase	89
Lampiran 6	Dokumentasi	92



ABSTRAK

Putri, Syarafina. 2016. Karakterisasi Enzim Selulase yang Dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat. Skripsi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi : Ir. Liliek Harianie AR, M.P. Pembimbing Agama : Dr. Ahmad Barizi, M.A.

Kata Kunci : *L. plantarum*, Aktivitas Enzim Selulase, Karakterisasi

Bakteri asam laktat banyak ditemukan di dalam saluran pencernaan hewan ternak. Selain bertindak sebagai probiotik, spesies bakteri asam laktat yaitu *L. plantarum* dapat menghasilkan enzim selulase yang dapat menghidrolisis selulosa menjadi glukosa sehingga dapat memperbaiki pencernaan serat kasar pada pakan ternak. Karakterisasi enzim selulase dapat membantu mengetahui kondisi optimum enzim saat bekerja. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* yang meliputi suhu, pH dan konsentrasi substrat.

Karakterisasi enzim ditentukan dengan menguji aktivitas enzim pada variasi suhu (35; 45; 55; 65; dan 75) °C; variasi pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; dan 9,0) yang dilakukan pada kondisi suhu optimum hasil perlakuan sebelumnya; dan variasi konsentrasi substrat CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5) % yang dilakukan pada kondisi suhu dan pH optimum hasil perlakuan sebelumnya. Data aktivitas enzim selulase (U/mL) dianalisis secara deskriptif berdasarkan nilai aktivitas enzim selulase yang dihasilkan pada masing-masing perlakuan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *L. plantarum* secara kualitatif terbukti dapat memproduksi enzim selulase berdasarkan pembentukan zona jernih dengan Indeks Aktivitas Selulase (IAS) sebesar 1,98. Secara kuantitatif aktivitas enzim selulase ditentukan berdasarkan kadar gula reduksi yang dihasilkan menggunakan metode DNS. Ekstrak kasar enzim selulase yang diproduksi oleh *L. plantarum* memiliki karakteristik pada suhu 65 °C dengan aktivitas enzim sebesar 0,052 U/mL. pH karakteristik adalah pH 7 dengan aktivitas enzim sebesar 0,054 U/mL. Konsentrasi substrat karakteristik adalah pada konsentrasi substrat 1,5% dengan aktivitas enzim sebesar 0,060 U/mL.

ABSTRACT

Putri, Syarafina. 2016. Characterization of Cellulase Enzyme Produced by *Lactobacillus plantarum* in Various Temperature, pH and Substrate Concentration. Thesis. Department of Biology, Faculty of Science and Technology of the State Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang. Biology Supervisor: Ir. Liliek Harianie AR, M.P. Supervisor Religion: Dr. Ahmad Barizi, M.A

Key Word : *L. plantarum*, cellulase activity, characterization

Lactic acid bacteria mostly found in animals digestive tract. Apart as probiotic, one of lactic acid bacteria species, *Lactobacillus plantarum* can produce cellulase enzymes that can hydrolyze cellulose into glucose which help to improve the ability to digest dietary fibers in animal feed meal. Characterization of cellulase enzyme can help determine the optimum conditions of enzyme. This study aimed to determine the characteristics of cellulase enzymes from *Lactobacillus plantarum* including temperature, pH and substrate concentration.

Characterization of the enzyme was determined by testing the enzyme activity at various temperatures (35, 45, 55, 65, and 75)⁰C; various pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; and 9,0) conducted at optimum temperature from the previous treatment; and various CMC substrate concentrations (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 and 2,5)% conducted under optimum temperature and pH condition from the previous treatments. Cellulase enzyme activity was determined based on reduction sugar level generated using DNS method.

The results of qualitative test showed that *Lactobacillus plantarum* produced cellulase enzyme by showing clear zone with cellulase activity index 1,98. The crude extract of cellulase enzyme produced by *Lactobacillus plantarum* had characteristics of temperature of 65⁰C with enzyme activity of 0.052 Units/mL. characteristic of pH was 7.0 with the enzyme activity 0.054 Units/mL. Characteristic of the substrate concentration was at substrate concentration of 1,5% with the enzyme activity of 0.060 Units/mL.

الملخص

فوتري شرافينا. 2016. توصيف الأنزيمات السيلولوز التي تنتجها لكتوباجيلوس فلانتاروم *Lactobacillus plantarum* على اختلاف درجة الحرارة، ودرجة الحموضة pH وتركيز الركيزة. بحث جامعي، شعبة الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا في جامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرف: ليليك هرياني، الماجستيرة و الدكتور احمد بريزي، الماجستير كلمات الرئيسية: لكتوباجيلوس فلانتاروم ، نشاط انزيم سلولاز ، توصيف الإنزيم بكتيريا حمض اللاكتيك عثر على الجهاز الهضمي للحيوانات المزرعة. بالإضافة إلى القيام بدور بروبيوتيك الأنواع البكتيرية حمض اللاكتيك هو لكتوباجيلوس فلانتاروم يمكن أن تنتج الإنزيمات السيلولوز التي تمكن أن تتحلل السيلولوز إلى جلوكوز، وبالتالي تحسين هضم الألياف الخام في الأعلاف الحيوانية. توصيف الأنزيمات السيلولوز يمكن أن تساعد في تحديد حالة المثلى للإنزيم في العمل. وتهدف هذه الدراسة إلى التعرف على خصائص الإنزيمات السيلولوز التي تنتجها لكتوباجيلوس فلانتاروم والتي تشمل درجة الحرارة، ودرجة الحموضة وتركيز الركيزة.

تم تحديد توصيف الإنزيم عن طريق اختبار نشاط انزيم في اختلاف درجة الحرارة (35؛ 45؛ 55؛ 65؛ و 75) °C. أجريت في درجة الحرارة المثلى نتيجة العلاج السابقة الاختلافات في درجة الحموضة (5.0، 6.0، 7.0، 8.0 و 9.0)؛ والتغيرات في تركيز الركيزة (CMC *Carboxymethyl Cellulose*) (0.5، 1.0، 1.5، 2.0، و 2.5)٪. أداء في ظل ظروف درجة الحرارة ودرجة الحموضة أفضل النتائج من العلاج السابقة. وقد تم تحليل البيانات نشاط انزيم سلولاز (U / ميل لتر) وصفا على أساس نشاط سلولاز أنزيم ينتج في كل معاملة.

وأظهرت النتائج أن لكتوباجيلوس فلانتاروم ثبت نوعيا لإنتاج الإنزيمات سلولاز من خلال تشكيل منطقة واضحة مع مؤشر النشاط سلولاز (IAS) يعني 1،98 تحدد كميا عن طريق خفض السكر المنتجة باستخدام طريقة DNS. استخراج النفط الخام الانزيمات السيلولوز التي تنتجها لها لكتوباجيلوس فلانتاروم خصائصها في 65 °C مع نشاط انزيم 0.052 U / ميل لتر. درجة الحموضة المميزة هي درجة الحموضة 7 مع نشاط انزيم 0054 U / مل. تركيز على خصائص الركيزة هو تركيز الركيزة 1.5٪ مع نشاط انزيم 0.060 U / ميل لتر.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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

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

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

Berdasarkan ayat tersebut, terdapat kata *zarah* yang dalam hal ini dapat diartikan sebagai sesuatu yang berukuran kecil. Di dalam bidang biologi, organisme yang termasuk dalam golongan *zarah* (berukuran kecil) adalah bakteri. Meskipun organisme ini berukuran kecil, namun manfaatnya di dalam kehidupan manusia sangat besar. Al-Quran surat Al-Furqaan (25) ayat 2 juga menjelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi ini dengan ukuran yang serapi-rapinya, termasuk di dalamnya adalah bakteri. Golongan bakteri yang banyak memberikan manfaat dalam kehidupan manusia adalah bakteri asam laktat.

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang banyak ditemukan pada produk fermentasi dan saluran pencernaan hewan ternak (Mulyani, 1996). Di dalam saluran pencernaan hewan ditemukan setidaknya 500 spesies bakteri yang sebagian besar merupakan bakteri asam laktat (Suardana, 2007) dan didominasi oleh genus *Lactobacillus* (Sumarsih dkk., 2009). Secara alami, keberadaan BAL di dalam saluran pencernaan hewan berperan sebagai mikroflora normal. Selain itu, BAL juga mampu bertindak sebagai probiotik dengan karakteristik mampu hidup pada pH rendah, toleransi terhadap garam empedu dan menghasilkan antibiotik serta asam organik. Penelitian Sumarsih dkk. (2012) melaporkan bahwa *L. plantarum* tidak hanya mampu bertindak sebagai probiotik namun juga mampu menghasilkan enzim selulase yang dapat membantu proses pencernaan serat kasar pada pakan ternak.

Potensi *L. plantarum* dalam mendegradasi serat kasar (selulosa) juga sudah banyak dilaporkan. Lamid (2013) melaporkan bahwa penambahan isolat bakteri *L. plantarum* sebanyak 0,3-0,5% mampu menurunkan kandungan selulosa pucuk tebu secara efisien dengan selisih 2,20% dari kandungan selulosa pada perlakuan 0% bakteri *L. plantarum*. Dilaporkan juga dalam penelitian sebelumnya, bahwa *L. plantarum* mampu menurunkan kadar serat pada bekatul sebesar 0,3% setelah 12 jam fermentasi (Zubaidah dkk., 2010). Fermentasi selama 28 hari menggunakan *L. plantarum* juga menurunkan kadar serat kasar tebon jagung sebesar 2,5% (Widodo, 2014) dan serat kasar rumput kalanjana sebesar 2,7% (Purwaningsih, 2015). Aktivitas enzim selulase dari *L. plantarum* yang

diisolasi dari saluran pencernaan mentok juga dilaporkan yaitu sebesar 0,083 U/mL (Rosyada, 2015).

L. plantarum memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim selulase. Hal ini juga telah dijelaskan dalam Al-Quran Surat Al-Hijr (15) ayat 20 yang berbunyi:

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشَةً وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ ﴿٢٠﴾

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

Maksud dari ayat tersebut adalah bahwa dalam penciptaan makhluk-Nya, Allah SWT telah memberikan rezeki kepada masing-masing makhluk yang diciptakan termasuk juga bakteri yang diberikan Allah kemampuan untuk menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri dapat dimanfaatkan untuk membantu memecah sumber karbon selulosa menjadi glukosa selama pertumbuhan bakteri. *L. plantarum* sudah terbukti mampu menghasilkan enzim selulase berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rosyada (2015), namun enzim selulase yang dihasilkan belum dikarakterisasi. Karakterisasi enzim selulase dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu, pH dan konsentrasi substrat optimum untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum*.

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim serta keberadaan inhibitor (Hames dan Hooper, 2005). Suhu dan pH merupakan faktor utama yang harus diketahui (Sari, 2008), karena setiap enzim akan berfungsi secara optimal pada suhu dan pH

tertentu. Di atas suhu optimal, kecepatan reaksi menurun tajam karena enzim merupakan protein yang akan terdenaturasi pada suhu tinggi (Fitriani, 2003). Sedikit pergeseran pH dari pH optimum akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi yang dikatalisis enzim (Murray *et al.*, 2003).

Selain itu, konsentrasi substrat juga mempengaruhi tinggi rendahnya aktivitas enzim. Tingginya konsentrasi substrat akan menyebabkan meningkatnya kecepatan reaksi, namun kecepatan reaksi akan menurun pada batas konsentrasi tertentu (Poedjiadi dan Supriyanti, 1992). Oleh sebab itu, perlu dilakukan penentuan suhu, pH dan konsentrasi substrat optimum untuk aktivitas enzim selulase dari *L. plantarum* sehingga dihasilkan aktivitas enzim selulase yang optimal yang dapat diaplikasikan sebagai bakteri probiotik yang selulolitik yang dapat membantu meningkatkan pencernaan pada pakan ternak.

Penelitian ini bertujuan untuk karakterisasi enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* pada variasi suhu, pH dan konsentrasi substrat. Karakterisasi dilakukan secara bertahap, yaitu dengan tahap pertama pengujian aktivitas enzim selulase berdasarkan parameter suhu. Hasil suhu optimum selanjutnya digunakan untuk mengetahui pH optimum untuk aktivitas enzim selulasenya. Suhu dan pH optimum yang sudah diketahui selanjutnya digunakan untuk menentukan konsentrasi substrat optimum untuk aktivitas enzim selulase dari *L. plantarum*. Hipotesis dari penelitian ini adalah aktivitas enzim selulase akan maksimum saat berada pada kondisi lingkungan optimum yang meliputi suhu, pH dan konsentrasi optimum enzim.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini dipaparkan sebagai berikut :

- 1) Berapa suhu inkubasi optimum untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* ?
- 2) Berapa pH media optimum untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* ?
- 3) Berapa konsentrasi substrat optimum untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* ?

1.3 Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini dipaparkan sebagai berikut :

- 1) Mengetahui suhu inkubasi optimum untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum*.
- 2) Mengetahui pH media optimum untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum*.
- 3) Mengetahui konsentrasi substrat optimum untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini dipaparkan sebagai berikut :

- 1) Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* tinggi pada suhu inkubasi optimum.

- 2) Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* tinggi pada pH media optimum.
- 3) Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* tinggi pada konsentrasi substrat optimum.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

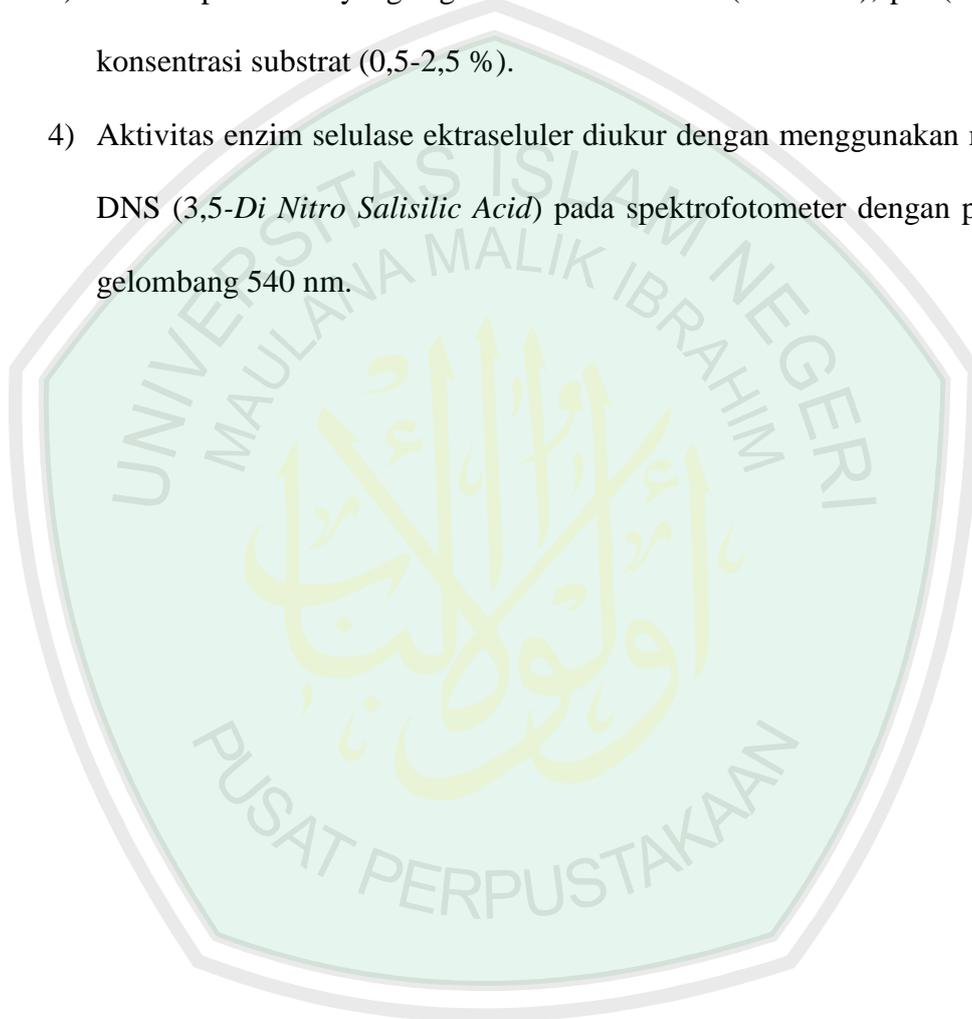
- 1) Memberikan informasi ilmiah mengenai suhu, pH dan konsentrasi substrat optimum untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum*.
- 2) Menambah informasi ilmiah dan pengetahuan dalam bidang industri pakan ternak unggas mengenai potensi *L. plantarum* yang mampu menghasilkan enzim selulase, sehingga berpotensi menjadi kandidat bakteri probiotik yang selulolitik untuk memperbaiki tingkat pencernaan pakan ternak.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1) Isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* yang digunakan dalam penelitian ini adalah koleksi dari FNCC (*Food and Nutrition Culture Collection*) PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan kode isolat FNCC 0020.

- 2) Media yang digunakan untuk produksi dan uji aktivitas enzim selulase adalah media CMC Broth 1% dan untuk uji kualitatif enzim selulase digunakan media CMC Agar 1%.
- 3) Variasi perlakuan yang digunakan adalah suhu (35-75 °C), pH (5-9) dan konsentrasi substrat (0,5-2,5 %).
- 4) Aktivitas enzim selulase ekstraseluler diukur dengan menggunakan metode DNS (*3,5-Di Nitro Salisilic Acid*) pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemanfaatan Limbah dalam Islam

Telah dijelaskan dalam Al-Quran surat Al-A'raaf (7) ayat 56 yang berbunyi:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ ﴿٥٦﴾

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

Maksud dari kalimat “dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya” adalah Allah melarang segala perbuatan yang menimbulkan kerusakan di bumi dan hal-hal yang membahayakan kelestariannya sesudah diperbaiki. Oleh sebab itu, manusia diperintahkan untuk mengelola alam dengan cara melestarikannya dan mengurangi dampak dari limbah yang dihasilkan. Selanjutnya manusia juga diperintahkan untuk berdoa kepada-Nya serta memohon belas kasihan-Nya dengan perasaan takut terhadap siksaan-Nya.

Departemen Agama RI (2010) dalam *Tafsir Kementerian Agama* menjelaskan bahwa Allah melarang manusia agar tidak membuat kerusakan di muka bumi. Larangan membuat kerusakan ini mencakup semua bidang, termasuk

di dalamnya merusak kehidupan dan sumber-sumber penghidupan yaitu pertanian, perdagangan dan lain-lain serta merusak lingkungan. Bumi ini sudah diciptakan Allah dengan segala kelengkapannya, seperti gunung, lembah, sungai, lautan, daratan, hutan dan lain-lain, yang semuanya ditujukan untuk kepentingan manusia agar dapat diolah dan dimanfaatkan dengan sebaik-baiknya untuk kesejahteraan mereka. Oleh sebab itu, manusia dilarang membuat kerusakan di muka bumi.

Utsman (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 baik sedikit ataupun banyak, setelah melakukan perbaikan baik itu sedikit ataupun banyak. Adh-Dhahhak berpendapat bahwa makna dari membuat kerusakan tersebut adalah termasuk menutup sumber air dan menebang pohon. Berdasarkan beberapa tafsir tersebut, maka 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 dijadikan Allah begitu baik dan bagus untuk manusia.

2.2 Bakteri dalam Islam

Bakteri termasuk ke dalam golongan mikroorganisme yang berukuran sangat kecil dan hanya bisa dilihat dengan menggunakan bantuan alat seperti mikroskop. Di dalam Al-Quran, sesuatu yang berukuran kecil disebut dengan kata *zarrah* atau *atom*. Dijelaskan dalam Surat Yunus (10) ayat 61 yang berbunyi:

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ

شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ^ج وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي

السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦١﴾

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

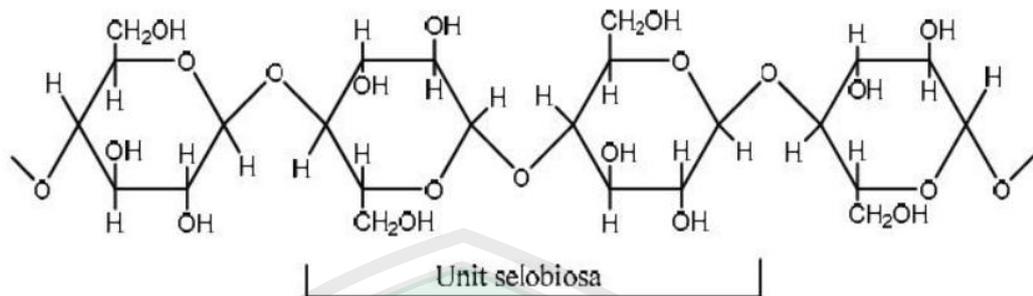
Arti kata *dzarrah* (atom) dalam ayat tersebut adalah segala sesuatu yang ada di bumi ini yang diciptakan Allah dengan ukuran kecil (atom), termasuk di dalamnya benda hidup yang memiliki ukuran sangat kecil yaitu bakteri. Bahreisy (1988) menjelaskan dalam *Tafsir Ibnu Katsir*, bahwa Allah mengetahui tentang semua makhluk-Nya. Tidak ada sesuatu walaupun seberat *zarrah* atau lebih kecil dari itu yang luput dari jangkauan pengetahuannya.

Al-Jazairi (2007) dalam *Tafsir Al-Aisar* menjelaskan bahwa Allah SWT memberitahukan tentang keluasan ilmu dan pengetahuan-Nya atas semua makhluk-Nya. Tidak ada satupun yang luput dari pengetahuan-Nya meskipun sekecil *dzarrah* yaitu semut kecil baik yang ada di muka bumi ini atau yang ada di atas langit, baik sesutau itu lebih kecil lagi daripada semut kecil itu atau lebih besar darinya. Semua itu sudah ada di dalam kitab yang nyata, yaitu *Lauhul Mahfudz*. Musthofa (1942) dalam *Tafsir Al-Maraghi* juga menjelaskan bahwa

yang dimaksud dengan *dzarrah* adalah semut kecil dan segala hal yang menyerupai hal tersebut seperti halnya debu dan juga cahaya matahari. Berdasarkan beberapa tafsir tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa yang dimaksud dengan *zarrah* adalah segala sesuatu yang berukuran kecil yang dapat dilihat dengan mata maupun yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Seperti halnya dengan bakteri yang berukuran kecil dan tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Meskipun ukurannya kecil dan tidak dapat dilihat secara langsung oleh penglihatan manusia, tetapi keberadaannya tidak akan luput dari pengetahuan Allah SWT.

2.3 Selulosa

Selulosa adalah polimer glukosa yang berbentuk rantai linier dan dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glikosidik. Struktur yang linier menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis. Di alam, biasanya selulosa berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan (Holtzaple dkk., 2003). Unit penyusun selulosa adalah selobiosa karena unit keterulangan dalam molekul selulosa adalah 2 unit gula (D-glukosa). Selulosa adalah senyawa yang tidak larut di dalam air dan ditemukan pada dinding sel tumbuhan terutama pada tangkai, batang, dahan, dan semua bagian berkayu dari jaringan tumbuhan (Lehninger, 1993).



Gambar 2.1 Struktur Kimia Selulosa (Lehninger, 1993)

Selulosa tidak pernah ditemukan dalam keadaan murni di alam, tetapi selalu berasosiasi dengan polisakarida lain seperti lignin, pectin, hemiselulosa, dan xilan. Kebanyakan selulosa berasosiasi dengan lignin sehingga sering disebut sebagai lignoselulosa. Di dalam tumbuhan molekul selulosa tersusun dalam bentuk fibril yang terdiri atas beberapa molekul paralel yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik sehingga sulit diuraikan (Fitriani, 2003). Komponen-komponen tersebut dapat diuraikan oleh aktifitas mikroorganisme. Beberapa mikroorganisme mampu menghidrolisis selulosa untuk digunakan sebagai sumber energi, seperti bakteri dan fungi (Sukumaran dkk., 2005).

2.4 Enzim Selulase

Enzim selulase termasuk ke dalam enzim ekstraseluler yaitu enzim yang dihasilkan di dalam sel, tetapi selanjutnya dikeluarkan ke media fermentasi di luar sel untuk mendegradasi senyawa polimer sehingga mudah larut dan dapat diserap melalui dinding sel (Stanbury dan Whitaker, 1984). Enzim selulase mampu mendegradasi selulosa melalui proses katalis yang bekerja secara sinergis untuk melepaskan gula (glukosa) (Santos dkk., 2012). Enzim selulase merupakan enzim kompleks yang terdiri dari tiga tipe enzim yaitu endoglukanase (endo-1,4- β -D-

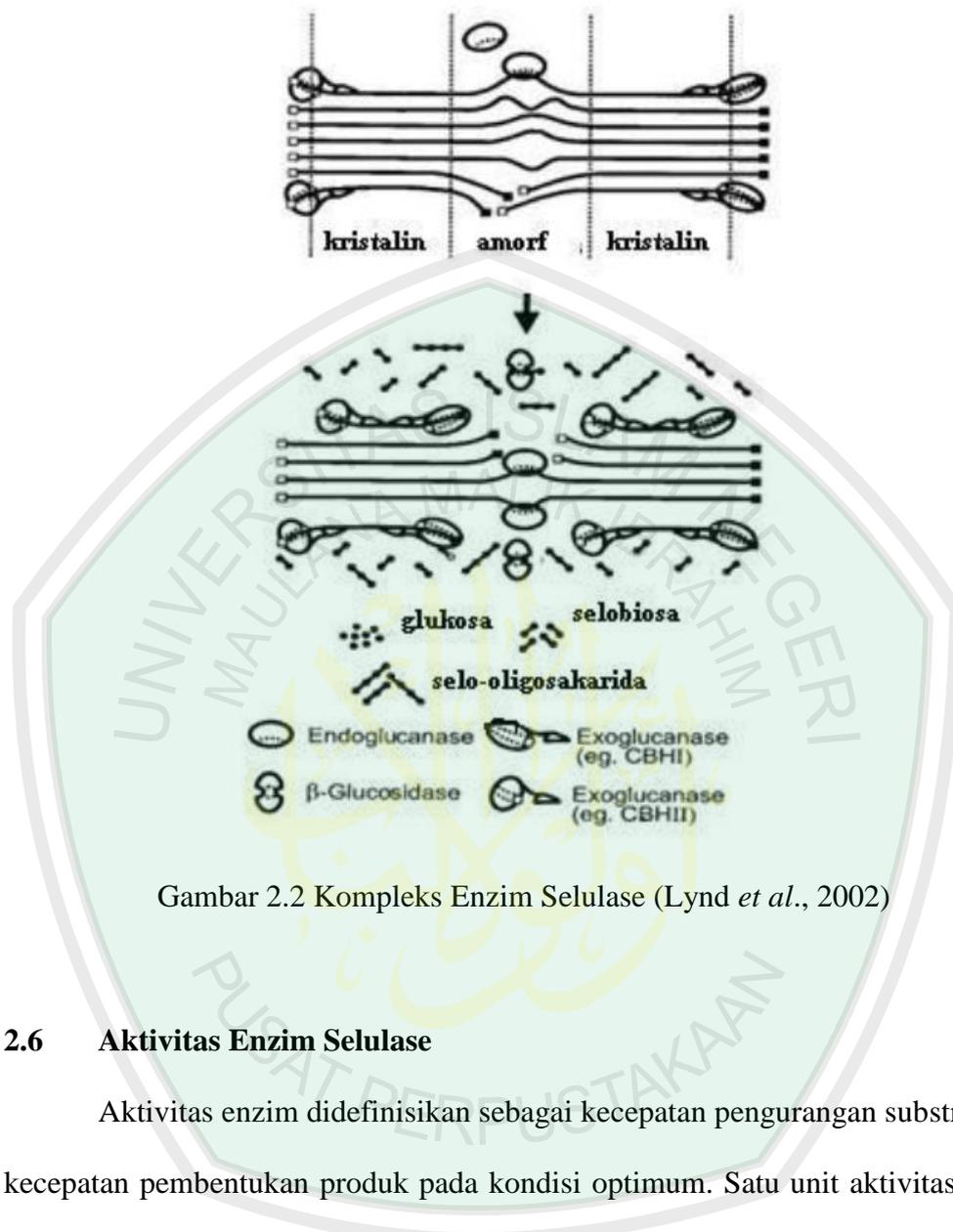
glukanase), eksoglukanase (ekso-1,4- β -D-glukanase) dan selobiase (β -D-glukosidase) (Murashima dkk., 2002). Ketiga komponen enzim tersebut bekerjasama dalam menghidrolisis selulosa yang tidak dapat larut menjadi glukosa (Fikrinda, 2000). Kemampuan enzim selulase dalam mendegradasi selulosa menyebabkan enzim ini semakin dibutuhkan oleh industri yang memproduksi bioetanol dari bahan berselulosa (Sukumaran dkk., 2005).

Enzim selulase dapat diproduksi oleh mikroorganisme seperti fungi dan bakteri. Meskipun aktivitas enzim selulase dari beberapa spesies fungi lebih tinggi, namun bakteri lebih banyak digunakan karena memiliki beberapa kelebihan. Hasibuan (2009) menyebutkan bahwa bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang mampu mendegradasi selulosa dan memiliki kelimpahan terbanyak di alam dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya. Alam dkk. (2004) juga menjelaskan bahwa mikroorganisme penghasil selulase dari kelompok bakteri memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi selulase menjadi lebih pendek. Cendawan diketahui paling baik mendegradasi selulosa, tetapi bakteri menjadi pilihan utama. Hal ini disebabkan karena bakteri memiliki ukuran molekul selulase yang lebih kecil dibandingkan dengan cendawan sehingga lebih mudah untuk berdifusi ke jaringan tumbuhan yang mengandung selulosa (Li dan Gao, 1997 dalam Saropah dkk., 2012).

2.5 Mekanisme Kerja Enzim Selulase

Secara enzimatik, proses degradasi selulosa melibatkan kompleks enzim selulosa spesifik, yaitu endo-1,4- β -D-glukanase (endoselulase atau CMC-ase), ekso-1,4- β -D-glukanase (selobiohidrolase) dan β -glukosidase (selobiase) (Ikram dkk., 2005). Hidrolisis selulosa menjadi glukosa secara konsisten melewati dua tahap penting dalam sistem enzimatik. Tahap pertama yaitu pemecahan ikatan glikosidik pada selulosa menjadi selobiosa oleh β -1,4-glukanase dan tahap kedua yaitu pemecahan ikatan β -1,4-glukosidik pada selobiosa menjadi glukosa oleh β -glukosidase (Fox, 1991). Pada dasarnya mekanisme pemotongan rantai ikatan oleh enzim selulase sangat kompleks karena melibatkan sinergitas kerja 3 komponen besar yaitu (Lynd *et al.*, 2002) :

- 1) Endoglukanase bekerja dengan memotong secara acak pada sisi internal dari rantai selulosa dan menghasilkan oligosakarida dengan panjang rantai yang bervariasi, sehingga dihasilkan ujung rantai baru. Efek yang terjadi adalah panjang rantai polisakarida semakin berkurang dengan cepat dan diikuti peningkatan jumlah gula pereduksi secara bertahap.
- 2) Eksoglukanase berperan dalam memproses ujung reduksi maupun nonreduksi dari rantai polisakarida selulosa dan menghasilkan glukosa (glukanohidrolase) atau selobiosa (selobiohidrolase) sebagai produk utamanya. Efek yang terjadi dari hidrolisis ini yaitu peningkatan jumlah gula pereduksi secara cepat dan secara keseluruhan hanya terjadi sedikit perubahan panjang rantai dalam jangka waktu yang singkat.
- 3) β -glukosidase menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa.



Gambar 2.2 Kompleks Enzim Selulase (Lynd *et al.*, 2002)

2.6 Aktivitas Enzim Selulase

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan satu mikromol gula reduksi (glukosa) setiap menit (Lehninger, 1993). Untuk menentukan aktivitas enzim selulase, dapat dilakukan dengan menggunakan substrat yang spesifik. Enzim endoglukanase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis selulosa secara acak menghasilkan selodekstrin, selobiosa dan glukosa (Gong dan Tsao, 1979). Aktivitas enzim endoglukanase dapat ditentukan dengan menguji

pada substrat CMC (*Carboxymethyl cellulose*), sehingga enzim endoglukanase disebut dengan istilah CMC-ase (Zhang *et al.*, 2006). Aktivitas enzim ini dapat diukur dengan memantau jumlah glukosa pereduksi yang dihasilkannya (Enari, 1983).

Penentuan aktivitas enzim selulase akan sulit apabila filtrat yang akan diukur aktivitas enzimnya merupakan campuran dari berbagai enzim selulase. Enzim-enzim ini tidak hanya dapat menghidrolisis substrat yang sama tetapi juga dapat bekerja secara sinergis memecah substrat yang sama, sehingga menyebabkan aktivitas yang diukur dipengaruhi oleh proporsi dari masing-masing enzim yang ada (Enari, 1983). Penggunaan substrat CMC sebagai media dalam penelitian ini dimaksudkan untuk mengukur aktivitas enzim endoglukanase, dimana enzim ini merupakan enzim yang berperan dalam proses awal pemecahan selulosa murni berbentuk amorf. Enzim ini bekerja pada rantai dalam CMC menghasilkan oligosakarida atau rantai selulosa yang lebih pendek (Lynd *et al.*, 2002).

2.7 Penentuan Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS

Aktivitas enzim selulase dihitung berdasarkan data kadar glukosa relatif sebagai 1 mg glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL filtrate kasar selulase. Satu Unit aktifitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya 1 μmol glukosa yang dihasilkan dari hidrolisa media oleh 1 mL ekstrak kasar enzim selulase selama masa inkubasi. Untuk melihat besarnya satu unit aktifitas enzim tersebut digunakan rumus (Kombong, 2004) :

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

Keterangan :

AE = Aktivitas Enzim (Unit/mL)

C = Konsentrasi Glukosa

BM = Berat Molekul Glukosa (180 g/mol)

t = Waktu Inkubasi (menit)

H = Volume Total Enzim-Substrat (mL)

E = Volume Enzim (mL)

Metode kuantitatif yang digunakan dalam uji aktivitas selulase adalah dengan mengamati kadar gula tereduksi yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim terhadap substrat. Dari berbagai cara uji aktivitas enzim selulase yang paling sering digunakan dalam penelitian adalah dengan menggunakan metode *Dinitrosalisilic Acid* (DNS (Miller, 1959) atau Somogy-Nelson (Somogy, 1952). Pada penelitian ini digunakan metode DNS karena penggunaan pereaksi DNS untuk mengukur gula reduksi yang diproduksi oleh mikroba memiliki tingkat ketelitian yang tinggi sehingga dapat diaplikasikan pada gula dengan kadar kecil sekalipun. Namun, reagen DNS akan mengalami ketidakstabilan apabila terjadi kontak langsung dengan cahaya. Hal ini bisa diatasi dengan menjaga penyimpanan reagen DNS agar terhindar dari kontak langsung dengan cahaya (Kodri dkk., 2013).

2.8 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim Selulase

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain suhu, pH, konsentrasi substrat dan enzim serta keberadaan inhibitor (Hames dan Hooper, 2005). Berikut akan dijelaskan secara rinci mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim sebagai berikut:

1) Suhu

Faktor suhu dapat mempengaruhi reaksi yang dikatalisis oleh enzim melalui dua cara. Pertama, kenaikan suhu dapat meningkatkan energi termal molekul substrat. Kenaikan ini akan menghasilkan sejumlah energi yang dapat melebihi energi aktivasi dan meningkatkan tingkat reaksi. Kedua, kenaikan suhu akan mengubah struktur protein yang menyusun enzim sehingga terjadi pemutusan interaksi nonkovalen (ikatan hidrogen, gaya van der Waals dan interaksi lainnya) yang menopang struktur tiga dimensi enzim (Hames dan Hooper, 2005).

Peningkatan suhu eksternal secara umum akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia enzim, tetapi kenaikan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim yaitu berubahnya struktur protein enzim, terutama perubahan pada ikatan ionik dan ikatan hidrogennya sehingga menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim tersebut (Saropah dkk., 2012). Energi panas yang terlalu tinggi dapat meningkatkan kinetika enzim untuk mencapai titik yang dapat melampaui batas energi yang diperlukan untuk merusak ikatan kovalen yang menyusun struktur tiga dimensi enzim. Akibatnya, rantai polipeptida menjadi tidak terlipat (*unfolding*) atau terdenaturasi dan disertai

dengan penurunan aktivitas katalitik secara drastis. Suatu enzim dapat tetap stabil pada rentang suhu tertentu (Murray *et al.*, 2003). Suhu untuk aktivitas enzim CMC-ase berada pada kisaran suhu inkubasi 35-80 °C (Fitriani, 2003).

2) pH

Faktor pH sangat berpengaruh terhadap struktur dan aktivitas biologis enzim. Interaksi ionik yang terjadi di dalam strukturnya, akan menstabilkan enzim dan memungkinkan enzim untuk mengenali dan berikatan dengan substratnya (Nelson dan Cox, 2005). Karakteristik pH yang menunjukkan aktivitas katalitik maksimum disebut pH optimum. Sedikit perubahan pH akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi yang dikatalis enzim. Perubahan pH akan menyebabkan denaturasi pada protein penyusun enzim itu sendiri. pH untuk aktivitas enzim selulase adalah 5,5-8,0 (Murray *et al.*, 2003).

Konsentrasi ion hidrogen, yaitu keasaman atau kebasaan larutan sangat mempengaruhi aktivitas suatu enzim. Hal ini disebabkan karena asam amino yang merupakan pusat aktif enzim harus berada dalam keadaan ionisasi yang tetap agar menjadi aktif. Setiap enzim memiliki pH maksimum, optimum dan minimum. Nilai-nilai pH tersebut bervariasi dengan suhu, tipe dan konsentrasi substrat, tipe larutan penyangga (*buffer*), ada atau tidaknya senyawa penghambat atau pengaktif dan waktu yang dibutuhkan enzim tersebut bekerja (Salle, 1974).

3) Konsentrasi Substrat

Konsentrasi substrat pada tahap awal reaksi mencerminkan kenaikan yang proporsional terhadap kecepatan reaksi. Saat sisi aktif pada enzim mulai berikatan dengan substrat maka kecepatan maksimum reaksi akan tercapai. Saat titik ini

telah tercapai, penambahan substrat berikutnya tidak akan mempengaruhi tingkat reaksi. Hal ini disebabkan oleh seluruh sisi aktif enzim telah jenuh atau dipakai untuk mengikat molekul substrat (Nelson dan Cox, 2005).

Semakin tinggi konsentrasi substrat mungkin dapat meningkatkan atau mengurangi kecepatan suatu reaksi enzimatik. Jika konsentrasi substrat jumlahnya lebih sedikit daripada jumlah enzim maka suatu peningkatan kandungan substrat akan meningkatkan kecepatan reaksi. Laju aktivitas enzim akan meningkat dengan meningkatnya kadar substrat sampai suatu titik tertentu. Ketika enzim jenuh dengan substrat, maka penambahan kadar substrat tidak akan berpengaruh pada kecepatan reaksi (Volk dan Wheeler, 1988).

4) Konsentrasi Enzim

Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 2006). Semakin tinggi konsentrasi enzim maka kecepatan reaksi akan meningkat hingga batas konsentrasi tertentu. Namun, hidrolisis substrat akan konstan dengan naiknya konsentrasi enzim. Hal ini disebabkan karena penambahan enzim sudah tidak efektif lagi (Reed, 1975).

5) Inhibitor Enzim

Inhibitor enzim merupakan molekul yang dapat mengganggu katalisis baik dengan cara memperlambat maupun menghentikan reaksi enzimatik (Nelson dan Cox, 2005). Terdapat dua tipe inhibisi enzim yaitu reversible dan irreversible. Inhibisi reversible dapat dibagi menjadi dua yaitu inhibitor kompetitif dan

nonkompetitif. Inhibitor kompetitif memiliki struktur yang menyerupai substrat dan akan bersaing dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif enzim. Akibatnya, kompetisi yang terjadi akan bergantung pada konsentrasi substrat dan inhibitor. Tidak semua inhibitor enzim bekerja dengan memperebutkan sisi aktif enzim, inhibitor nonkompetitif bekerja dengan cara berikatan pada bagian enzim sehingga mengubah konformasi tiga dimensi protein penyusun enzim. (Sari, 2010).

Inhibisi irreversible terjadi akibat adanya ikatan kovalen yang kuat antara inhibitor dan residu asam amino pada enzim. Akibatnya, inhibitor secara efektif merusak gugus fungsional pada enzim yang esensial bagi aktivitas enzim. Pembentukan ikatan kovalen antara inhibitor irreversible dan enzim lazim terjadi. Inhibitor jenis ini banyak digunakan untuk mempelajari mekanisme suatu reaksi. Asam amino dengan fungsi katalitik pada sisi aktif enzim dapat diidentifikasi dengan menentukan residu mana yang secara kovalen berhubungan dengan inhibitor setelah enzim dinaktivasi (Sari, 2010).

Beberapa senyawa logam dan senyawa lainnya yang dapat menghambat aktivitas selulase adalah Hg^{2+} , Ag^{2+} dan Cu^{2+} (Oikawa *et al.*, 1994), glukanolakton (Kulp, 1975), surfaktan, senyawa pengkelat khususnya *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (EDTA) (Oikawa *et al.*, 1994) dan etanol serta alkohol (Ooshima *et al.*, 1985). Senyawa penghambat tersebut dapat menekan seluruh kecepatan hidrolisis dengan menghambat adsorpsi eksoglukanase dan endoglukanase pada selulosa dan menghambat aksi sinergis eksoglukanase dan endoglukanase yang bekerja pada permukaan selulosa.

6) Aktivator Enzim

Beberapa substansi yang dapat memulihkan aktivitas enzim disebut dengan aktivator. Adanya aktivator enzim dapat mempermudah enzim berikatan dengan substratnya. Jika aktivator berikatan dengan enzim maka akan menyebabkan kenaikan kecepatan reaksi enzim (Whittaker, 1994). Komponen kimia yang membentuk enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Fe, Ca, Mn, Mg, Cu atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut dengan koenzim (Martoharsono, 1997).

7) Waktu Kontak

Waktu kontak atau reaksi antara enzim dan substrat mempengaruhi efektivitas kerja enzim. Semakin lama waktu reaksi maka kerja enzim juga akan semakin optimum (Azis, 2012).

8) Produk Akhir

Reaksi enzimatik selalu melibatkan dua hal, yaitu substrat dan produk akhir. Dalam beberapa hal, produk akhir juga dapat menurunkan produktivitas kerja enzim (Azis, 2012). Selobiosa dan glukosa merupakan produk akhir hasil hidrolisis enzim selulosa yang dapat menghambat kerja enzim. Hal ini disebabkan karena selobiosa dan glukosa adalah inhibitor dalam proses degradasi (Ahmed *et al.*, 2001).

2.9 Morfologi dan Karakteristik *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum merupakan bakteri asam laktat yang dapat hidup pada media MRS (Wahyudi dan Samsundari, 2008). Dalam media, *L. plantarum* membentuk

koloni berukuran 2-3 mm, berwarna putih dan dikenal sebagai bakteri pembentuk asam laktat. Selnya berbentuk batang dengan ukuran (0,5-1,5 s/d 1,0-10 μm) dan tidak bergerak (non motil) (Kuswanto dan Sudarmadji, 1988). *L. plantarum* berbentuk batang dan sering membentuk pasangan serta rantai pendek dari sel-selnya. Sel tidak berspora dan berwarna ungu pada uji pengecatan gram (Ernawati, 2010).

Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 15-45 $^{\circ}\text{C}$ dengan pH paling rendah 3,2. Habitatnya banyak ditemukan pada saluran pencernaan manusia maupun hewan serta di beberapa produk makanan. Dengan temperatur optimal, *L. plantarum* mampu merombak senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan hasil akhir berupa asam laktat (Lamid, 2013). Bakteri ini merupakan anggota dari genus *Lactobacillus*, banyak ditemukan pada makanan fermentasi (Buckle *et al.*, 1987).

Menurut Holt *et al.* (2000), klasifikasi bakteri *L. plantarum* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bakteria
Divisi : Firmicutes
Kelas : Bacili
Ordo : Lactobacillales
Famili : Lactobacillaceae
Genus : Lactobacillus
Spesies : *Lactobacillus plantarum*

Berdasarkan tipe fermentasinya *L. plantarum* termasuk ke dalam bakteri asam laktat heterofermentatif, karena gula yang difermentasikan menghasilkan asam laktat, etanol, asam sitrat dan karbonidoksida pada kondisi tertentu (Kleerebezem *et al.*, 2003). Namun terdapat beberapa perbedaan dalam penggolongan *L. plantarum* berdasarkan tipe fermentasinya, seperti yang dikemukakan oleh Rosyada (2015), bahwa *L. plantarum* yang berhasil diisolasi dari saluran pencernaan mentok merupakan bakteri homofermentatif karena tidak menghasilkan gelembung gas pada uji produksi gas. Selain itu, menurut Axselsson (2004) *L. plantarum* merupakan bakteri heterofermentatif fakultatif, yaitu memfermentasikan heksosa secara homofermentatif namun sebagian galur pada beberapa kondisi mempunyai metabolisme heterofermentatif dari heksosa menjadi asam laktat, karbondioksida dan etanol atau asam asetat.



Gambar 2.3 Morfologi *L. Plantarum*

2.10 Potensi Bakteri Asam Laktat sebagai Penghasil Enzim Selulase

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang berperan penting dalam proses fermentasi minuman dan makanan. BAL tidak hanya menghasilkan asam laktat dan bakteriosin, namun juga menghasilkan senyawa

tertentu yang dapat memperbaiki tekstur produk fermentasi (Ernest dkk., 1986). Krabi *et all.*, (2015) melaporkan bahwa selama proses fermentasi singkong, bakteri asam laktat memproduksi beberapa enzim ekstraseluler yaitu 22,67% enzim amilase, 2,67% enzim pektinase, 8% enzim β -glukosidase dan 5,33% enzim selulase.

Enzim selulase yang dihasilkan oleh kelompok BAL dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan pencernaan pada pakan ternak unggas. Walter dan Kohler (1978) menjelaskan bahwa beberapa kelompok mikroorganisme dilaporkan mampu mendegradasi selulosa seperti mikroba penghasil asam laktat yang mampu menghasilkan enzim selulase yang membantu proses pencernaan. Enzim ini mampu memecah serat kasar yang merupakan komponen yang sulit dicerna dalam saluran pencernaan unggas.

Aplikasi enzim selulase pada pakan unggas dapat dilakukan melalui proses fermentasi pakan oleh BAL yang memiliki aktivitas selulolitik seperti *Lactobacillus* (Sumarsih dkk., 2012) dan *Enterococcus casseliflavus* (Wibawa dkk., 2012). Proses fermentasi dapat menurunkan kandungan serat kasar serta meningkatkan kandungan protein kasar dan ketersediaan atau daya cerna nutrisi dari bahan pakan (Sinurat dkk., 1993). Peningkatan nilai bahan pakan ini dapat digunakan sebagai pakan ternak yang berkualitas baik (Sinurat dkk., 1995).

2.11 Aktivitas Enzim Selulase dari *Lactobacillus plantarum*

Sejumlah mikroba probiotik menghasilkan senyawa atau zat-zat yang diperlukan untuk membantu proses pencernaan substrat bahan makanan tertentu

dalam saluran pencernaan, senyawa tersebut adalah enzim. Mikroba-mikroba probiotik penghasil asam laktat dari spesies *Lactobacillus* menghasilkan enzim selulase yang membantu proses pencernaan. Enzim ini mampu memecah molekul-molekul kompleks menjadi molekul sederhana akan mempermudah pencernaan lanjutan dan penyerapan oleh saluran pencernaan hewan. Di sisi lain, mikroorganisme pelaku pemecah ini mendapat keuntungan berupa energi yang diperoleh dari hasil perombakan molekul kompleks tersebut (Effendi, 2002).

Aktivitas enzim selulase dari genus *Lactobacillus* dilaporkan dalam penelitian Jennifer dan Thiruneelakandan (2015). 5 isolat bakteri *Lactobacillus* sp. yang berhasil diisolasi dari perairan di wilayah India, menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas yang berbeda-beda. Waktu inkubasi selama 48 jam menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu sebesar 4,098. Selanjutnya penggunaan variasi pH juga menghasilkan aktivitas enzim selulase yang berbeda, dimana pH 9 menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu sebesar 0,178.

Kemampuan spesies bakteri *Lactobacillus plantarum* dalam menghasilkan enzim selulase didukung dengan adanya hasil penelitian mengenai aktivitas enzim selulase dari bakteri ini. Rosyada (2015) melaporkan bahwa, isolat *Labctobacillus plantarum* yang berhasil diisolasi dari saluran pencernaan mentok, memiliki aktivitas enzim selulase sebesar 0,083 U/mL. Bakteri ini mampu mendegradasi substrat CMC dengan diameter zona bening yang dihasilkan pada saat uji kualitatif yaitu sebesar 2,33 cm. Aktivitas enzim selulase maksimum dicapai dengan waktu inkubasi selama 24-48 jam yaitu pada saat fase stasioner. Berdasarkan jenis substrat yang didegradasi, maka aktivitas enzim selulase yang

dimiliki oleh isolat *L. plantarum* ini merupakan enzim endoglukanase atau enzim CMC-ase.

Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* yang diisolasi dari usus halus itik Mojosari (*Anas platyrinchas*) berpotensi untuk diaplikasikan sebagai isolat bakteri probiotik selulolitik pada pakan ternak unggas. Selain sebagai probiotik, *Lactobacillus plantarum* yang memiliki aktivitas selulolitik juga mampu menghasilkan enzim selulase yang dapat meningkatkan nilai pencernaan serat kasar, sehingga energi yang dihasilkan lebih besar. Adanya peningkatan pencernaan serat kasar akan berpengaruh terhadap berat badan ternak sehingga dapat meningkatkan bobot hewan ternak (Muwakhid dkk., 2013).

2.12 Potensi *Lactobacillus plantarum* dalam Mendegradasi Serat

Lactobacillus plantarum dilaporkan dapat menurunkan kadar serat kasar pada bekatul. Selama fermentasi pada media bekatul, terjadi penurunan kadar serat kasar sejalan dengan total kenaikan BAL, diduga semakin meningkat jumlah BAL semakin banyak BAL yang memanfaatkan serat untuk metabolisme sel (Zubaidah dkk., 2012). Dilaporkan dalam penelitian sebelumnya, bahwa *L. plantarum* mampu menurunkan kadar serat pada bekatul sebesar 0,3 % setelah 12 jam fermentasi. Bakteri asam laktat memanfaatkan serat untuk metabolisme sel. Serat kasar tersebut dihidrolisis menjadi senyawa sederhana selanjutnya difermentasi oleh BAL melalui glikolisis menjadi asam piruvat dan akhirnya menghasilkan asam lemak rantai pendek (Zubaidah dkk., 2010).

Selama fermentasi, bakteri asam laktat akan memanfaatkan nutrisi seperti karbohidrat, protein dan serat pangan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan, pembentukan sel dan biosintesa produk-produk metabolit (Zubaidah dkk., 2010; 2012). Karppinen (2003) menjelaskan bahwa serat kasar dapat difermentasi oleh bakteri asam laktat meskipun kecepatan fermentasinya lebih lambat dari pada serat pangan larut. Hal ini disebabkan karena keterbatasan enzim hidrolitik pemecah serat pangan tidak larut.

Penambahan bakteri *Lactobacillus plantarum* sebanyak 0,3-0,5% mampu menurunkan kandungan selulosa pucuk tebu secara efisien dengan selisih 2,20% dari kandungan serat kasar pada perlakuan 0% bakteri *L.plantarum* (Lamid, 2013). Waren (1996) menjelaskan bahwa mikroorganisme sangat efisien dalam mendegradasi pati, kitin dan polisakarida dinding sel tanaman. McDonald *et al.* (2004) menambahkan bahwa bakteri dapat berkembang dengan menggunakan isi sel tanaman maupun karbohidrat terlarut sebagai media tumbuhnya. Hal ini karena mikroorganisme menghasilkan enzim yang dapat mencerna komponen polisakarida yaitu selulosa dan hemiselulosa menjadi karbohidrat sederhana.

Penggunaan inokulum bakteri epifit *Lactobacillus plantarum* yang berasal dari rumput gajah untuk fermentasi silase yang terdiri dari sisa tanaman padi, ampas tahu dan onggok mampu menurunkan kandungan serat kasar pada bahan sebesar 1,7%. Hal ini disebabkan karena adanya aktivitas enzim selulase dan hemiselulase selama proses ensilase. Adanya penurunan kandungan serat kasar pada silase memberi keuntungan pada peningkatan kualitas silase karena dapat meningkatkan nilai pencernaan (Santoso dkk., 2011).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 3 faktor perlakuan dan 5 kali ulangan. Faktor pertama adalah suhu inkubasi yang terdiri dari 5 taraf perlakuan yaitu (S1= 35 °C, S2= 45 °C, S3= 55 °C, S4= 65 °C dan S5= 75 °C) sedangkan faktor kedua adalah pH yang terdiri dari 5 taraf perlakuan yaitu (P1= 5, P2= 6, P3= 7, P4= 8 dan P5= 9), dan faktor ketiga adalah konsentrasi substrat CMC yang terdiri dari 5 taraf perlakuan yaitu (C1= 0,5%, C2= 1%, C3= 1,5%, C4= 2% dan C5= 2,5%).

Penelitian dilakukan melalui 3 tahap, yaitu faktor pertama terlebih dahulu yang terdiri dari 5 perlakuan variasi suhu inkubasi. Data hasil suhu inkubasi optimum dengan aktivitas enzim selulase tertinggi selanjutnya digunakan sebagai suhu inkubasi pada faktor kedua yaitu dengan 5 perlakuan pH. Hasil suhu dan pH optimum kemudian digunakan untuk faktor ketiga yaitu konsentrasi substrat. Sehingga diperoleh aktivitas enzim selulase ekstraseluler pada suhu inkubasi, pH dan konsentrasi substrat optimum.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Juni 2016 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian dalam penelitian ini dipaparkan sebagai berikut :

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini terdiri dari perlakuan suhu (35 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C dan 75 °C), perlakuan pH (5, 6, 7, 8 dan 9) dan perlakuan konsentrasi substrat CMC (0,5%, 1%, 1,5%, 2% dan 2,5%).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pengukuran aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum*.

3.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini terdiri dari jenis spesies dan jumlah inokulum bakteri yang digunakan.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator, *shaker incubator*, refrigerator, freezer, autoklaf, *hot plate*, *vortex mixer*, mikropipet, timbangan analitik, spektrofotometer, jangka sorong, sentrifuge dingin, kuvet, *water bath* dan peralatan laboratorium mikrobiologi pada umumnya seperti *beaker glass*, erlenmeyer, gelas ukur, cawan petri, gelas benda dan penutup, tip, tube, bunsen, korek api, kawat ose, cawan, tabung reaksi dan rak tabung reaksi.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* kode FNCC 0020, media *De Mann rogosa shape agar* (MRSA), media *De Mann rogosa shape Broth* (MRSB), media *Carboxymethyle Cellulose* (CMC) agar 1%, media CMC Broth 1%, larutan NaCl 1 M, pewarna *congo red* 0,1 %, reagen *dinitrosalicylic acid* (DNS), KNa-tartrat, buffer sitrat 0,05 M pH 5, buffer sitrat fosfat 0,05 M pH 6 dan 7, buffer fosfat 0,05 M pH 7, buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8 dan 9, larutan kristal violet, safranin, iodium, aluminium foil, plastik wrap dan kertas cakram.

3.5 Prosedur Penelitian

Prosedur dalam penelitian ini dipaparkan sebagai berikut :

3.5.1 Pembuatan Media

3.5.1.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan cara sterilisasi fisik menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit (Purwaningsih, 2014).

3.5.1.2 Media MRS Agar dan MRS Broth

Pembuatan media MRS Agar dilakukan dengan cara ditimbang MRS Agar sebanyak 6,28 gram dilarutkan dengan aquades sebanyak 100 mL. Sedangkan media MRS Broth ditimbang sebanyak 5,15 gram dalam 100 mL aquades. Masing-masing media dipanaskan sampai mendidih di atas *hot plate* dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Selanjutnya dimasukkan ke dalam

erlenmeyer dan ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.5.1.3 Media CMC Agar dan *Broth*

Media CMC Agar 1% terdiri dari 1 g CMC; 0,02 g MgSO₄7H₂O; 0,075 g KNO₃; 0,05 g K₂HPO₄; 0,002 g FeSO₄7H₂O; 0,004 g CaCl₂H₂O; 0,2 g ekstrak khamir, 1,5 g agar-agar bakto dan 0,1 g glukosa. Semua bahan dimasukkan ke dalam beaker gelas 250 mL dan ditambahkan dengan aquades sebanyak 100 mL, dipanaskan sampai mendidih di atas *hot plate* dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media CMC Cair (*Broth*) dibuat dengan komposisi yang sama dengan media CMC Agar, tanpa penambahan agar-agar bakto (Meryandini *et al.*, 2009).

3.5.2 Uji Pendahuluan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Genus *Lactobacillus*

3.5.2.1 Pengamatan Makroskopis

Pengamatan makroskopis dilakukan dengan cara mengamati warna, bentuk dan permukaan koloni. Koloni *Lactobacillus* berwarna putih susu mengkilat, bentuk koloni bulat rata dan tidak berserat (Holdeman dan Gato, 1977). Dalam media agar, *Lactobacillus plantarum* membentuk koloni berukuran 2-3 mm (Kuswanto dan Sudarmaji, 1988).

3.5.2.2 Pengamatan Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis bakteri asam laktat dilakukan dengan uji pengecatan gram, uji pewarnaan endospora dan uji katalase sebagai berikut :

1) Pengecatan Gram

Pengecatan gram dilakukan pada kultur bakteri umur 24 jam yang ditumbuhkan pada media MRS Agar (Suryani dkk., 2010). Sebanyak satu ose isolat BAL digoreskan pada gelas benda dan ditambahkan 1 tetes larutan Kristal violet. Preparat dibiarkan selama 1 menit dan dicuci dengan akuades. Sebanyak 1 tetes larutan iodium ditambahkan ke dalam preparat, dibiarkan selama 2 menit dan dibilas dengan akuades. Preparat dicuci ulang menggunakan etanol 96% dan dibilas pada air mengalir. Selanjutnya ditambahkan safranin dan dibilas pada air yang mengalir. Preparat dikeringkan dan diamati dengan menggunakan mikroskop komputer. Warna ungu menunjukkan sel bakteri merupakan gram positif (Sari dkk., 2012). *Lactobacillus* bersifat Gram positif atau berwarna ungu (Sutrisna, 2013).

2) Uji Endospora

Preparat ulas dibuat pada gelas benda, difiksasi di atas api bunsen. Selanjutnya preparat ditetesi dengan malachite hijau dan diuapkan di atas penangas air selama 2-3 menit, setelah dingin dicuci dengan aquades. Preparat ditetesi dengan menggunakan safranin, didiamkan selama 60 detik kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan hati-hati. Preparat diamati dengan mikroskop, uji positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau (Lay, 1994).

3) Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan mengambil satu ose aquades dan ditetkan pada gelas benda, lalu ditambahkan dengan satu ose isolat bakteri dan diratakan. Selanjutnya ditetesi dengan cairan H₂O₂ 3% sebanyak 2-3 tetes. Hasil uji akan bernilai negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung udara yang menandakan bahwa koloni tersebut merupakan koloni BAL (Suryani dkk., 2010).

3.5.3 Pengujian Aktivitas Selulase secara Kualitatif

Penentuan aktivitas enzim selulase secara kualitatif dilakukan dengan mengamati zona jernih pada media CMC Agar. Sebanyak 10 µL isolat BAL (umur 18 jam) ditumbuhkan dengan cara tetes di atas *paper disk* yang diletakkan di atas media CMC Agar kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Setelah diinkubasi, cawan tersebut direndam dengan larutan *congo red* selama 20 menit lalu dicuci dengan NaCl 1 M. Zona jernih yang terbentuk disekitar koloni pada *paper disk* diamati dan diukur diameter zona jernihnya dengan menggunakan jangka sorong. Zona jernih yang terbentuk menandakan bahwa isolat BAL tersebut mampu menghasilkan enzim selulase ekstraseluler (Rosyada, 2015).

Secara kualitatif, besarnya aktivitas selulase dapat dinyatakan sebagai indeks selulolitik atau Indeks Aktivitas Selulase (IAS) yang diperoleh dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Kader dan Omar, 1998) :

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

Keterangan :

A = diameter zona bening (mm)

B = diameter koloni (mm)

3.5.4 Peremajaan Isolat Bakteri

Diambil satu ose biakan murni bakteri *Lactobacillus plantarum* kemudian diinokulasikan ke dalam media MRS Broth 10 mL. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Nurani dkk., 2013).

3.5.5 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Bakteri yang sudah diremajakan diinokulasikan sebanyak 1 mL ke dalam 100 mL CMC Broth 1% diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37 °C (Sari, 2010), selama 24 jam (Rosyada, 2015). Ekstrak kasar enzim selulase diperoleh dengan sentrifugasi dingin kultur bakteri pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Filtrat dipisahkan dari supernatant dan supernatan diambil sebagai hasil ekstrak kasar enzim selulase (Jennifer dan Thiruneelakandan, 2015). Ekstrak kasar enzim selulase selanjutnya diuji aktivitas enzimnya dengan metode DNS.

3.5.6 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Pembuatan larutan standar glukosa dilakukan dengan cara membuat larutan stok glukosa standar dengan konsentrasi 5000 ppm. Sebanyak 0,5 gram glukosa ditimbang dan dilarutkan dengan aquades dan ditera sampai 100 mL dalam labu ukur (Mukminin, 2015). Kemudian larutan stok tersebut diencerkan dengan konsentrasi 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 dan 225 ppm (Rosyada, 2015).

3.5.7 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan standar glukosa dibuat dengan konsentrasi 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 dan 225 ppm. Selanjutnya, diambil sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan 1 mL reagen DNS dan dihomogenkan. Mulut tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 mL KNa-tartrat dan didinginkan. Ditambahkan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Absorbansi tiap larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada $(\lambda) = 540 \text{ nm}$ (Miller, 1959). Setelah diperoleh kurva standar glukosa, persamaan garis $y = ax + b$ digunakan untuk mengetahui konsentrasi glukosa (x) dari sampel yang akan diukur absorbansinya (Rosyada, 2015).

3.5.8 Pengujian Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS

Pengujian aktivitas selulase secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan reagen 3,5-Di Nitro Salisilic Acid (DNS) berdasarkan estimasi jumlah gula reduksi yang dihasilkan dari media CMC 1%. Sebanyak 1 mL media CMC 1% ditambahkan dengan 1 mL ekstrak kasar enzim selulase dan dimasukkan ke dalam tabung. Kemudian diinkubasi pada suhu 55 °C selama 15 menit dengan *waterbath*. Sebanyak 1 mL reagen DNS ditambahkan untuk menghentikan reaksi dan dididihkan dalam *waterbath* pada suhu 100 °C selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan dengan 1 mL KNa-tartrat. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Jumlah gula reduksi yang dilepaskan ditentukan dengan pengukuran spektrofotometer panjang gelombang 540 nm (Jennifer dan Thiruneelakandan, 2015). Sampel merupakan reaksi substrat dan enzim dengan perlakuan inkubasi, kemudian ditambahkan dengan DNS. Kontrol merupakan campuran antara substrat dan enzim tanpa inkubasi yang kemudian ditambahkan dengan DNS. Sedangkan blanko merupakan campuran antara substrat, DNS dan akuades (Maranatha, 2008).

Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan pada kurva standar pada prosedur sebelumnya untuk mengetahui konsentrasi produk glukosa pada sampel. Satu unit aktivitas enzim selulase dinyatakan sebagai jumlah μmol produk glukosa hasil hidrolisis enzim selulase tiap satu menit pada kondisi pengujian. Nilai aktivitas selulase ditentukan berdasarkan perhitungan sebagai berikut (Kombong, 2004) :

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

Keterangan :

AE = Aktivitas Enzim (Unit/mL)

C = Konsentrasi Glukosa

BM = Berat Molekul Glukosa (180 g/mol)

t = Waktu Inkubasi (menit)

H = Volume Total Enzim-Substrat (mL)

E = Volume Enzim (mL)

3.5.9 Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Karakterisasi ekstrak kasar enzim selulase dilakukan dengan mereaksikan ekstrak kasar enzim selulase pada variasi suhu, pH dan konsentrasi substrat secara bertahap dengan prosedur sebagai berikut :

3.5.9.1 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Selulase

Penentuan suhu optimum enzim dilakukan dengan cara mereaksikan 1 mL enzim dengan 1 mL substrat pada suhu sesuai perlakuan yaitu 35-75 °C dalam buffer fosfat 0,05 M pH 7,0 dan diinkubasi dalam *waterbath* selama 30 menit. Suhu optimum yang didapatkan digunakan untuk menentukan pH optimum selulase (Sari, 2010). Aktivitas enzim selulase diukur dengan metode DNS sesuai dengan prosedur sebelumnya.

3.5.9.2 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Selulase

Penentuan pH optimum enzim dilakukan dengan mereaksikan ekstrak kasar enzim dengan substrat CMC 1% pada suhu optimum dan sesuai pH perlakuan dan diinkubasi dalam *waterbath* selama 30 menit (Sari, 2010). Variasi pH dilakukan dengan penambahan buffer sitrat 0,05 M pH 4, buffer sitrat fosfat 0,05 M untuk pH 6 dan 7, buffer Tris-HCl 0,05 M untuk pH 8 dan 9 (Chasanah dkk., 2013). Aktivitas enzim selulase diukur dengan metode DNS sesuai dengan prosedur sebelumnya.

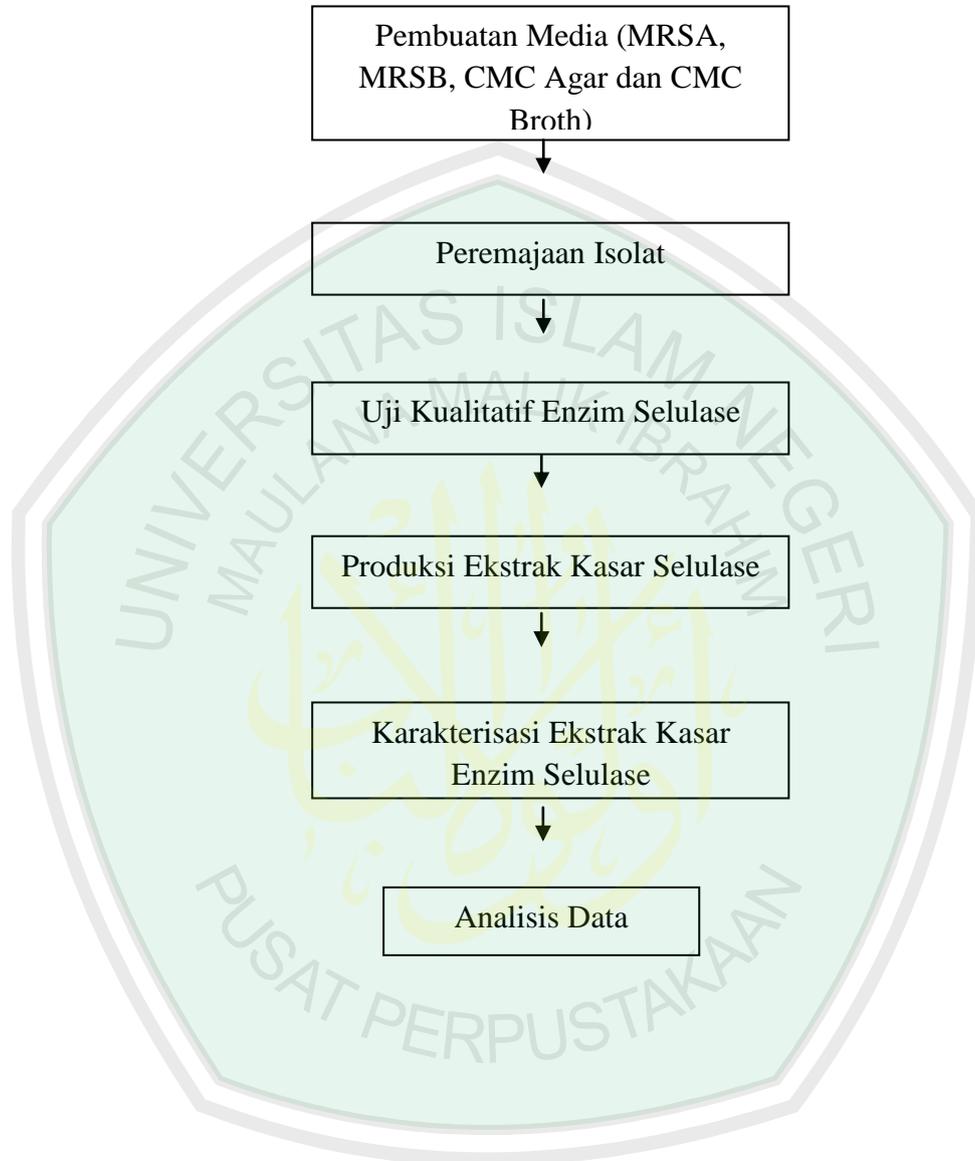
3.5.9.3 Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Selulase

Penentuan konsentrasi substrat optimum aktivitas enzim dilakukan dengan mereaksikan 1 mL ekstrak kasar enzim dengan 1 mL substrat CMC dengan konsentrasi yang berbeda yaitu (0,5, 1, 1,5, 2 dan 2,5%) pada suhu optimum dan pH optimum. Diinkubasi dalam *waterbath* selama 30 menit (Putri, 2014). Aktivitas enzim selulase diukur dengan metode DNS sesuai dengan prosedur sebelumnya.

3.6 Teknik Analisis Data

Data aktivitas selulase (U/mL) yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara deskriptif dengan menentukan nilai aktivitas selulase tertinggi pada masing-masing perlakuan.

3.7 Alur Penelitian



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Pendahuluan Identifikasi Genus Bakteri Asam Laktat

Identifikasi genus Bakteri Asam Laktat dilakukan untuk memastikan isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri asam laktat genus *Lactobacillus*. Uji pendahuluan yang dilakukan meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati warna, bentuk, permukaan dan ukuran koloni isolat yang ditumbuhkan pada media MRS Agar dan uji katalase, sedangkan pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan melakukan uji pewarnaan gram dan pewarnaan endospora.

Berdasarkan hasil uji yang telah dilakukan, secara makroskopis koloni isolat yang ditumbuhkan pada media MRS Agar berwarna putih susu, bentuk koloni bulat rata dan berukuran 0,5-1,3 mm. Berdasarkan pernyataan Rosyada (2016) yang menjelaskan bahwa koloni bakteri asam laktat dapat dibedakan dengan koloni mikroorganisme lain yaitu memiliki warna koloni putih susu mengkilat. Kemudian Holdeman dan Gato (1977) menambahkan bahwa koloni *Lactobacillus* berbentuk bulat rata dan tidak berserat serta memiliki ukuran 0,5-2 mm, maka isolat yang digunakan merupakan isolat bakteri asam laktat dengan genus *Lactobacillus*.

Hasil uji katalase menunjukkan bahwa isolat bakteri bersifat katalase negatif. Hal ini ditandai dengan tidak adanya gelembung gas pada uji katalase. Istiqomah (2015) menyebutkan bahwa uji katalase bertujuan untuk

mengidentifikasi mikroba yang mampu menghasilkan enzim katalase yang digunakan untuk memecah hidrogen peroksida (H_2O_2) yang terbentuk dari proses respirasi aerob menjadi dihidrogen oksida (H_2O) dan oksigen (O_2) yang tidak bersifat toksik. Ernawati (2010) menjelaskan bahwa *Lactobacillus* merupakan bakteri yang bersifat katalase negatif. Jika dibandingkan dengan literatur Ernawati (2010), maka hasil uji katalase pada isolat bakteri yang digunakan sudah sesuai dengan literatur, sehingga isolat yang diuji merupakan isolat bakteri asam laktat genus *Lactobacillus*.

Uji pewarnaan gram bertujuan untuk mengetahui morfologi bakteri dan membedakan antara bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Hasil uji pewarnaan gram pada isolat yang diuji menunjukkan bahwa bakteri bersifat gram positif yang ditandai dengan warna ungu. Warna ungu disebabkan karena dinding sel bakteri mengikat zat warna kristal violet. Sutrisna (2013) menjelaskan bahwa adanya warna ungu pada hasil pengecatan gram menunjukkan bahwa kristal violet dapat diikat oleh sel bakteri. Struktur dinding sel bakteri gram positif terdiri dari dua lapisan yaitu peptidoglikan yang tebal dan membran dalam. Lapisan peptidoglikan inilah yang mengikat zat warna kristal violet. Zat warna yang telah diikat oleh dinding sel bakteri ini tidak akan hilang setelah proses pelunturan dengan alkohol (Ernawati, 2010).

Berdasarkan morfologi isolat bakteri yang diuji pewarnaan gram, sel terlihat berbentuk batang dengan rantai pendek. Sel-selnya terlihat berpasangan yang terdiri dari 1-2 sel batang pendek. Berdasarkan literatur, maka hasil pengamatan sesuai dengan penelitian Buckle *et al.* (1987) yang menjelaskan

bahwa *Lactobacillus* merupakan bakteri gram positif berbentuk batang yang terdapat secara berpasangan atau rantai pendek. Istiqomah (2015) dan Rosyada (2015) juga memaparkan bahwa secara morfologi *Lactobacillus* memiliki bentuk sel batang jika diamati di bawah mikroskop. Berdasarkan pernyataan tersebut maka isolat yang diuji merupakan isolat bakteri *Lactobacillus*.

Uji pewarnaan endospora berfungsi untuk mengetahui ada tidaknya spora pada sel vegetatif. Untuk mengamati spora bakteri digunakan pewarna spesifik yaitu *malachite green* dan safranin. Fungsi dari penggunaan pewarna *malachite green* adalah untuk mewarnai spora yang ada dalam sel bakteri, sedangkan untuk memperjelas pengamatan, maka sel vegetatif juga diwarnai dengan menggunakan pewarna safranin sehingga sel vegetatif berwarna merah dan spora bakteri berwarna hijau. Dengan perbedaan warna tersebut, maka ada atau tidaknya spora bisa teramati, bahkan posisi spora di dalam tubuh sel vegetatif juga dapat diidentifikasi (Volk dan Wheeler, 1988).

Pewarnaan endospora menghasilkan dua jenis bakteri yaitu bakteri dengan spora atau endospora positif dan bakteri tanpa spora atau endospora negatif. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna hijau dalam sel bakteri yang menandakan bahwa sel bakteri memiliki spora. Sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan adanya sel vegetatif berwarna merah dan tidak terlihat spora berwarna hijau dalam sel bakteri. Hasil pewarnaan endospora pada isolat yang diuji menunjukkan bahwa isolat yang digunakan bersifat endospora negatif karena terlihat sel vegetatif berwarna merah tanpa adanya spora berwarna hijau. Berdasarkan Ernawati (2010) yang menyebutkan bahwa bakteri asam laktat

bersifat endospora negatif, maka hasil pengujian isolat yang digunakan merupakan bakteri asam laktat genus *Lactobacillus*.

Berdasarkan hasil uji makroskopis yang terdiri dari pengamatan morfologi koloni dan uji katalase, serta uji mikroskopis yang terdiri dari pewarnaan gram dan endospora yang telah dipaparkan dan dibandingkan dengan literatur, maka isolat yang digunakan dalam penelitian ini sudah sesuai dengan isolat bakteri yang diinginkan yaitu bakteri asam laktat genus *Lactobacillus*. Isolat *L. plantarum* yang digunakan dalam penelitian ini memiliki koloni berbentuk bulat rata berwarna putih susu dengan ukuran 0,5-1,3 mm, sel berbentuk batang yang terdiri dari satu atau dua sel dengan rantai pendek, bersifat katalase negatif, gram positif dan endospora negatif.

4.2 Uji Aktivitas Enzim Selulase yang Dihasilkan oleh *L. plantarum* secara Kualitatif

Aktivitas enzim selulase ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* secara kualitatif dapat diketahui dengan mengamati zona jernih yang dihasilkan pada media CMC Agar 1%. *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) merupakan suatu polimer anionik yang umum digunakan pada pengujian aktivitas selulase (Lee, 2008). CMC merupakan substrat terbaik untuk produksi selulase karena dapat menginduksi bakteri untuk memproduksi enzim selulase (Abou-Taleb *et al.*, 2009). Untuk mendeteksi adanya zona jernih, terlebih dahulu dilakukan pewarnaan menggunakan *congo red* 0,1% selama 30 menit. Zhang *et al.*, (2006) menjelaskan bahwa prinsip pewarnaan ini adalah zat pewarna akan

berdifusi ke dalam media agar dan hanya akan diabsorpsi oleh rantai panjang polisakarida yang memiliki ikatan β -D-glukan. Selanjutnya kelebihan pewarna *congo red* dibilas dengan menggunakan larutan NaCl 1 M. Fungsi dari pembilasan ini adalah untuk memperjelas zona jernih yang terbentuk sehingga lebih mudah diamati. Zona jernih yang dihasilkan ditampilkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Petri dengan media CMC Agar menunjukkan zona jernih yang diproduksi oleh aktivitas selulase isolat BAL setelah diberi pewarnaan *congo red*

Terbentuknya zona jernih di sekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* yang diuji mampu menghasilkan enzim selulase. Terbentuknya zona jernih menunjukkan bahwa polisakarida telah terdegradasi menjadi sakarida dengan rantai yang lebih pendek sehingga tidak dapat menyerap pewarna *congo red*. Dengan demikian, isolat *L. plantarum* yang diuji memiliki kemampuan mendegradasi media CMC yang mengandung selulosa.

Aktivitas enzim selulase ekstraseluler diukur secara semi kuantitatif berdasarkan diameter zona jernih yang terbentuk disekitar koloni *L. plantarum* menggunakan jangka sorong dan dihitung menggunakan rumus Indeks Aktivitas Selulase (IAS). Hasil pengukuran zona jernih ditampilkan pada Tabel 4.1. IAS untuk isolat *L. plantarum* yaitu selama 24 jam sebesar 1,24 dan selama 48 jam sebesar 1,98. Menurut Choi *et al.* (2005), rasio ekstraseluler dengan nilai indeks aktivitas selulase sebesar 1-2 termasuk dalam rasio ekstraseluler sedang.

Tabel 4.1 Indeks Aktivitas Selulase *Lactobacillus plantarum*

Waktu Inkubasi (Jam)	Indeks Aktivitas Selulase	Rasio Enzim
24	1,24	Sedang
48	1,98	Sedang

Meryandini *et al.* (2009) menjelaskan bahwa nilai indeks aktivitas selulase yang dihasilkan oleh mikroba dapat ditingkatkan dengan menambahkan waktu inkubasi media agar sehingga memungkinkan enzim dapat mendegradasi lebih banyak substrat CMC (Sari, 2010). Adanya aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* pada substrat CMC mengindikasikan adanya aktivitas endoglukanase atau disebut juga dengan CMCcase.

Apabila dibandingkan dengan indeks aktivitas selulase dari isolat bakteri RF-10 sebesar 1,625 (Sari, 2010) dan isolat kapang A2 sebesar 0,32 (Jay, 2014), maka indeks aktivitas selulase dari isolat *L. plantarum* tergolong lebih tinggi. Namun, jika dibandingkan dengan indeks aktivitas selulase dari isolat *Serratia marcescens* SGS 1609 sebesar 2,25 (Fawzya dkk., 2014), maka indeks aktivitas selulase dari isolat *L. plantarum* dalam penelitian ini tergolong lebih rendah. Tinggi rendahnya aktivitas selulolitik mikroba disebabkan karena perbedaan

kemampuan masing-masing bakteri dalam mendegradasi substrat selulosa (Rosyada, 2015).

Substrat *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) merupakan polimer dengan bobot molekul tinggi sehingga tidak dapat ditranspor ke dalam sel mikroorganisme (Kim *et al.*, 2000). Oleh sebab itu, enzim pendegradasi CMC akan ditahan pada permukaan dinding sel bakteri atau dilepaskan ke luar sel. Selanjutnya, enzim selulase yang disekresikan oleh koloni bakteri akan berdifusi masuk ke dalam permukaan media agar (Sari, 2010). Berdasarkan sekresi enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme, maka enzim selulase yang diproduksi oleh *L. plantarum* termasuk ke dalam enzim ekstraseluler.

4.3 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Produksi ekstrak kasar enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* dilakukan dengan menginkubasi kultur bakteri selama 24 jam. Sonia dan Kusnadi (2015) menjelaskan bahwa produksi enzim selulase yang merupakan metabolit primer terjadi pada akhir fase logaritmik atau awal fase stasioner bakteri. Selanjutnya, Sari (2010) menambahkan bahwa sintesis enzim selulase terjadi saat nutrisi organik selain substrat CMC mulai habis, sehingga sekresi enzim selulase memungkinkan sel bakteri tetap bertahan hidup dengan cara menghidrolisis CMC sebagai sumber nutrisi yang tersisa dalam media. Rosyada (2015) menyebutkan bahwa aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* optimum pada inkubasi selama 24 jam. Oleh sebab itu, pada penelitian ini produksi ekstrak kasar enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* dilakukan pada jam ke-24.

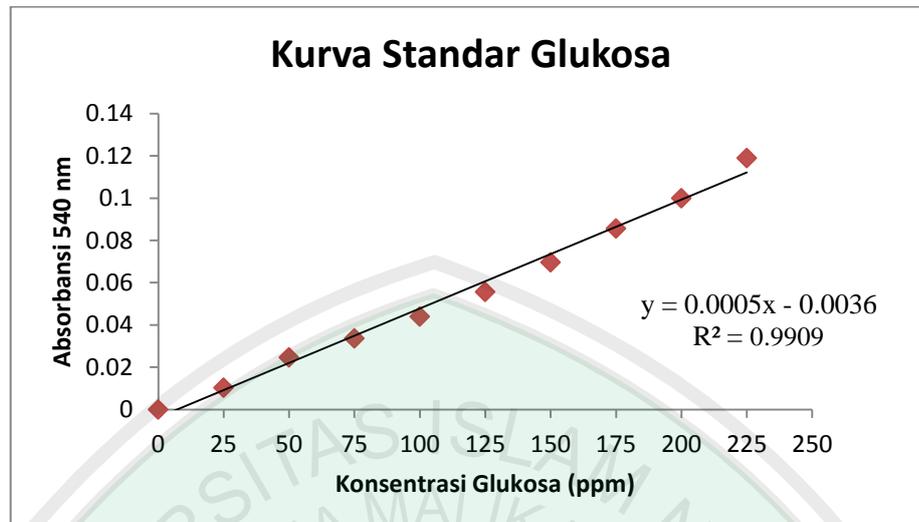
Ekstrak kasar enzim selulase diperoleh dengan memisahkan suspensi bakteri dengan bagian supernatan sebagai enzim kasar dengan cara melakukan sentrifugasi. Aulanni'am (2005) menyebutkan bahwa enzim selulase dari bakteri selulolitik termasuk ke dalam golongan enzim ekstraseluler sehingga dapat diekstrak melalui dinding sel dengan cara sentrifugasi. Proses sentrifugasi dilakukan pada suhu dingin yaitu pada suhu 4 °C selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Sentrifugasi suhu dingin bertujuan untuk mencegah terjadinya denaturasi protein pada enzim akibat suhu tinggi (Sonia dan Kusnadi, 2015). Hasil ekstrak kasar enzim selulase selanjutnya dikarakterisasi berdasarkan suhu, pH dan konsentrasi substrat.

CMC pada media produksi berfungsi sebagai substrat dan sekaligus sebagai zat penginduksi (induser) untuk menghasilkan enzim selulase. Induser adalah suatu senyawa yang dibutuhkan untuk menginduksi gen agar terjadi ekspresi gen, sesuai dengan teori Jacob-Monod tentang induksi enzim. Substrat CMC juga dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber karbon untuk menghasilkan glukosa (Apriani dkk., 2014). Jadi, apabila semakin banyak sumber karbon dalam media produksi maka enzim selulase yang dihasilkan juga semakin meningkat. Namun, kelebihan sumber karbon dapat menghambat pertumbuhan sel karena akan mengurangi jumlah oksigen dalam media sehingga dapat menurunkan produksi enzim selulase (Saropah dkk., 2012). Berdasarkan hal tersebut, maka untuk produksi enzim pada penelitian ini menggunakan konsentrasi substrat CMC 1% berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Jennifer dan Thiruneelakandan (2015).

4.4 Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS

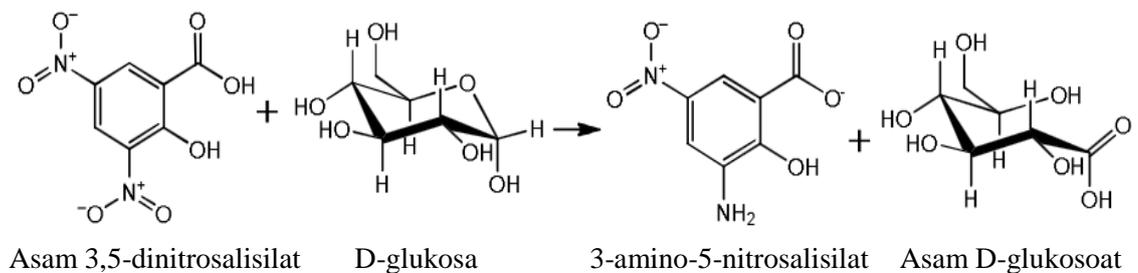
Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan metode DNS berdasarkan estimasi jumlah glukosa (gula reduksi) sebagai hasil hidrolisis selulosa (Jennifer dan dan Thiruneelakandan, 2015). DNS merupakan senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi yang membentuk asam 3-amino-5-dinitrosalisilat yang merupakan suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang 540 nm (Sastrohamidjojo, 2005). Oleh sebab itu, pengukuran aktivitas enzim selulase pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm seperti yang dilakukan dalam penelitian Rosyada (2015) yang melakukan pengukuran aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum*.

Kadar gula reduksi ditentukan dengan membuat kurva standar glukosa yang berfungsi untuk mengetahui konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya. Larutan glukosa dipilih sebagai larutan untuk pembuatan kurva standar karena glukosa termasuk gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa oleh enzim selulase. Kurva standar dibuat dengan variasi konsentrasi glukosa 0; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200 dan 225 (ppm). Hasil kurva standar glukosa memiliki persamaan linier $y = 0,0005x - 0,0036$ dengan nilai korelasi (R^2) sebesar 0,9909 (Gambar 4.2). Persamaan ini digunakan untuk mengetahui konsentrasi glukosa pada sampel yang diuji.



Gambar 4.2 Kurva Standar Glukosa

Reaksi antara gula reduksi dengan DNS merupakan reaksi redoks pada gugus aldehyd gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu, DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino dan 5-nitrosalisilat seperti yang terlihat pada Gambar 4.3. Reaksi ini berlangsung dalam suasana basa dan suhu tinggi sekitar 90-100 °C. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan (Kusmiati dan Agustini, 2010). Semakin gelap warna DNS maka jumlah gula yang tereduksi semakin banyak (Rosyada, 2015).



Gambar 4.3 Reaksi Glukosa dengan DNS (Kusmiati dan Agustini, 2010)

Pereaksi DNS dapat bekerja dengan adanya komponen pendukung seperti NaOH, fenol, sodium sulfit dan KNa-Tartrat. Miller (1959) menjelaskan bahwa pereaksi DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat) berfungsi mereduksi glukosa dalam keadaan basa yang dibantu dengan adanya penambahan NaOH. KNa-Tartrat berfungsi untuk menghilangkan pengaruh senyawa yang mengganggu sehingga kompleks warna tetap stabil. Selain itu, fenol berfungsi untuk stabilisasi warna yang terbentuk yaitu warna merah jingga kemerahan-bata kecoklatan, sedangkan sodium sulfit berfungsi untuk menghilangkan pengaruh oksigen terlarut yang dapat mengoksidasi glukosa produk.

4.3 Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Selulase dari *L. plantarum*

Suatu enzim selulase yang dihasilkan oleh berbagai macam bakteri memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Perbedaan karakteristik ini disebabkan karena dalam melakukan kerja katalitiknya enzim selulase dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, pH dan konsentrasi substrat (Lehninger, 1997). Masfufatun (2011) menjelaskan bahwa pengungkapan karakteristik suatu produk enzim sangat dibutuhkan untuk efisiensi proses produksi dan untuk memperoleh produk akhir yang berkualitas. Oleh sebab itu, karakterisasi ekstrak kasar enzim selulase dilakukan untuk mengetahui suhu, pH dan konsentrasi substrat optimum untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum*.

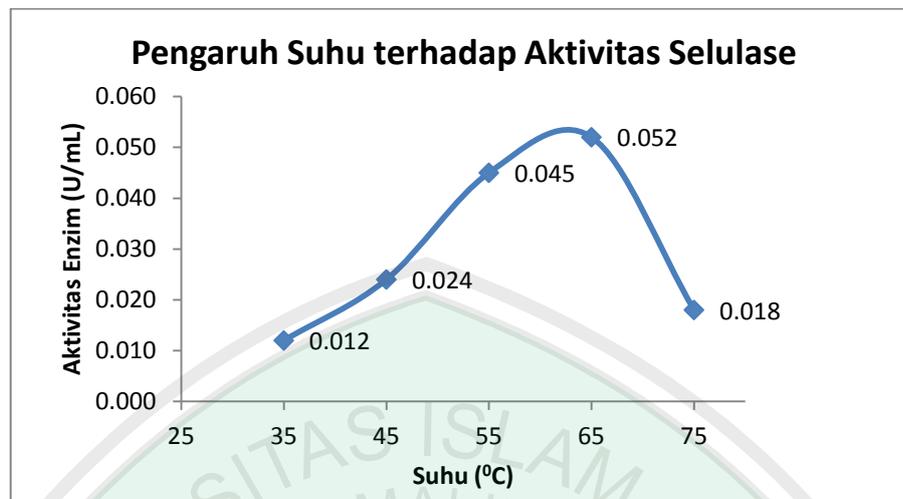
Karakterisasi enzim dilakukan secara bertahap, yang pertama menentukan suhu optimum, kemudian data suhu optimum yang diperoleh digunakan pada proses karakterisasi kedua yaitu dengan variasi pH. Kemudian data suhu dan pH

optimum yang sudah diperoleh digunakan pada proses karakterisasi ketiga yaitu dengan variasi konsentrasi substrat. Sehingga diperoleh data pengaruh aktivitas enzim selulase terhadap suhu, pH dan konsentrasi substrat yang masing-masing disajikan dalam nilai aktivitas selulase (U/mL).

4.3.1 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Suhu berpengaruh terhadap reaksi enzimatik. Suhu optimum merupakan suhu yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim (Poedjiadi dan Supriyanti, 1992). Peningkatan suhu secara umum akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia enzim, tetapi kenaikan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim yaitu berubahnya struktur protein enzim, sehingga menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim tersebut (Saropah dkk., 2012).

Aktivitas tertinggi dihasilkan pada perlakuan suhu 65 °C dengan aktivitas selulase sebesar 0,052 U/mL (Gambar 4.4). berdasarkan hasil tersebut, maka suhu optimum untuk aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* adalah suhu 65 °C. Tarigan dkk. (2015) menjelaskan bahwa pada suhu optimal, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat semakin mudah dan produk yang dihasilkan meningkat. Nam *et al.* (2004) menyebutkan bahwa kisaran suhu 45-80 °C termasuk ke dalam golongan enzim termofilik. Berdasarkan hal tersebut, maka aktivitas enzim selulase dari *L. plantarum* bersifat termostabil (tahan terhadap panas).



Gambar 4.4 Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim selulase dari *L. plantarum* dalam buffer fosfat pH 7.0

Kisaran suhu dibawah suhu optimal menyebabkan aktivitas enzim selulase mengalami penurunan. Pada suhu 55 °C aktivitas selulase lebih rendah dibandingkan pada suhu 65 °C yaitu sebesar 0,045 U/mL. Aktivitas selulase ini semakin menurun pada perlakuan suhu terendah yaitu 35 °C dengan aktivitas enzim yang dihasilkan hanya 0,012 U/mL. Penurunan aktivitas selulase pada kisaran suhu di bawah suhu optimal disebabkan karena kurangnya frekuensi tumbukan antara enzim dan substrat sehingga produk glukosa yang dihasilkan sedikit. Sari (2010) menjelaskan bahwa suhu inkubasi berbanding lurus dengan frekuensi tumbukan yang terjadi antara enzim dengan molekul CMC. Apabila suhu rendah, maka frekuensi tumbukan antar molekul menjadi berkurang sehingga molekul CMC yang dapat berikatan dengan sisi aktif enzim menjadi sedikit. Oleh sebab itu, jumlah molekul CMC yang terhidrolisis oleh enzim selulase juga sedikit.

Peningkatan suhu dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum*. Hal ini terlihat pada hasil aktivitas enzim yang

semakin meningkat pada kurva Gambar 4.4 yang disajikan. Berdasarkan kurva tersebut, aktivitas enzim selulase meningkat seiring dengan peningkatan suhu. Pada suhu 35 °C aktivitas enzim sebesar 0,012 U/mL dan mengalami peningkatan dengan perlakuan suhu yang lebih tinggi yaitu suhu 45 °C yang menghasilkan aktivitas enzim sebesar 0,024 U/mL. Aktivitas enzim selulase terus meningkat dengan perlakuan suhu selanjutnya yaitu suhu 55 °C dengan aktivitas enzim sebesar 0,045 U/mL dan mencapai puncaknya pada suhu 65 °C dengan aktivitas enzim sebesar 0,052 U/mL. Tarigan dkk. (2015) menjelaskan bahwa suhu yang semakin tinggi dapat meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dengan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang dihasilkan semakin banyak.

Namun peningkatan suhu selanjutnya menyebabkan penurunan aktivitas enzim selulase. Hal ini dibuktikan dengan nilai aktivitas enzim selulase pada perlakuan suhu 75 °C menurun drastis dari 0,052 U/mL pada suhu 65 °C menjadi 0,018 U/mL. Suhu yang terlalu tinggi menyebabkan kinetika molekul-molekul enzim menjadi besar sehingga memecahkan ikatan-ikatan sekunder yang mempertahankan enzim dalam bentuk aslinya, akibatnya struktur sekunder dan tersier hilang sehingga aktivitas enzim menurun. Adanya peningkatan suhu juga dapat mempengaruhi ikatan hidrogen atau interaksi hidrofobik yang berperan dalam menjaga konformasi molekul enzim. Perubahan konformasi akan mempengaruhi sisi aktif enzim, kondisi panas tertentu menyebabkan ikatan hidrogen tersebut akan putus. Putusnya satu ikatan hidrogen akan menyebabkan

mudahnya pemutusan ikatan hidrogen selanjutnya dalam rantai polipeptida, sehingga protein enzim mengalami denaturasi (Whitaker, 1994).

Semua enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme bekerja pada rentang suhu tertentu. Sebagian besar enzim memiliki aktivitas optimum pada rentang suhu 20-50 °C. Enzim yang aktif bekerja pada rentang suhu tersebut termasuk ke dalam golongan mesozim (Saropah dkk., 2012). Sedangkan enzim selulase memiliki aktivitas optimum pada rentang suhu 50-80 °C termasuk ke dalam golongan termozim atau sering disebut dengan termostabil (tahan panas) (Meryandini dkk., 2009). Berdasarkan hal tersebut, maka enzim selulase yang dihasilkan dari *L. plantarum* termasuk dalam golongan termozim yang stabil pada suhu tinggi.

Berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Sonia dan Kusnadi (2010), isolat bakteri OS-16 memiliki suhu optimum untuk aktivitas selulasenya adalah 85 °C, isolat bakteri RF-10 pada suhu 50 °C (Sari, 2010), *Bacillus pumillus* Galur 55 pada suhu 50 °C (Fitriani, 2003) dan *Bacillus* sp. pada suhu 50 °C (Tarigan dkk., 2015). Perbedaan suhu optimum pada masing-masing bakteri selulolitik mengindikasikan bahwa enzim selulase yang dihasilkan oleh setiap mikroba memiliki karakteristik yang berbeda-beda (Volk dan Wheeler, 1993).

Jika dibandingkan dengan penelitian lain yang juga melakukan pengukuran aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *Lactobacillus*, khususnya *L. plantarum* maka aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *L. plantarum* pada penelitian ini tergolong lebih rendah. Jennifer dan Thiruneelakandan (2015) melaporkan bahwa isolat *Lactobacillus* LA 1 yang diisolasi dari perairan di India

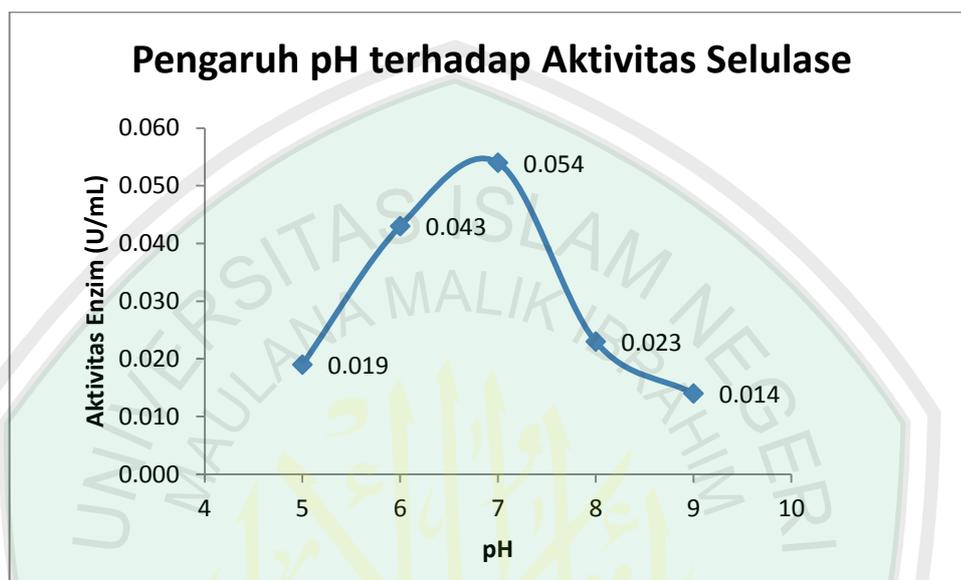
mampu menghasilkan aktivitas enzim selulase sebesar 1,236 U/mL pada suhu 55 °C. Sedangkan Rosyada (2015) melaporkan bahwa isolat *L. plantarum* yang diisolasi dari saluran pencernaan mentok memiliki aktivitas enzim selulase sebesar 0,083 U/mL pada suhu 55 °C. Berdasarkan hal tersebut maka, dapat disimpulkan bahwa selain dipengaruhi oleh karakteristik masing-masing isolat bakteri (Sonia dan Kusnadi, 2015), aktivitas enzim selulase juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan awal tempat mikroba hidup (Dali dkk., 2013).

4.3.2 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Faktor pH sangat berpengaruh terhadap struktur dan aktivitas biologis enzim. Interaksi ionik yang terjadi di dalam strukturnya, akan menstabilkan enzim dan memungkinkan enzim untuk mengenali dan berikatan dengan substratnya (Nelson dan Cox, 2005). Sedikit perubahan pH akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi yang dikatalis enzim. Perubahan pH akan menyebabkan denaturasi pada protein penyusun enzim itu sendiri (Murray *et al.*, 2003). Oleh sebab itu, setiap enzim yang dihasilkan oleh mikroba memiliki pH optimum yang berbeda-beda (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

Aktivitas selulase optimum ditunjukkan pada perlakuan pH 7 dengan nilai aktivitas sebesar 0,054 U/mL (Gambar 4.5). Hasil penelitian lain yang mengidentifikasi mikroba yang memiliki aktivitas selulase dengan pH optimum yang sama adalah *Bacillus* sp. (Rasul *et al.*, 2015), *Bacillus subtilis* (Verma *et al.*, 2012) dan kapang *Enhalus* sp. (Oktavia dkk., 2014). Kaur *et al.* (2007) menjelaskan bahwa enzim selulase yang aktif pada rentang pH 6.0-10.0 banyak

digunakan dalam industri tekstil dan detergen. Berdasarkan hal tersebut, maka enzim selulase yang berasal dari isolat *L. plantarum* berpotensi untuk dikembangkan pada industri enzim.



Gambar 4.5 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim selulase dari *L. plantarum* pada suhu 65 °C selama 30 menit.

Berdasarkan kurva pengaruh pH terhadap aktivitas selulase (Gambar 4.5) dapat diketahui bahwa terjadi penurunan aktivitas enzim selulase saat nilai pH berada di bawah dan di atas pH optimum enzim (pH 7). Pada pH basa yaitu pH 8 dan 9, aktivitas enzim selulase menurun yaitu pada pH 8 aktivitas selulase sebesar 0,023 U/mL dan pH 9 sebesar 0,014 U/mL. Penurunan aktivitas selulase juga terjadi pada pH asam yaitu pH 5 dan 6. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan pH dapat menyebabkan perubahan muatan pada molekul enzim sehingga dapat mempengaruhi aktivitas enzim, baik dengan perubahan struktur maupun dengan perubahan muatan (Dali, 2013).

Aktivitas enzim pada pH 6 yaitu pH asam yang mendekati pH netral sebesar 0,045 U/mL lebih besar jika dibandingkan dengan aktivitas enzim yang dihasilkan pada perlakuan yang lebih asam pada pH 5 yaitu 0,019 U/mL. Hal ini menunjukkan bahwa enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* aktif pada pH mendekati netral (pH 6-7). Bisswanger (2013) menjelaskan bahwa kondisi protonasi gugus fungsional asam amino dan kofaktor yang terlibat dalam reaksi katalitik mempengaruhi aktivitas enzim selulase. Sari (2010) menambahkan bahwa pada saat pH 7 (netral) sekitar 90% asam amino penyusun enzim berada pada bentuk aktif.

Berdasarkan kurva pada Gambar 4.5, maka aktivitas enzim pada kondisi asam rendah (pH 6) juga lebih besar jika dibandingkan dengan aktivitas enzim selulase pada kondisi basa rendah (pH 8). Hal ini menunjukkan bahwa pH optimum enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* optimum pada pH asam rendah sampai mendekati pH netral. Sari (2010) menjelaskan bahwa kondisi pH yang terlalu asam atau terlalu basa dapat menyebabkan asam amino penyusun enzim menjadi inaktif. Rasul *et al.* (2015) menambahkan bahwa enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri bekerja maksimum pada pH mendekati netral (pH 6-7).

Karakteristik enzim selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* pada penelitian ini menunjukkan bahwa pH optimum enzim berada pada kondisi netral pH 7. Pada kondisi pH netral, asam amino dapat terionisasi sehingga dapat mengaktifkan sisi aktif enzim dan pada kondisi ini aktivitas enzim meningkat. Penambahan asam atau basa mengakibatkan terjadinya perubahan asam amino,

sehingga sisi aktif enzim tidak lagi aktif dan aktivitas enzim menurun. Pada kondisi asam tinggi (pH 5) dan basa tinggi (pH 9), asam amino dalam kondisi ion zwitter tidak membentuk sisi aktif sehingga aktivitas enzim mengalami penurunan.

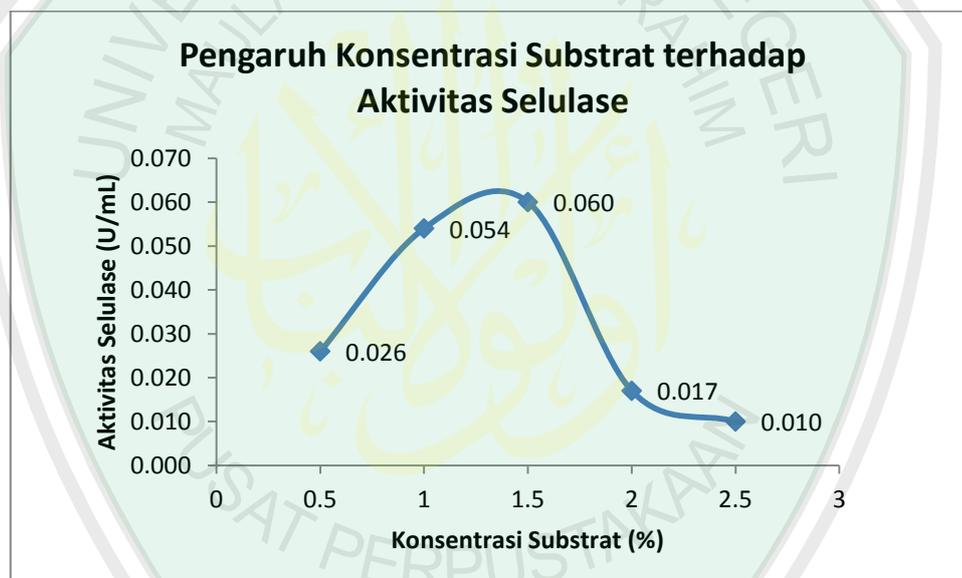
Setiap enzim mempunyai pH optimum untuk aktivitas maksimumnya. Di sekitar pH optimum, enzim mempunyai kestabilan yang tinggi dan hanya aktif pada kisaran pH yang terbatas. Pengaruh pH pada aktivitas selulase disebabkan oleh terjadinya perubahan tingkat ionisasi pada enzim atau substrat sebagai akibat perubahan pH (Irawadi, 1991). Jika dibandingkan dengan pH optimum aktivitas selulase dari *Lactobacillus* sp. pada rentang pH 9.0-10.0 yang cenderung basa (Jennifer dan Thiruneelakandan, 2015), pH optimum aktivitas selulase dari *L. plantarum* cenderung mendekati pH normal yaitu pada rentang pH 6.0-7.0.

Volk dan Wheeler (1993) menjelaskan bahwa perbedaan karakteristik enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroba dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu, pH lingkungan tempat enzim bekerja, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi. Meskipun terdapat perbedaan, namun rentang pH untuk aktivitas selulase sudah sesuai dengan kisaran pH optimum untuk aktivitas CMC-ase yaitu pada rentang pH 4.5-7.0 (Fikrinda, 2000).

4.3.3 Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Selulase

Aktivitas selulase optimum berada pada konsentrasi substrat 1,5% dengan aktivitas sebesar 0,060 yang juga ditunjukkan pada kurva (Gambar 4.6). Aktivitas selulase pada konsentrasi substrat 1,5% lebih besar jika dibandingkan dengan

aktivitas selulase pada konsentrasi substrat 0,5-1%. Berdasarkan hasil pengaruh konsentrasi substrat pada Gambar 4.6, besarnya konsentrasi substrat sebanding dengan besarnya aktivitas selulase. Artinya, pada konsentrasi substrat yang rendah, aktivitas selulasenya juga rendah karena sisi aktif enzim hanya sedikit mengikat substrat, sehingga produk glukosa yang dihasilkan juga sedikit. Demikian juga dengan konsentrasi substrat yang semakin tinggi, maka sisi aktif enzim akan semakin banyak mengikat substrat, sehingga produk glukosa yang dihasilkan semakin banyak.



Gambar 4.6 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim selulase dari *L. plantarum* pada suhu 65 °C dalam buffer pH 7.0 selama 30 menit.

Meskipun aktivitas selulase yang dihasilkan oleh *L. plantarum* optimum pada konsentrasi substrat 1,5%, namun peningkatan konsentrasi substrat di atas konsentrasi 1,5% tidak mampu meningkatkan aktivitas enzim selulase. Hal ini disebabkan karena hampir semua enzim telah membentuk kompleks enzim-substrat, sehingga tidak terdapat lagi sisi aktif enzim yang bebas. Nelson dan Cox

(2005) menjelaskan bahwa saat sisi aktif pada enzim mulai berikatan dengan substrat maka kecepatan maksimum reaksi akan tercapai. Namun setelah penambahan substrat berikutnya tidak akan mempengaruhi tingkat reaksi. Hal ini disebabkan oleh seluruh sisi aktif enzim seluruhnya telah dipakai oleh substrat.

Jika dihubungkan dengan persamaan Michaelis dan Menten, kompleks enzim-substrat dapat diperoleh dengan adanya kontak antara enzim dengan substrat. Kontak ini terjadi pada sisi aktif enzim. Pada konsentrasi substrat rendah, sisi aktif enzim hanya akan menampung substrat sedikit. Sedangkan bila konsentrasi substrat diperbesar, makin banyak substrat yang akan bergabung dengan enzim pada sisi aktif tersebut, maka kecepatan reaksi juga semakin besar. Pada suatu batas konsentrasi substrat tertentu, semua sisi aktif enzim telah dipenuhi dengan, dimana dalam keadaan ini bertambahnya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambah besarnya konsentrasi kompleks enzim-substrat (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

Aktivitas enzim selulase semakin menurun pada konsentrasi substrat 2% dan 2,5%. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi substrat CMC maka semakin tinggi viskositasnya sehingga probabilitas substrat berikatan dengan sisi aktif enzim semakin kecil (Masfufatun, 2011). Selain itu, tingginya jumlah produk glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis selulosa oleh enzim selulase juga dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Simanjuntak (2003) menjelaskan bahwa semakin banyak konsentrasi substrat maka sisi aktif enzim yang berkontak dengan substrat juga bertambah banyak, akibatnya semakin banyak selulosa yang dihidrolisis menjadi glukosa. Tetapi glukosa yang terlalu

banyak menyebabkan inhibisi produk glukosa karena glukosa akan menempel pada sisi alosterik enzim sehingga sisi aktif enzim selulase tidak dapat lagi ditempati oleh substrat CMC.

Glukosa merupakan inhibitor non kompetitif yang menempel pada sisi alosterik enzim yang dapat menyebabkan sisi aktif enzim berubah. Akibatnya substrat tidak dapat berikatan dengan enzim membentuk kompleks enzim-substrat. sehingga aktivitas enzim mengalami penurunan (Simanjuntak 2003). Roukas (1996) menambahkan bahwa penurunan aktivitas enzim juga disebabkan karena *feed back inhibition* dari glukosa yang dapat menghambat kerja enzim. Sehingga reaksi kimia berjalan lambat dan menghambat aktivitas selulase.

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka aktivitas selulase optimum oleh *L. plantarum* yang berlangsung pada suhu 65 °C dan pH 7 adalah pada konsentrasi substrat CMC 1,5%. Kondisi ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Rasul *et al.* (2015), Syam (2008) dan Putri (2014) . Aktivitas optimum selulase terhadap substrat CMC berlangsung pada konsentrasi substrat 0,5% (Rasul *et al.*, 2015), konsentrasi substrat 1% (Syam, 2008) dan konsentrasi substrat 2% (Putri, 2014). Perbedaan ini disebabkan karena perbedaan karakteristik dari enzim selulase yang dihasilkan oleh setiap mikroorganismenya.

4.4 Kajian Keislaman tentang Enzim Selulase dari Bakteri

Bakteri mampu menghasilkan enzim yang dapat membantu dalam memenuhi energi yang dibutuhkan selama pertumbuhannya. Keberadaan enzim

yang dihasilkan oleh bakteri merupakan tanda kebesaran Allah SWT bagi manusia yang berfikir. Allah berfirman dalam Surat Al-Hijr (15) ayat 20 yang berbunyi:

وَجَعَلْنَا لِكُلِّ فِيهَا مَعْيِشًا وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ ﴿٢٠﴾

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

Asy-Syuyuti dan Al-Mahalliy (1505) dalam *Tafsir Jalalain* menjelaskan bahwa Allah SWT telah menjadikan keperluan-keperluan hidup bagi manusia berupa buah-buahan dan biji-bijian dan Allah SWT menjadikan makhluk-makhluk misalnya berupa hamba-hamba sahaya, binatang-binatang dan berbagai macam jenis ternak yang mana hanya Allah yang akan memberi rezeki kepada mereka. Salah satu rezeki yang diberikan Allah kepada bakteri sebagai makhluk-Nya adalah enzim selulase.

Keberadaan enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri dapat membantu bakteri dalam melakukan metabolisme, khususnya untuk memecah sumber karbon berupa selulosa menjadi sumber karbon yang sederhana yaitu glukosa yang dapat dimanfaatkan bakteri untuk pertumbuhan. Enzim ini tidak hanya bermanfaat bagi bakteri, namun juga bermanfaat bagi manusia. Manfaat enzim selulosa antara lain untuk produksi kertas (Taruna dkk., 2010), pelembut bahan katun pada industri tekstil (Zhang *et al.*, 2006) dan peningkatan nilai cerna pakan hewan (Nugraha, 2006).

Disebutkan dalam Surat Ar-Rum (30) ayat 41 yang berbunyi :

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا
لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ ﴿٤١﴾

Artinya: *Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia, supaya Allah merasakan kepada mereka sebahagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar).*

Ayat tersebut menjelaskan bahwa telah nampak kerusakan di muka bumi ini akibat ulah manusia. Asy-Syuyuti dan Al-Mahalliy (1505) dalam *Tafsir Jalalain* menjelaskan bahwa yang dimaksud kerusakan dimuka bumi ini adalah kerusakan di darat disebabkan karena terhentinya hujan, menipisnya tumbuh-tumbuhan, serta kerusakan di laut yaitu kekeringan sungai dan kurangnya sumber air.

Selanjutnya, kata *لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ* menjelaskan bahwa Allah memberikan hukuman kepada manusia agar manusia merasakan akibat dari perbuatannya dan agar manusia bertobat dari segala perbuatannya. Oleh sebab itu, manusia diperintahkan untuk melakukan perbaikan dengan cara menjaga dan melestarikan lingkungan, tidak hanya mengambil hasil alam namun juga harus menlestarikannya agar dapat terus seimbang. Salah satu contoh yang bisa dilakukan adalah dengan memanfaatkan enzim selulase untuk meningkatkan nilai guna limbah pertanian sebagai pakan ternak

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dipaparkan, maka dapat disimpulkan bahwa :

- 1) *L. plantarum* menghasilkan enzim selulase optimum pada suhu 65 °C dengan aktivitas selulase sebesar 0,052 U/mL.
- 2) *L. plantarum* menghasilkan enzim selulase optimum pada pH 7.0 (netral) dengan aktivitas selulase sebesar 0,054 U/mL.
- 3) *L. plantarum* menghasilkan enzim selulase optimum pada konsentrasi substrat CMC 1,5% dengan aktivitas selulase sebesar 0,060 U/mL.

5.2 Saran

Perlu dilakukan pemurnian enzim selulase secara parsial untuk menghasilkan aktivitas selulase yang lebih besar dan maksimal. Selain itu, perlu dilakukan penggunaan substrat selulosa kristalin yaitu avisel untuk mengetahui jenis substrat yang sesuai.

DAFTAR PUSTAKA

- Abou-Taleb, K.A.A., Mashhoor, W.A., Nasr, S.A., SHaraf, M.S., Abdel-Azeem, H.H.M. 2009. Nutritional and Environmental Factors Affecting Cellulase Production by Two Strains of Cellulolytic Bacili. *AJBAS*. 3 (3): 2429-2436.
- Ahmed, Z., Banu, H., Rahman, M.M., Akhter, F., Haque, M.S. 2001. Microbial Activity on The Degradation of Lignocellulosic Polysaccharides. *Journal of Biological Science*. 1 (10): 993-997.
- Alam, M.Z., Manchur, M.A., Anwar, M.N. 2004. Isolation, Purification, Characterization of Cellulolytic Enzymes Produced by The Isolate *Streptomyces omiyaensis*. *Pak J Biol Sci*. 7: 1647-1653.
- Al-Jazairi, Syaikh Abu Bakar Jahir. 2007. *Tafsir Al-Quran Al-Aisar Jilid 3*. Jakarta: Darus Sunnah Press.
- Apriani, K., Haryani, Y., Kartika, G. 2014. Produksi dan Uji Aktivitas Selulase dari Isolat Bakteri Selulolitik Sungai Indragari. *JOM FMIPA*. 1(2): 261-267.
- Asy-syuyuti, Jalaludin dan Jalaluddin Muhammad Ibn Ahmad Al-Mahalliy. 1505. *Tafsir Jalalain*. Kairo Mesir.
- Aulanni'am. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Malang: Citra Mentari Grup
- Axselsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A., editors. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects 3rd Edition*. Revised and Expanded. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Aziz, P. 2012. Enzim dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Laju Reaksi Enzim. *Addition Material* for FIK Biochemical Experiment Class. Diakses tanggal 10 Januari 2016.
- Bahreisy, H. 1988. *Terjemahan Singkat Tafsir Ibnu Katsir Jilid 4*. Kuala Lumpur: Victory Agencie.
- Bisswanger, H. 2013. Review: Enzyme Assays. *Perspectives in Science*. 1: 41-55.
- Buckle, K.A., Edwards, R.A., Fleet, G.H., Wotton, M. 1987. *Ilmu Pangan*. Diterjemahkan oleh Pornomo, H., Adiono. Jakarta: UI Press.
- Chasanah, E., Dini, I.R., Mubarik, N.R. 2013. Karakterisasi Enzim Selulase PMP 0126Y dari Limbah Pengolahan Agar. *JPB Perikanan*. 8 (2): 103-114.

- Choi, Y.W., Hodgkiss, I.J., Hyde, K.D. 2005. Enzyme Production by Endophytes of *Brucea javanica*. *J Agric Tech.* 1: 55-66.
- Dali, S., Arfah, R., Karim, A., Patong, A.R. 2013. Eksplorasi Enzim Amilase dari Mikroba yang Diisolasi dari Sumber Air Panas di Sulawesi Selatan dan Aplikasinya dalam Produksi Maltodekstrin. *Laporan Akhir*. Makassar: Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.
- Departemen Agama RI. 2010. *Al-Quran dan Tafsirnya Kementerian Agama RI*. Jakarta: Departemen Agama RI.
- Effendi. M.S. 2002. Kinetika Fermentasi Asam Asetat (Vinegar) oleh Bakteri *Acetobacter aceti* B127 dari Etanol Hasil Fermentasi Limbah Cair Pulp Kakao. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan.* 13 (2): 125-134.
- Enari, T.M. 1983. Microbial Cellulases. In: Fogarty, W.M. (ed). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. New York: Appl. Sci. Publisher.
- Ernawati. 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Susu Kambing Segar. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ernest, J., Melnick, J., L. Adelberg., Edward, A., 1986. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan*. Jakarta: EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Fawzya, Y.N., Latifa, A., Noriko, N. 2014. Pemanfaatan Limbah Pengolahan Agar sebagai Komponen Medium Produksi Selulase dari Mikroba. *JPB Perikanan.* 9 (1): 51-60.
- Fikrinda. 2000. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Selulase Ekstermofilik dari Ekosistem Air Hitam. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor.
- Fitriani, E. 2003. *Aktivitas Enzim Karboksimetil Selulase Bacillus pumilus Galur 55 pada Berbagai Suhu Inkubasi*. Bogor: Kimia FMIPA IPB.
- Fox, P.F. 1991. *Food Enzymology*. New York: Elsevier Applied Science Ltd.
- Gong, C.S dan G.T. Tsao. 1979. *Cellulase and Biosynthesis Regulation*. New York: Academic Press.
- Hames, D., Hooper, N. 2005. *Biochemistry*. Ed ke-4. New York: Taylor and Francis Group.
- Hasibuan, B.E. 2009. *Pupuk dan Pemupukan*. Medan: Universitas Sumatra Utara Press.
- Holdeman, L.U dan Gato, E.P. 1977. *Anaerob Laboratory Manual*. Virginia: Virginia Polytechnic Institute and State University.

- Holt, G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T., Williams, S.T. 2000. *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williamin and Wilkins Baltimore.
- Holtzaple., Mark, M., Nathan, W., Charles, D., Bruce, E., Richard, L., Y. Y., Ladisch, M. 2003. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Journal*. Purdue University.
- Ikram, U.B., Javed, M., Khan, T.S., Siddiq, Z. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Research Journal of Agriculture and Biological Science*. 1(3): 241-245.
- Irawadi, T.T. 1991. Produksi Enzim Ekstraseluler (Selulase dan Xylanase) dari *Neurospora sitophila* pada Substrat Limbah Padat Kelapa Sawit. *Disertasi*. Bogor: Fakultas Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Irawati, R. 2016. Karakterisasi pH, Suhu dan Konsentrasi Substrat pada Enzim Selulase Kasar yang Diproduksi oleh *Bacillus circulans*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Istiqomah, L. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Fitase dari Saluran Pencernaan Unggas serta Karakterisasi Fitasenya. *Tesis*. Program Pascasarjana. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Jay, M.I. 2014. Uji Aktivitas Enzim Selulase pada Kapang dari Perairan Pulau Pari Kepulauan Seribu. *Skripsi*. Bogor: Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.
- Jennifer, V dan Thiruneelakandan, G. 2015. Enzymatic Activity of Marine *Lactobacillus* Species from South East Coast of India. *IJISET*. 2 (1): 542-546.
- Kader, A.J dan Omar, O. 1988. Isolation of Cellulotic Fungi from Sayap-Kinabalu Park, Sabah, Serawak. *J Biodiversity Bio-Century*. 1-6.
- Karppinen, S. 2003. Dietary Fiber Component of Rye Bran and Their Fermentation In Vitro. *Disertation*. Finlandia: Faculty of Science, Departement of Bioscience. Divisions of Biochemistry. University of Helsinki.
- Kaur, J., Chadha, B.S., Kumar, B.A., Saini, H.S. 2007. Purification and Characterization of Two Endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *J Bioresource Tech*. 98: 74-81.
- Kim, Y.S., Jung, H.C., Pan, J.G. 2000. Bacterial Cell Surface Display of an Enzyme Library for Selective Screening of Improved Cellulase Variants. *J Appl Environ Microbiol*. 66: 788-793.

- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., Van, K.R., Molenaar, D., Kuipers O.P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., Stiekema, W., Lankhorst, R.M.K., Born, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J. 2003. Complete Genome Sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *PNAS*. 100: 1990-1995.
- Kodri., Argo, B.D., Yulianingsih, R. 2013. Pemanfaatan Enzim Selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi dengan *Pretreatment* Microwave. *Jurnal Proses Komoditas Tropis*. 1 (1): 36-43.
- Kombong, H. 2004. Evaluasi Daya Hidrolitik Enzim Glukoamilase dari Filtrat Kultur *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Dasar*. 5: 16-20.
- Krabi, R.E., Assamoi, A.A., Ehon, F.A., Niamke, L. 2015. Screening of Lactic Acid Bacteria as Potential Starter for The Production of Attieke, a Fermented Cassava Food. *Journal of Faculty of Food Engineering*. 14 (1): 21-29.
- Kulp, K. 1975. *Carbohydrases.: Enzymes and Food Processing*. New York: Cademic Press.
- Kusmiati dan Agustini, N.W.S. 2010. Pemanfaatan Limbah Onggok untuk Produksi Asam Sitrat dengan Penambahan Mineral Fe dan Mg pada Substrat Menggunakan Kapang *Trichoderma* sp. dan *Aspergillus niger*. *Seminar Nasional Biologi*.
- Kuswanto, K.R., dan S. Sudarmadji. 1988. *Proses-Proses Mikrobiologi Pangan*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.
- Lay, W.B. 1994. *Analisa Mikroba di Laboratorium Edisi I*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Lamid, M. 2013. Potensi *Lactobacillus plantarum* terhadap Kandungan Selulosa dan Bahan Ekstrak tanpa Nitrogen (BETN) Silase Pucuk Tebu (*Saccharum officinarum*, Linn). *Green Technology* 3. Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Lee, Y. 2008. Purification and Characterization of Cellulase Produces by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 Utilizing Rice Hull. *Bioresource Technology*. 99: 378-386.
- Lehninger, A. L. 1993. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publisher.
- Lehninger, A.L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid I*. Diterjemahkan oleh M. Thenawidjajal. Jakarta: Erlangga.

- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H., Pretorius, I.H. 2002. Microbial Cellulose Utilization, Fundamental and Biotechnology. *Microbiol Molecul Bio Reviews*. 66: 506-577.
- Maranatha, B. 2008. Aktivitas Enzim Selulase Isolat Asal Indonesia pada Berbagai Substrat Limbah Pertanian. *Skripsi*. Bogor: Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Martoharsono, S. 1997. *Biokimia Jilid I*. Yogyakarta: UGM Press.
- Masfufatun. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase, *Jurnal*. Surabaya: Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. 2004. *Animal Nutrition*. New York: John Willey and Sons Inc.
- Meryandini, A., Widosari, W., Besty, M., Sunarti, T.C., Rachmania, N., Satria, H. 2009. Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Sains*. 13 (1): 33-38.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalisilyc Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 31: 426-428.
- Mukminin, A. 2015. Isolasi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto dan Pengujian Aktivitas Enzim Selulase. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mulyani, M.S. 1996. *Mikrobiologi Tanah*. Jakarta: Penerbit Rineka Cipta.
- Murashima, K., A. Kosugi and RH. Doy. 2002. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *J. Bacteriol* 184: 5088 – 5095.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Ed ke-26. San Fransisco: McGraw-Hill.
- Musthofa, Ahmad Al-Maroghi. 1942. *Terjemahan Tafsir Al Maroghi Juz 11*. Semarang: CV Toha Putra.
- Muwakhid, B., Salim, S., Maunatin, A. Uji Kemampuan Bakteri Asam Selulolitik Asal Usus Itik Petelur sebagai Probiotik. *Green Technology* 3. 161-167.
- Nam, E.S. 2004. B-galactosidase Gene of *Thermus thermophilus* KNOUC112 Isolated from Hot Springs of a Volcanic Area in New Zealand: Identification of the Bacteria, Cloning and Expression of the Gene in *Escherichia coli*. *Asian-Aust J Anim Sci*. 17: 1591-1598.
- Nelson, D.L dan Cox, M.M. 2005. *Principles of Biochemistry*. Ed ke-4. New York: Worth Publisher.

- Nugraha, R. 2006. Produksi Enzim Selulase oleh *Penicillium nalgiovense* SS240 pada Substrat Tandan Sawit. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Nurani, D., Sukotjo, S., Nurmalasari, I. 2013. Optimasi Produksi Tepung Talas (*Colocasia esculenta*, L. Schott) Termodifikasi secara Fermentasi. *Jurnal IPTEK*. 8 (1): 65-71.
- Oikawa, T., M. Takagi., M.A, Ameyama. 1994. Detection of Carboxymethyl Cellulase Activity in *Acetobacter xylinum* KU-1. *Biosci Biotch Biochem*. 58 (11): 2102-2103.
- Oktavia, Y., Andhikawati, A., Nurhayati, T., Tarman, K. 2014. Karakterisasi Enzim Kasar Selulase Kapang Endofit dari Lamun. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 6 (1): 209-218.
- Ooshima, H., M. Sakata., Harano, Y. 1985. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose: Effect of Ethanol on Enzymatic Saccharification of Cellulose. *Biotechnoll Bioeng*. 27: 389-397.
- Poedjiadi, A. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia Edisi Revisi*. Jakarta: UI Press.
- Poedjiadi, A dan Supriyanti, F.M. 1992. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Purwaningsih, I. 2015. Pengaruh Lama Fermentasi dan Penambahan Inokulum *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* terhadap Kualitas Silase Rumput Kalanjana (*Brachiaria mutica* (Forssk.) Stapf). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Putri, F.I.C.E. 2014. Optimasi Produksi Selulase dari Bakteri Laut *Bacillus cereus*. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Rasul, F., Afroz, A., Rashid, U., Mehmood, S., Zeeshan, N. 2015. Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacteria from Soil and Waste (Molasses) of Sugar Industry. *Int J Biosci*. 6 (3): 230-238.
- Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. New York: Academic Press.
- Rosyada, N. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Selulolitik pada Saluran Pencernaan Mentok (*Cairina moschata*). *Skripsi*. Surakarta: Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret.
- Roukas, T. 1996. Continuous Bioethanol Production from Nonsterilized Carob Pod Extract by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on Mineral Kissors Usung a Two Reactor System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 59 (3): 299-307.
- Salle. A.J. 1974. *Fundamental Principles of Bacteriology*. New Delhi: Tata Mc Graw Hill.

- Santos, T.C., Gomes, D.P.P., Bonomo, R.C.F., Franco, M. 2012. Optimisation of Solid State Fermentation of Potato Peel for The Production of Cellulolytic Enzyme. *Food Chemistry*. 133: 1299-1304.
- Santoso, B., Hariadi, B.T., Alimuddin, Seseray, D.Y. 2011. Kualitas Fermentasi dan Nilai Nutrisi Silase Berbasis Sisa Tanaman Padi yang Diensilase dengan Penambahan Inokulum Bakteri Asam Laktat Epifit. *JITV*. 16 (1): 1-8.
- Sari, R.A., Risa, N., Puji, A. 2012. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Genus *Leuconostoc* dari Pekasam Ale-Ale Hasil Formulasi Skala Laboratorium. *JKK*. 1: 14-20.
- Sari, R. F. 2010. Optimasi Aktivitas Selulase Ekstraseluler dari Isolat Bakteri RF-10. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Sari, W.W. 2008. Karakterisasi Selulase Bakteri Asal Tanah Pertanian Jawa Tengah dan Jawa Barat. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Saropah, A., Jannah, A., Maunatin, A. 2012. Kinetika Reaksi Enzimatik Ekstrak Kasar Enzim Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul. *Alchemy*. 2 (1): 34-45.
- Sastrohamidjojo, H. 2005. *Kimia Organik, Sterokimia, Lemak dan Protein*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Simanjuntak, M.T. 2003. *Biokimia*. Sumatera Utara: Fakultas Matematika dan Ilmu Penegathuan Alam.
- Sinurat, A.P., J. Darma., T. Hariyati., R. Dharsana dan T. Purwadaria. 1993. Penggunaan Tepung Daun Singkong yang Difermentasi untuk Ayam Pedaging. *Laporan Penelitian*. Balitnak Ciawi, Bogor.
- Sinurat, A.P., P. Sehadi., R. Dharsana., T. Purwadaria. dan J. Darma., 1995. Pengujian Daya Cerna Nutrisi Bungkil Kelapa yang Belum dan yang Sudah di Fermentasi serta Pemanfaatannya dalam Ransum Anak Itik Jantan. *Kumpulan Hasil-hasil Penelitian APBN*. Balitnak Ciawi, Bogor.
- Somogyi, M. 1952. Determination of Reducing Sugars. *J Biol Chem*. 200-245.
- Sonia, N.M.O., Kusnadi, J. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Selulase dari Isolat Bakteri OS-16 Asal Padang Pasir Tengger Bromo. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3 (4): 11-19.
- Stanbury, P.F dan A. Whitaker. 1984. *Principles of Fermentation Technology*. New York: Pergamon Press.

- Suardana, W. 2007. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali sebagai Kandidat Biopreservatif. *Jurnal Veteriner*. 8 (4): 155-159.
- Sukumaran, R.K., Singhanis, R.R., Pandhey, A.S. 2005. Microbial Cellulases, Production, Applications and Challenges. *J of Science and Industrial Research*. 4: 832-844.
- Sumarsih, S., Sulistiyanto, B., Sutrisno, C. I dan Rahayu, E. S. 2012. Peran Probiotik Bakteri Asam Laktat terhadap Produktivitas Unggas. *Jurnal Litbang Provinsi Jawa Tengah*. 10 (1).
- Suryani, Y., Astuti., Bernandeta, O., Siti, U. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Kotoran Ayam sebagai Agensi Probiotik dan Enzim Kolesterol Reduktase. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*.
- Sutrisna, R. 2013. Karakterisasi Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Itik (*Anas domestica*) terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella pullorum*. *Seminar Nasional Sains dan Teknologi V*. Lembaga Penelitian Universitas Lampung. 396-407.
- Syam, K.A. 2008. Optimasi Produksi dan Aktivitas Enzim Selulase dari Mikrob Selulolitik Asal Rayap. *Skripsi*. Bogor: Program Studi Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Tarigan, W.F., Sumardi., Setiawan, W.A. 2015. Karakterisasi Enzim Selulase dari Bakteri Selulolitik *Bacillus* sp. *Seminar Nasional Sains dan Teknologi VI*.
- Taruna, H., Rita, A., Tania, S., Sri, A. 2010. *Studi Awal Pemanfaatan Limbah Kertas HVS sebagai Bahan Baku dalam Proses Pembuatan Etanol*. Universitas Indonesia..
- Utsman, M. H. 2008. *Tafsir Al Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Verma, V., Verma, A., Kushwaha, A. 2012. Isolation and Production of Cellulase Enzyme from Bacteria Isolated from Agriculture Fields in District Hardoi, Uttar Pradesh, India: *Applied Science Research*. 3: 171-174.
- Volk, W.A dan Wheeler, M.F. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan Markam. Jakarta: Erlangga.
- Wahyudi, A dan S. Samsundari. 2008. *Bugar dengan Susu Fermentasi*. Malang: UMM Press.
- Walter, H.G dan G.O. Kohler. 1978. Treated and Untreated Cellulosic Wastes and Animal Feeds. *Recent Work Interaksi The United States of America*. USA.

- Whittaker, J.R. 1994. *Principle of Enzymology for The Food Science Second Edition*. New York: Marcel Decker.
- Wibawa, A.A.P.P., Mudita, I.M., Wirawan, I.W., Kayana, I.G.N. Penggunaan Cairan Rumen dan Rayap dalam Produksi Bioinokulan Alternatif serta Pemanfaatannya dalam Pengembangan Peternakan Sapi Bali Kompetitif dan Sustainabel. Fakultas Peternakan Universitas Udayana.
- Widodo, D.S. 2014. Pengaruh Lama Fermentasi dan Penambahan Inokulum *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* terhadap Kualitas Silase Tebon Jagung (*Zae mays*). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Winarno, F.G. 2014. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. 2006. Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Selection Strategies. *Biotech Adv.* 24: 452-481.
- Zubaidah, E., Aldina, N., Nisa, F.C. 2010. Studi Aktivitas Antioksidan Bekatul dan Susu Skim Terfermentasi Bakteri Asam Laktat Probiotik (*Lactobacillus plantarum* J2 dan *Lactobacillus casei*). *Jurnal Teknologi Pertanian*. 11 (1) : 11-17.
- Zubaidah, E., Saparianti, E., Hindrawan, J. 2012. Studi Aktivitas Antioksidan pada Bekatul dan Susu Skim Terfermentasi Probiotik (*Lactobacillus plantarum* B2 dan *Lactobacillus acidophilus*). *Jurnal Teknologi Pertanian* 3 (2): 111-118.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Reagen dan Media

L.1.1 Pembuatan Reagen DNS (Miller, 1959)

Ditimbang asam 3,5-*Dinitrosalicylic acid* sebanyak 1 gram, 0,2 gram fenol, 0,05 gram sodium sulfit dan 1 gram natrium hidroksida. Semua bahan dilarutkan dengan aquades dalam labu takar 100 mL dan ditera. Simpan dalam botol gelap.

L.1.2 Pembuatan Reagen KNa-Tartrat 40% (Miller, 1959)

Ditimbang KNa-Tartrat sebanyak 20 gram kemudian dilarutkan dengan aquades 50 mL dalam Erlenmeyer 250 mL. Simpan dalam botol berwarna gelap.

L.1.3 Pembuatan Buffer Fosfat pH 7,0 0,05 M (Kuhlmann, 2006)

Ditimbang K_2HPO_4 sebanyak 5,2254 gram dan KH_2PO_4 sebanyak 4,0827 gram. Masing-masing bahan dilarutkan dalam aquades 30 mL untuk larutan stok. Untuk membuat buffer fosfat pH 7 0,05 M diambil dari larutan stok tersebut sebanyak 21,1 mL larutan K_2HPO_4 dan 28,9 mL larutan KH_2PO_4 dan dilarutkan dengan aquades sampai 1 L.

L.1.4 Pembuatan Buffer Tris-HCl pH 8,0 dan 9,0 0,05 M (Kuhlmann, 2006)

Dibuat larutan A 0,2 M Tris (2,103 gram Tris dalam 100 mL aquades) dan larutan B 0,1 M HCl (10 mL HCl 1 M dalam 100 mL aquades). Untuk pH 8,0 dibutuhkan larutan A sebanyak 50 mL dan larutan B sebanyak 55,8 mL ditambahkan aquades sampai 200 mL. Sedangkan untuk pH 9,0 dibutuhkan 50 mL larutan A dan 10,6 mL larutan B ditambahkan aquades sampai 200 mL.

L.1.5 Pembuatan Buffer Sitrat Fosfat 0,05 M pH 6,0 dan 7,0 (Gomori, 2004)

Dibuat larutan A 0,1 M larutan asam sitrat (1,921 gram dalam 100 mL aquades) dan larutan B 0,2 M larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,365 gram dalam 100 mL) atau 0,2 M larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (7,17 gram dalam 100 mL). Untuk pH 6,0 dibutuhkan 17,9 mL larutan A dan 32,1 mL larutan B ditambahkan aquades sampai 100 mL. sedangkan untuk pH 7,0 dibutuhkan 6,5 mL larutan A dan 43,6 mL larutan B dan ditambahkan aquades sampai 100 mL.

L.1.6 Pembuatan Buffer Sitrat 0,05 M pH 5,0 (Gomori, 2004)

Dibuat larutan A 0,1 M larutan asam sitrat (2,101 gram dalam 100 mL aquades) dan larutan B larutan natrium sitrat (2,941 gram dalam 100 mL aquades). Untuk pH 5,0 dibutuhkan 20,5 mL larutan A dan 29,5 mL larutan B kemudian dilarutkan dalam aquades sampai 100 mL.

L.1.7 Pembuatan Media CMC Agar dan Broth 1% (Rosyada, 2015)

Ditimbang 1 g CMC; 0,02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,075 g KNO_3 ; 0,05 g K_2HPO_4 ; 0,002 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,004 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,2 g ekstrak khamir, 1,5 g agar-agar bakto dan 0,1 g glukosa. Semua bahan dimasukkan ke dalam beaker gelas 250 mL dan ditambahkan dengan aquades sebanyak 100 mL, dipanaskan sampai mendidih di atas *hot plate* dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Selanjutnya media tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Untuk media CMC Broth komposisi media sama dengan media CMC Agar tanpa penambagan agar-agar bakto.

Lampiran 2. Penentuan Indeks Aktivitas Selulase secara Kualitatif

L.2.1 Tabel Hasil Pengukuran Zona Jernih

Waktu (jam)	Diameter Luar (mm)			Diameter Dalam (mm)			IAS (A-B)/B
	d ₁	d ₂	A	d ₁	d ₂	B	
24	11,59	13,90	12,745	5,68	5,68	5,68	1,24
48	16,87	17,03	16,95	5,68	5,68	5,68	1,98

Keterangan :d₁: diameter 1, d₂ : diameter 2, A: rata-rata diameter luar (Zona bening + BAL), B: rata-rata diameter dalam (*Paper disk* + koloni BAL), IAS: Indeks Aktivitas Selulase (A-B)/B

L.2.2 Cara Perhitungan Indeks Aktivitas Selulase

Rumus :

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

Keterangan :

A = diameter zona bening (mm)

B = diameter koloni (mm)

Contoh :

Hasil pengamatan 24 jam, IAS = $\frac{(12,745 - 5,68)}{5,68} = 1,24$ (Sedang)

Hasil pengamatan 48 jam, IAS = $\frac{(16,95 - 5,68)}{5,68} = 1,98$ (Sedang)

L.2.3 Tabel Klasifikasi Rasio Enzim Ekstraseluler (Choi *et al.*, 2005)

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

Lampiran 3. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

L.3.1 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Cara membuat larutan stok glukosa standar 5000 ppm adalah :

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

Untuk membuat larutan standar 5000 ppm dibutuhkan 0,5 g glukosa, dilarutkan dengan aquades sebanyak 100 mL. Kemudian larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 dan 225 ppm sebanyak 100 mL dibuat sesuai dengan perhitungan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut :

1) Konsentrasi 25 ppm

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

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 25 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL larutan stok glukosa} + 99,5 \text{ mL aquades}$$

2) Konsentrasi 50 ppm

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

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

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

3) Konsentrasi 75 ppm

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

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 75 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1,5 \text{ mL larutan stok glukosa} + 98,5 \text{ mL aquades}$$

4) Konsentrasi 100 ppm

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

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

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

5) Konsentrasi 125 ppm

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

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 125 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL larutan stok glukosa} + 97,5 \text{ mL aquades}$$

6) Konsentrasi 150 ppm

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

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

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

7) Konsentrasi 175 ppm

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

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 175 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 3,5 \text{ mL larutan stok glukosa} + 96,5 \text{ mL aquades}$$

8) Konsentrasi 200 ppm

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

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

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

9) Konsentrasi 225 ppm

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

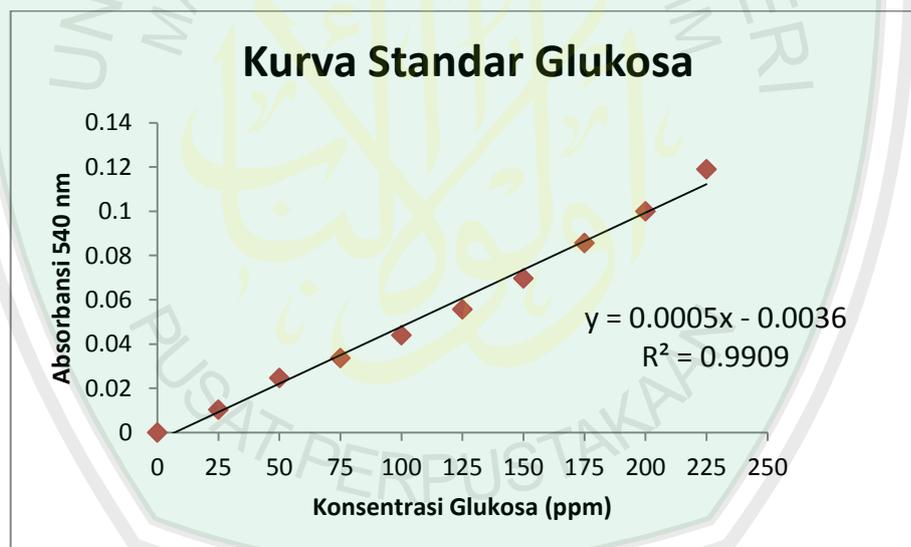
$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 225 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 4,5 \text{ mL larutan stok glukosa} + 95,5 \text{ mL aquades}$$

L.3.2 Data Hasil Absorbansi

Konsentrasi glukosa (ppm)	Absorbansi			
	I	II	III	Rata-Rata
0	0,000	0,000	0,000	0,000
25	0,009	0,011	0,011	0,010
50	0,025	0,024	0,025	0,025
75	0,034	0,034	0,033	0,034
100	0,044	0,044	0,044	0,044
125	0,056	0,056	0,055	0,056
150	0,071	0,070	0,068	0,070
175	0,085	0,086	0,086	0,086
200	0,100	0,099	0,101	0,100
225	0,119	0,120	0,118	0,119

L.3.3 Kurva Standar Glukosa



Lampiran 4. Penentuan Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS

Persamaan regresi linier $y = bx + a$

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{\text{konsentrasi produk glukosa (ppm)} \times H}{\text{BM glukosa} \times \text{waktu inkubasi}} \times \frac{E}{E}$$

Absorbansi terkoreksi = Absorbansi sampel – Absorbansi kontrol

Contoh perhitungan :

(Data diambil dari hasil perlakuan suhu 35 °C (Lampiran 5.1))

Absorbansi terkoreksi = 0,013

Persamaan regresi linier $y = 0,0005x - 0,0036$

Hasil absorbansi terkoreksi : 0,013

Waktu inkubasi : 30 menit

Berat molekul glukosa : 180

H (Volume total enzim-substrat) : 2 mL

E (Volume enzim) : 1 mL

Konsentrasi glukosa :

$$y = 0,0005x - 0,0036$$

$$y = \text{absorbansi}$$

$$x = \text{konsentrasi glukosa}$$

maka :

$$0,013 = 0,0005x - 0,0036$$

$$x = 33 \text{ ppm}$$

$$\text{Aktivitas Selulase} = (33 : (180 \times 30)) \times (2 : 1) = 0,012 \text{ U/mL.}$$

Lampiran 5. Data Aktivitas Enzim Selulase berdasarkan Perlakuan Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat

L.5.1 Hasil Perlakuan Suhu terhadap Aktivitas Selulase

Suhu (°C)	Ulangan	Absorbansi terkoreksi	Konsentrasi glukosa (ppm)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Rata-rata Aktivitas Enzim (U/mL)
35 °C	I	0.013	33	0.012	0.012
	II	0.015	37	0.014	
	III	0.009	26	0.010	
	IV	0.012	32	0.012	
	V	0.012	31	0.011	
45 °C	I	0.021	50	0.019	0.024
	II	0.035	77	0.029	
	III	0.031	69	0.026	
	IV	0.027	62	0.023	
	V	0.028	63	0.023	
55 °C	I	0.061	130	0.048	0.045
	II	0.053	113	0.042	
	III	0.057	121	0.045	
	IV	0.053	113	0.042	
	V	0.061	129	0.048	
65 °C	I	0.067	141	0.052	0.052
	II	0.069	145	0.054	
	III	0.068	144	0.053	
	IV	0.068	144	0.053	
	V	0.064	135	0.050	
75 °C	I	0.025	57	0.021	0.018
	II	0.026	60	0.022	
	III	0.019	46	0.017	
	IV	0.012	31	0.011	
	V	0.020	48	0.018	

L.5.2 Hasil Perlakuan pH terhadap Aktivitas Selulase

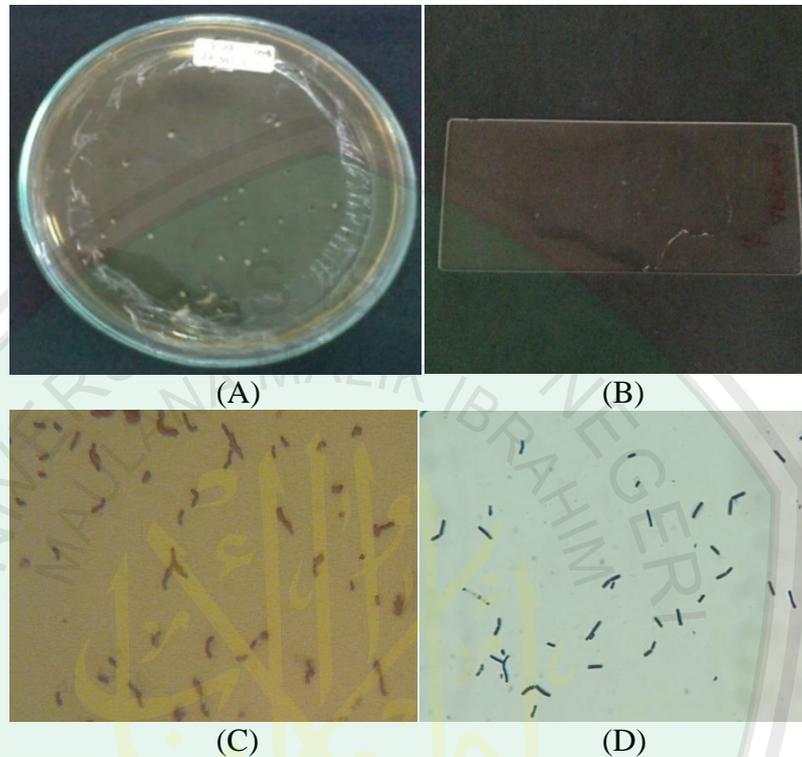
pH	Ulangan	Absorbansi terkoreksi	Konsentrasi glukosa (ppm)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Rata-rata Aktivitas Enzim (U/mL)
5	I	0.024	56	0.021	0.019
	II	0.023	54	0.020	
	III	0.017	42	0.016	
	IV	0.022	51	0.019	
	V	0.020	48	0.018	
6	I	0.050	107	0.040	0.043
	II	0.050	108	0.040	
	III	0.067	141	0.052	
	IV	0.044	95	0.035	
	V	0.061	129	0.048	
7	I	0.078	163	0.060	0.054
	II	0.067	142	0.053	
	III	0.071	149	0.055	
	IV	0.062	131	0.049	
	V	0.071	149	0.055	
8	I	0.022	51	0.019	0.023
	II	0.028	63	0.023	
	III	0.027	61	0.023	
	IV	0.032	72	0.027	
	V	0.031	70	0.026	
9	I	0.014	35	0.013	0.014
	II	0.005	18	0.007	
	III	0.016	39	0.014	
	IV	0.016	39	0.014	
	V	0.023	53	0.020	

L.5.3 Hasil Perlakuan Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Selulase

Konsentrasi substrat (%)	Ulangan	Absorbansi terkoreksi	Konsentrasi glukosa (ppm)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Rata-rata Aktivitas Enzim (U/mL)
0.5	I	0.022	52	0.019	0.026
	II	0.022	52	0.019	
	III	0.040	88	0.033	
	IV	0.041	89	0.033	
	V	0.034	76	0.028	
1	I	0.075	157	0.058	0.054
	II	0.064	135	0.050	
	III	0.069	144	0.053	
	IV	0.068	143	0.053	
	V	0.070	147	0.054	
1.5	I	0.085	177	0.066	0.060
	II	0.082	171	0.063	
	III	0.074	156	0.058	
	IV	0.076	159	0.059	
	V	0.067	142	0.053	
2	I	0.018	44	0.016	0.017
	II	0.017	41	0.015	
	III	0.016	39	0.014	
	IV	0.025	57	0.021	
	V	0.024	55	0.020	
2.5	I	0.011	29	0.011	0.010
	II	0.012	32	0.012	
	III	0.012	31	0.011	
	IV	0.009	25	0.009	
	V	0.008	23	0.009	

Lampiran 6. Dokumentasi

L.6.1 Pengamatan Uji Pendahuluan Isolat *Lactobacillus plantarum*



Keterangan : (A) : Morfologi koloni *L. plantarum* berbentuk bulat rata, warna putih susu dengan ukuran 0,5-1,2 mm, (B) : Negatif katalase, (C) Endospora negatif dan (D) Gram positif

L.6.2 Pengamatan Zona Jernih *L. plantarum* pada Media CMC 1%



Keterangan : (A) Zona jernih hasil inkubasi 24 jam dan (B) inkubasi 48 jam

L.6.3 Proses Uji Aktivitas Enzim Secara Kuantitatif



(A)

(B)

(C)



(D)

(E)

(F)



(G)

(H)

Keterangan : (A) dan (B) Sentrifugasi dingin untuk memisahkan ekstrak kasar enzim (supernatant) dengan sel bakteri (pellet), (C) Ekstrak kasar enzim selulase, (D) Ekstrak kasar enzim dan substrat CMC, (E) Proses inkubasi pada suhu sesuai perlakuan, (F) Penghentian reaksi enzim dan substrat dengan penambahan DNS dan pemanasan, (G) Ekstrak kasar enzim + substrat CMC + reagen DNS dan KNa-Tartrat yang siap diuji spektrofotometer, dan (H) Pengujian pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 59 Telp. (0341) 558933, Fax. (0341) 558933 Malang

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Syarafina Putri
NIM : 12620060
Fakultas/ Jurusan : Sains dan Teknologi/ Biologi
Judul Skripsi : Karakterisasi Enzim Selulase yang Dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat
Pembimbing : Ir. Liliek Harianie A.R., M.P

No.	Tanggal	Perihal	Tanda Tangan
1.	15 Februari 2016	Konsultasi Judul	
2.	18 Februari 2016	Konsultasi Bab I dan III	
3.	19 Februari 2016	Revisi Bab I dan III	
4.	22 Februari 2016	Revisi Bab I	
5.	29 Februari 2016	Revisi Bab I dan Konsultasi Bab II	
6.	09 Maret 2016	Revisi Bab II dan III	
7.	18 Maret 2016	Revisi Bab III	
8.	21 Maret 2016	ACC Bab I, II dan III	
9.	15 Juni 2016	Konsultasi Bab IV dan V	
10.	16 Juni 2016	Revisi Bab IV dan V	
11.	20 Juni 2016	ACC Skripsi	
12.	14 Juli 2016	ACC Keseluruhan	

Malang, 15 Juli 2014

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



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



KEMENTERIAN AGAMA
 UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
 FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
 JURUSAN BIOLOGI
 Jl. Gajayana No. 50 Telp. (0341) 558933, Fax. (0341) 558933 Malang

BUKTI KONSULTASI AGAMA

Nama : Syarafina Putri
 NIM : 12620060
 Fakultas/ Jurusan : Sains dan Teknologi/ Biologi
 Judul Skripsi : Karakterisasi Enzim Selulase yang Dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat
 Pembimbing : Dr. Ahmad Barizi, M.A

No.	Tanggal	Perihal	Tanda Tangan
1.	22 Februari 2016	Konsultasi Bab I	
2.	29 Februari 2016	Revisi Bab I	
3.	02 Februari 2016	Konsultasi Bab II	
4.	09 Maret 2016	Revisi Bab II	
5.	21 Maret 2016	ACC Bab I, II dan III	
6.	15 Juni 2016	Konsultasi Bab IV	
7.	16 Juni 2016	Revisi Bab IV	
8.	19 Juni 2016	ACC Skripsi	
9.	11 Juli 2016	ACC Keseluruhan	

Malang, 15 Juli 2014
 Mengetahui,
 Ketua Jurusan Biologi



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

