

**PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITAS  
ENZIM AMILASE YANG DIHASILKAN OLEH *Bacillus sp.***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
GILANG KURNIA RAMADHAN  
NIM. 17630021**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2023**

**PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITAS  
ENZIM AMILASE YANG DIHASILKAN OLEH *Bacillus sp.***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
GILANG KURNIA RAMADHAN  
NIM. 17630021**

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

**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2023**

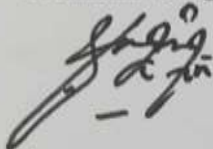
**PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITAS  
ENZIM AMILASE YANG DIHASILKAN OLEH *Bacillus sp.***

**SKRIPSI**

**Oleh:**  
**Gilang Kurnia Ramadhan**  
**NIM. 17630021**

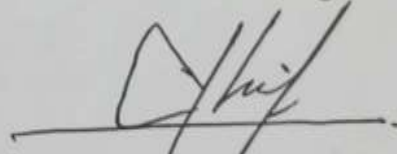
**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:**  
**Tanggal 20 Desember 2023**

**Pembimbing I**



**Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P**  
**NIDT. 19760105 20180201 2 248**

**Pembimbing II**



**Ahmad Hanapi, M.Sc**  
**NIDT. 1985122520160801 1 069**



**PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITAS  
ENZIM AMILASE YANG DIHASILKAN OLEH *Bacillus sp.***

**SKRIPSI**

**Oleh:**  
**Gilang Kurnia Ramadhan**  
**NIM. 17630021**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 20 Desember 2023**

**Penguji Utama** : Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P  
NIP. 19750410 200501 2 009

**Ketua Penguji** : Rif'atul Mahmudah, M.Si  
NIP. 19830125 202321 2 020

**Sekretaris Penguji** : Dr. Anik Maunatin, S.T, M.P  
NIDT. 19760105 20180201 2 248

**Anggota Penguji** : Ahmad Hanapi, M.Sc  
NIDT. 19851225 20160801 1 069

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)



## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Gilang Kurnia Ramadhan

NIM : 17630021

Program Studi : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim  
Amilase Yang Dihasilkan Oleh *Bacillus sp.*

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

Malang, 27 Desember 2023  
Yang membuat pernyataan



Gilang Kurnia Ramadhan  
17630021

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kehadirat Allah SWT. atas nikmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan dan mengajukan skripsi dengan judul **“PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITAS ENZIM AMILASE YANG DIHASILKAN OLEH *Bacillus sp.*”**. Shalawat serta salam tidak lupa kami curahkan kepada junjungan nabi kita, nabi agung Muhammad Sallallahu Alaihi Wassalam yang telah membawa kita dari zaman kegelapan menuju zaman yang terang-benderang sehingga umatnya menjadi golongan manusia bertaqwa dan berilmu yang berlandaskan Al- Qur'an dan Hadits.

Skripsi ditulis dan disusun untuk memenuhi salah satu syarat melakukan penelitian tugas akhir. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca secara umum dan khususnya bagi penulis. Selain itu, tulisan ini diharapkan menjadi bahan pembelajaran bagi penulis serta dapat dimanfaatkan sebagai referensi tambahan dan pengembangan di bidang ilmu pengetahuan. Penulis dalam proses penyusunan proposal penelitian menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga kritik dan saran yang membangun diperlukan demi perbaikan proposal penelitian.

Selama proses penyusunan skripsi, penulis mendapatkan bimbingan serta bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan rasa syukur dan terima kasih kepada:

1. Allah SWT. yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya
2. Ayah dan Mama serta Ibu yang telah memberikan bantuan secara fisik dan psikis dalam berbagai hal

3. Bapak Prof. Dr. H. M. Zainuddin, M.A. selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
5. Ibu Eny Yulianti, M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan, motivasi, dan nasihat selama penulis menjalani pendidikan
6. Ibu Dr. Anik Maunatin, S.T.,M.P selaku dosen pembimbing yang telah sabar memberikan bimbingan dan nasihat kepada penulis
7. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan bimbingan integrasi Al-Qur'an dan Hadits yang sesuai dengan penelitian penulis
8. Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P selaku dosen penguji 1 yang telah memberikan bimbingan, kritik, dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan baik
9. Ibu Rif'atul Mahmudah, M.Si selaku dosen penguji 2 yang juga telah memberikan bimbingan, kritik, dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan baik

Penulis berharap semua pihak yang telah membantu penulis diberikan balasan yang lebih baik dari Allah SWT. dan terlepas dari segala kekurangan penulis, tulisan ini bermanfaat bagi pembaca sekalian. Terima kasih.

Malang, 30 November 2023

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>ملخص البحث.....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan .....	5
1.4 Batasan Masalah .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Karakteristik Pati .....	7
2.2 Karakteristik Enzim Amilase.....	9
2.2.1 Enzim $\alpha$ -Amilase .....	11
2.2.2 Enzim $\beta$ -amilase .....	11
2.2.3 Enzim $\gamma$ -amilase .....	11
2.3 Produksi dan Pemanfaatan Enzim Amilase .....	11
2.3.1 Gelatinisasi .....	13
2.3.2 Likuifikasi.....	13
2.3.3 Sakarifikasi .....	14
2.4 Karakteristik Bakteri Genus <i>Bacillus</i> .....	14
2.4.1 Fase Adaptasi ( <i>Lag Phase</i> ) .....	16
2.4.2 Fase Eksponensial ( <i>Exponential Phase</i> ).....	16
2.4.3 Fase Tetap ( <i>Stationary Phase</i> ).....	16
2.4.4 Fase Kematian ( <i>Death Phase</i> ) .....	17
2.5 Metode Analisis Aktivitas Enzim Amilase Bakteri Genus <i>Bacillus</i> .....	17
2.5.1 Analisis Kualitatif Enzim Amilase dengan Reagen Iodida .....	18
2.5.2 Analisis Kuantitatif Enzim Amilase dengan Metode DNS .....	19
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>22</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
3.2 Alat dan Bahan .....	22
3.2.1 Alat .....	22
3.2.2 Bahan .....	22
3.3 Rancangan Penelitian .....	23
3.4 Tahapan Penelitian .....	23
3.5 Cara Kerja.....	24



3.4.1 Preparasi dan Pembuatan Media.....	24
3.4.2 Peremajaan Bakteri .....	24
3.4.3 Pembuatan Inokulum <i>Bacillus sp.</i> .....	25
3.4.4 Produksi Enzim Amilase oleh <i>Bacillus sp.</i> .....	25
3.4.5 Uji Kuantitatif Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS.....	25
3.4.6 Uji Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Amilase.....	27
3.4.7 Analisis Data.....	27
<b>BAB IV PEMBAHASAN.....</b>	<b>28</b>
4.1 Kajian Bakteri Amilolitik dalam Pandangan Islam.....	28
4.2 Preparasi dan Pembuatan Media.....	29
4.3 Peremajaan Bakteri.....	31
4.4 Pembuatan Inokulum <i>Bacillus sp.</i> .....	32
4.5 Produksi Enzim Amilase oleh <i>Bacillus sp.</i> .....	34
4.6 Uji Kuantitatif Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS.....	36
4.6.1 Kurva Standar Glukosa .....	36
4.6.2 Uji Aktivitas Enzim Amilase.....	38
4.7 Uji Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Amilase.....	39
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>43</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>49</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1	Ikatan glikosida amilosa dan amilopektin pada pati (Bashir & Aggarwal, 2019).....	9
Gambar 2. 2	Reaksi hidrolisis pati oleh enzim amilase yang dihasilkan oleh <i>Pseudomonas stutzeri</i> (Nangin & Sutrisno, 2015) .....	10
Gambar 2. 3	Hasil positif (zona bening) pada analisis kualitatif aktivitas enzim amilase (Al-Johani dkk., 2016) .....	18
Gambar 2. 4	Reaksi glukosa dengan reagen iodida (Fleischer, 2019).....	19
Gambar 2. 5	Hasil negatif (zona biru tua) pada analisis kualitatif aktivitas enzim amilase (Elmansy dkk., 2018).....	19
Gambar 2. 6	Larutan kuning hasil penambahan DNS kedalam campuran pati dan enzim amilase (Miksusanti dkk., 2019).....	20
Gambar 2. 7	Larutan merah bata hasil pemanasan campuran DNS, pati, dan enzim amilase (Miksusanti dkk., 2019).....	20
Gambar 2. 8	Reaksi DNS dengan gula pereduksi (Nisa dkk., 2020).....	21
Gambar 4. 1	Hasil peremajaan <i>Bacillus sp.</i> .....	32
Gambar 4. 2	Media NB berisi inokulum stok <i>Bacillus sp.</i> setelah 18 jam inkubasi (a) dan media NB murni setelah 18 jam inkubasi (b) .....	33
Gambar 4. 3	Inokulum <i>Bacillus sp.</i> OD 0,5 sebanyak 25 mL .....	34
Gambar 4. 4	Media SSB setelah penambahan 10 ml inokulum <i>Bacillus sp.</i> OD 0,5 dan inkubasi 24 jam (a) serta media SSB murni setelah 24 jam inkubasi (b).....	35
Gambar 4. 5	Enzim amilase yang dihasilkan oleh <i>Bacillus sp.</i> .....	36
Gambar 4. 6	Reaksi DNS dengan gula pereduksi (Nisa dkk., 2020).....	37
Gambar 4. 7	Kurva standar glukosa.....	38
Gambar 4. 8	Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase..	40

## DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase.....	23
Tabel 5. 1 Absorbansi Larutan Standar Glukosa.....	53

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian .....	49
Lampiran 2 Diagram Alir Penelitian.....	50
Lampiran 3. Perhitungan.....	52
Lampiran 4 Kurva Standar Glukosa.....	53
Lampiran 5 Absorbansi Sampel dan Aktivitas Enzim Amilase.....	54
Lampiran 6 Konsentrasi Glukosa.....	54
Lampiran 7 Aktivitas Enzim Amilase.....	54
Lampiran 8 Analisis Statistika .....	55
Lampiran 9 Dokumentasi.....	55

## ABSTRAK

Ramadhan, Gilang Kurnia. 2023. **Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Amilase Yang Dihasilkan Oleh *Bacillus sp.***. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Pembimbing I: Dr. Anik Maunatin, M.P ; Pembimbing II: Ahmad Hanapi, M.Sc,

---

**Kata Kunci:** *Bacillus sp.*, Pati, Enzim Amilase, DNS, Aktivitas Enzim

Enzim Amilase dikenal sebagai enzim yang bekerja dalam proses hidrolisis pati menjadi senyawa gula sederhana. *Bacillus sp.* yang diisolasi dari tanaman ubi jalar kuning (*Ipomoea batatas*) telah diketahui mampu memproduksi enzim amilase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* menggunakan metode DNS dengan variasi konsentrasi substrat 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* memiliki aktivitas tertinggi pada konsentrasi substrat sebesar 0,5% dengan aktivitas enzim amilasena mencapai 14,108 U/mL. Berdasarkan analisis variasi (*ANOVA*) pada selang kepercayaan ( $\alpha=0,05$ ) menunjukkan bahwa konsentrasi substrat tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim amilase dari *Bacillus sp.*

## ABSTRACT

Ramadhan, Gilang Kurnia. 2023. **The Effect of Substrate Concentration on The Activity of Amylase Enzyme Produce by *Bacillus sp.***. Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Supervisor I: Dr. Anik Maunatin, M.P ; Supervisor II: Ahmad Hanapi, M.Sc,

---

**Key words:** *Bacillus sp.*, Starch, Amylase, DNS, Enzyme Activity

Amylase is known as an enzyme that works in the process of hydrolysis of starch into simple sugar compounds. *Bacillus sp.* isolated from the yellow sweet potato plant (*Ipomoea batatas*) is known to be able to produce the enzyme amylase. This research aims to determine the effect of substrate concentration on the activity of the amylase enzyme produced by *Bacillus sp.* using the DNS method with variations in substrate concentration of 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5%. The results showed that the amylase enzyme produced by *Bacillus sp.* has the highest activity at a substrate concentration of 0.5% with amylase enzyme activity reaching 14,108 U/mL. Based on analysis of variation (*ANOVA*) on the confidence interval ( $\alpha=0.05$ ), it shows that substrate concentration has no effect on the activity of the amylase enzyme from *Bacillus sp.*

## اد بحث ملخص

رمضان، جيلانج كورنيا. 2023. تأثير تركيز الركيزة على نشاط إنزيم الأميليز الذي تنتجه عصبية س.ف. بحث جامعي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج، المشرفة الأولى: الدكتورة أنيك ماؤنة، الماجستير؛ المشرف الثاني: أحمد حني، الماجستير

الكلمات الرئيسية: عصبية س.ف، النشا، إنزيم الأميليز، DNS، نشاط الإنزيم

يعرف إنزيم الأميليز بأنه إنزيم يعمل في عملية التحلل المائي للنشا إلى مركبات سكر بسيطة. عصبية س.ف من المعروف أن المعزولة من نبات البطاطا الحلوة الصفراء (*Ipomoee batatas*) تنتج إنزيم الأميليز. يهدف هذا البحث إلى تحديد تأثير تركيز الركيزة على نشاط إنزيم الأميليز الناتج عن عصبية س.ف باستخدام طريقة DNS مع اختلاف تركيز الركيزة 0.5؛ 1؛ 1.5؛ 2؛ 2.5%. أظهرت النتائج أن إنزيم الأميليز الذي تنتجه عصبية س.ف لديه أعلى نشاط عند تركيز الركيزة بنسبة 0.5% مع نشاط إنزيم الأميليز الذي يصل إلى 14.108 U/mL. استنادا إلى تحليل التباين (*ANOVA*) على فترات الثقة ( $\alpha = 0,05$ ) أظهر أن تركيز الركيزة لم يكن له أي تأثير على نشاط إنزيم الأميليز من عصبية س.ف.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim adalah protein yang terdiri atas serangkaian asam amino dalam susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim memegang peranan penting dalam proses berbagai reaksi biokimia dalam sel seperti konversi energi, metabolisme pertahanan sel, komunikasi antar sel hingga koversi sifat keturunan (Wahyuni dkk., 2017). Selain itu, enzim juga diartikan sebagai biokatalisator yang bekerja secara optimal pada kondisi lingkungan tertentu. Sistem kerja enzim yang demikian membuat enzim dapat dimanfaatkan dalam berbagai hal. Salah satu enzim yang sering dimanfaatkan adalah enzim amilase yang berfungsi sebagai agen pendegradasi pati (Lin dkk., 2021; Paul dkk., 2020). Pemanfaatan enzim amilase dapat dijumpai pada proses sakarifikasi, fermentasi, serta pembuatan kertas dan tekstil (Divakaran dkk., 2011). Seiring dengan perkembangan ilmu bioteknologi, pemanfaatan enzim amilase meluas hingga bidang farmasi, pangan, dan industri (Megahati dkk., 2017).

Sumber isolasi enzim amilase umumnya dapat diisolasi dari tanaman, bagian tubuh hewan, serta mikroorganisme seperti jamur dan bakteri (Luang-In dkk., 2019). Akan tetapi dalam praktiknya, bakteri menjadi pilihan utama dalam produksi enzim amilase. Hal ini dibuktikan dengan kemampuan bakteri untuk hidup dalam kondisi lingkungan yang dapat diatur (Rengasamy & Thangaprakasam, 2018). Beberapa penelitian menyebutkan bakteri yang berasal dari golongan *Clostridium* (Su dkk., 2016), *Pseudomonas* (Mulyani dkk., 2018),



*Bacillus* (Msarah dkk., 2020), dan *Lactobacillus* (Istia'nah dkk., 2020) terbukti dapat dimanfaatkan sebagai sumber penghasil enzim amilase. Bakteri sebagai salah satu makhluk hidup yang memberikan banyak manfaat adalah suatu tanda kebesaran Allah bagi para hamba-Nya dan telah disinggung dalam firman Allah pada surah Al- Jasiyah [45]: 4 sebagai berikut:

وَفِي خَلْقِكُمْ وَمَا يَبُتُّ مِنْ دَابَّةٍ آيَاتٌ لِّقَوْمٍ يُوقِنُونَ

**Artinya:**

“Dan pada penciptaan dirimu dan pada makhluk bergerak yang bernyawa yang bertebaran (di bumi) terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) untuk kaum yang meyakini” (Al- Jasiyah [45]:4).

Surat Al- Jasiyah [45]:4, dilansir dari laman *Pustaka Lajnah Kementrian Agama Republik Indonesia* dalam buku yang berjudul *Jasad Renik dalam Perspektif Al-Qur'an dan Sains* menjelaskan bahwa ayat tersebut mengandung kata دَابَّةٍ (*dabbah*). Kata *dabbah* biasa diterjemahkan sebagai makhluk melata dan semua jenis makhluk hidup ciptaan Allah yang telah diketahui oleh manusia atau yang belum pernah diketahui oleh manusia. *Dabbah* merujuk pada jasad renik, yaitu makhluk hidup yang akan nampak ketika dilihat dengan bantuan alat. Berdasarkan ilmu bioteknologi, *dabbah* dapat merujuk pada bakteri yang merupakan jasad renik atau mikroorganisme (Pham dkk., 2019). Selain itu, pada penggalan ayat آيَاتٌ لِّقَوْمٍ يُوقِنُونَ yang berarti *terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) untuk kaum yang meyakini* menyiratkan untuk mengajak manusia agar melihat bahwa dalam diri jasad renik terdapat berbagai tanda keagungan kuasa dan kebijaksanaan Allah yang dapat menjadi pembelajaran bagi orang-orang yang yakin dan mau menerima kebenaran. Sebagai contoh, hal ini telah dibuktikan dan didukung secara ilmiah bahwa salah satu spesies bakteri yaitu *Bacillus sp.* ternyata memiliki kemampuan untuk dapat memproduksi enzim amilase. Enzim

amilase yang dihasilkan juga telah terbukti mampu menghidrolisis senyawa gula kompleks menjadi komponen gula yang lebih sederhana serta sering dimanfaatkan pada sektor industri pangan, farmasi, dan industri kimia (Elmansy dkk., 2018).

Pati merupakan polimer gula kompleks yang tersusun atas rantai gula lurus yang disebut amilosa dan amilopektin, yaitu rantai gula yang mampu membentuk rantai gula lurus dan pada percabangannya (Munegumi dkk., 2016). Pada proses degradasi pati, enzim amilase akan mendegradasi pati secara acak menghasilkan glukosa (Ardhi dkk., 2020). Seberapa banyak jumlah glukosa yang dihasilkan dalam proses degradasi pati dapat dinyatakan sebagai aktivitas enzim (Lin dkk., 2021). Secara umum, aktivitas enzim yang dihasilkan dapat digambarkan sebagai jumlah enzim yang mengkatalisis pembentukan produk (Wahyuni dkk., 2017). Selain itu, efektivitas kerja enzim juga dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan seperti suhu, tingkat asam-basa (pH), konsentrasi mineral, dan konsentrasi substrat yang digunakan (McDonald & Tipton, 2022; Megahati dkk., 2017). Oleh karena itu, kajian mengenai efektivitas kerja enzim amilase pada kondisi reaksi tertentu hingga saat ini terus dilakukan.

Konsentrasi substrat pati telah dilaporkan menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh bakteri yang berasal dari genus *Bacillus*. Hal tersebut dilaporkan oleh Al-Johani dkk., (2016) bahwa *Bacillus subtilis* memiliki aktivitas enzim tertinggi sebesar 16 U/mL saat konsentrasi pati (substrat) 0,5%. Pada konsentrasi substrat sebesar 1% Alonazi dkk., (2020) membuktikan bahwa *Bacillus pacificus* memiliki aktivitas enzim amilase sebesar 35 U/mL. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Megahati dkk., (2017) membuktikan bahwa *Bacillus licheniformis* memiliki aktivitas enzim

amilase sebesar 72,27 U/mL pada konsentrasi substrat sebesar 1,5%. Menggunakan konsentrasi substrat yang sama, *Bacillus megaterium* yang diisolasi oleh Istia'nah dkk., (2020) hanya memiliki aktivitas enzim amilase sebesar 0,548 U/mL. Akan tetapi, ketika konsentrasi substrat ditinggikan hingga 2%, Elmansy dkk., (2018) berhasil membuktikan bahwa aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* mencapai  $12,42 \pm 0,06$  U/mL. Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, dapat diketahui bahwa spesies bakteri yang berbeda dalam satu genus yang sama menghasilkan aktivitas enzim amilase yang berbeda serta konsentrasi substrat yang diberikan juga terbukti mampu menghasilkan aktivitas enzim amilase yang berbeda. Hal ini menyebabkan suatu spesies bakteri dalam menghasilkan aktivitas enzim amilase perlu dilakukan eksplorasi lebih lanjut dengan melakukan pengujian terhadap konsentrasi substrat. Merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Megahati dkk., (2017) menunjukkan bahwa pada variasi konsentrasi substrat sebesar 0,5; 1; 1,5; 2% memiliki aktivitas enzim amilase berturut-turut yaitu 56,55; 71,14; 72,27; 65,07 U/mL. Hasil tersebut menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata sehingga perlu dilakukan eksplorasi lebih dalam dengan melakukan pengujian konsentrasi substrat pada jangkauan yang lebih luas, sehingga pada penelitian ini variasi konsentrasi substrat yang diuji berada pada 0,5; 1; 1,5; 2 hingga 2,5% menggunakan bakteri *Bacillus sp.*

Penjelasan yang telah diuraikan diatas menjadi dasar dilakukannya penelitian tentang pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.*. Konsentrasi pati menjadi sangat penting untuk dikaji sebagai upaya menghindari penggunaan substrat pati yang tidak terkendali sehingga menghasilkan aktivitas enzim amilase yang tidak diinginkan sekaligus

menghindari pembuangan limbah (pati) berlebih menuju lingkungan. Hasil dari penelitian ini juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan referensi untuk penelitian yang sejenis.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.*

## **1.3 Tujuan**

Tujuan pada penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.*

## **1.4 Batasan Masalah**

1. Spesies bakteri yang digunakan adalah *Bacillus sp.* hasil isolasi dari ubi jalar kuning (*Ipomoea batatas*) koleksi Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Penelitian ini menggunakan substrat pati dengan konsentrasi pati yang digunakan adalah 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 %

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Manfaat penelitian ini adalah memberikan gambaran bahwa *Bacillus sp.* dapat digunakan sebagai alternatif produsen enzim amilase beserta konsentrasi substrat optimal yang mampu menghasilkan aktivitas enzim amilase tertinggi.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Karakteristik Pati**

Pati merupakan polimer karbohidrat yang disusun dari monomer-monomer glukosa yang membentuk rantai amilosa dan amilopektin. Pati terdapat banyak dalam sel tanaman dan secara mikroskopis ditemukan berbentuk butiran-butiran kecil yang disebut granula (Cornejo-Ramírez dkk., 2018). Secara kimia, pati juga dikenal sebagai amilosa dengan rumus kimia  $C_6H_{10}O_5$ , digolongkan sebagai material biologi yang bersifat rapuh karena tidak dapat bertahan pada tekanan dan suhu tinggi serta tidak resisten terhadap bahan kimia tertentu (Golachowski dkk., 2020). Selain itu, secara fisika pati merupakan polisakarida berwarna putih serta tidak memiliki rasa dan bau (Bashir & Aggarwal, 2019). Seiring berkembangnya ilmu biokimia, pati dimanfaatkan secara luas dalam bidang farmasi dan kesehatan, pangan, pertanian, dan bidang industri (Omoregie, 2020).

Tanaman merupakan makhluk hidup yang mampu memproduksi pati berlebih dan disimpan didalam akar, umbi, atau biji (Bashir & Aggarwal, 2019). Beberapa tanaman yang telah diketahui sebagai sumber produsen pati adalah ubi kayu kristal merah (*Manihot esculenta*) yang mengandung pati sebanyak 25% (Hartati & Hartati, 2019), jahe merah (*Zingiber officinale Rosc.*) mengandung pati 40-60% pati, serta millet mutiara (*Pennisetum glaucum*) mengandung 70% pati. Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, tampak bahwa tanaman sebagai makhluk ciptaan Allah yang dapat memproduksi pati menjadi satu bentuk karunia yang Allah berikan di dunia agar dapat dimanfaatkan sebaik mungkin untuk

meningkatkan kualitas hidup manusia. Hal tersebut telah terkandung dalam firman Allah surah Asy-Syu'ara [19]: 7-8 sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۚ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّمَنْ كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ ۝ ۸

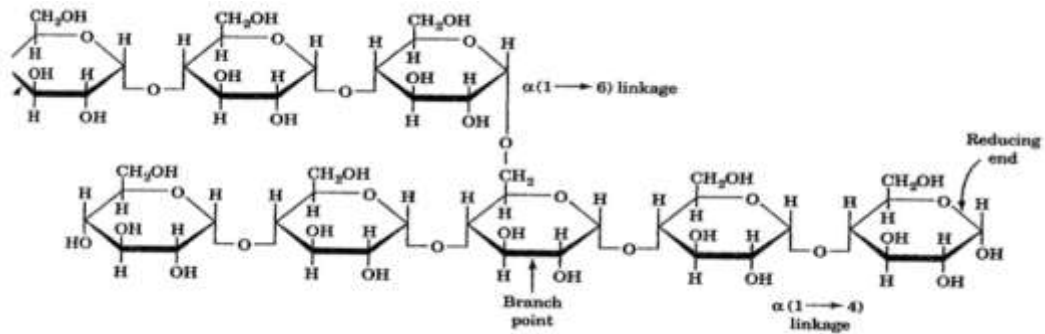
**Artinya:**

*“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?. Sungguh, pada yang demikian itu terdapat tanda (kebesaran Allah), tetapi kebanyakan mereka tidak beriman”*( Asy-Syu'ara [19]: 7-8).

Tanaman yang telah ditumbuhkan oleh Allah di bumi sejatinya dapat digunakan untuk memenuhi kebutuhan manusia. Berdasarkan tafsir Al- Misbah pada penggalan ayat *أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ* yang memiliki arti *apakah mereka tidak memperhatikan bumi*, menyiratkan akan adanya anjuran bagi manusia untuk memandang bumi secara menyeluruh dengan berbagai jenis tanah dan tanaman serta berbagai keajaiban lain yang terdapat pada tanaman tersebut (Shihab & Shihab, 2012). Hal ini terbukti bahwa beras yang sering dikonsumsi oleh manusia merupakan sumber makanan tinggi pati dengan kandungan pati mencapai 26,56%. Selain itu, pati yang terkandung dalam sebuah tanaman yang dianalisis juga dapat menentukan kualitas tanaman serta waktu panen yang sesuai untuk memperoleh hasil panen (dengan kandungan pati) yang melimpah (Syamsiah & Masliah, 2019).

Pati disusun dari 2 polimer glukosa yaitu amilosa dan amilopektin (Cornejo-Ramírez dkk., 2018). Amilosa diketahui merupakan polimer yang disusun oleh uni-unit glukosa yang membentuk ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosida lurus dan tidak bercabang serta memiliki struktur heliks yang terdiri dari 200-2000 satuan anhidroglukosa (Masrukan, 2020). Berbeda dengan amilosa, amilopektin merupakan polimer unit-unit glukosa yang membentuk ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosida

lurus dan  $\alpha$ -1,6-glikosida pada percabangannya yang terdiri dari 10.000-100.000 satuan anhidroglukosa (Munegumi dkk., 2016). Ikatan glikosida pada amilosa dan amilopektin ditampilkan pada gambar berikut:



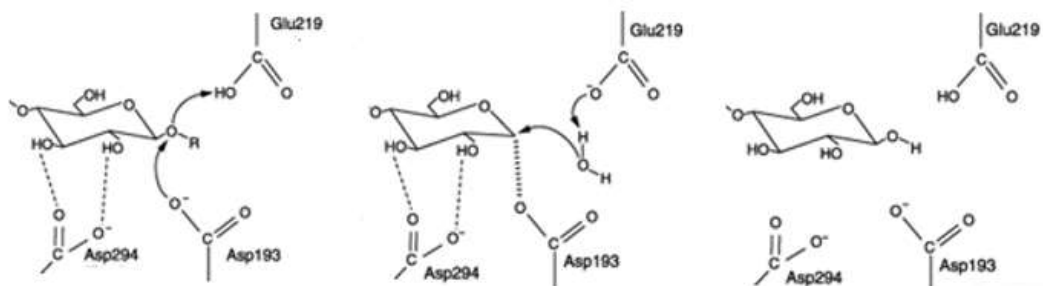
Gambar 2. 1 Ikatan glikosida amilosa dan amilopektin pada pati (Bashir & Aggarwal, 2019).

## 2.2 Karakteristik Enzim Amilase

Enzim merupakan biokatalis yang memegang peranan penting dalam berbagai reaksi kimia yang terjadi di dalam tubuh makhluk hidup. Badan Enzim International (*The International Enzyme Commission*) telah mengklasifikasikan enzim menjadi 6 golongan enzim berdasarkan reaksi enzim terhadap substrat yang berbeda, secara berurutan penggolongan enzim tersebut adalah EC1 oksidoreduktase, EC2 transferase, EC3 hidrolase, EC4 Liase, EC5 Isomerase, dan EC6 Ligase (Farooq dkk., 2021). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Alonazi dkk., (2020) enzim amilase masuk kedalam kelompok enzim hidrolase yang bekerja spesifik pada substrat pati. Selain itu, Enzim amilase juga termasuk kedalam *metalloenzyme*, yaitu enzim yang mengandung ion logam. Telah diketahui bahwa enzim amilase merupakan enzim yang mampu mengikat ion logam kalsium (Ca), sehingga aktivitas enzim amilase yang dihasilkan akan sangat bergantung pada kofaktor Ca (Papoutsis dkk., 2021).



Secara molekuler, degradasi enzim amilase dibantu oleh residu asam amino yang terdapat pada sisi aktif enzim. Sebagai contoh, enzim amilase yang diisolasi dari *Pseudomonas stutzeri* dapat mendegradasi pati dengan dibantu oleh tiga residu asam amino berupa asam glutamat 219 (Glu219), asam aspartat 294 (Asp294), dan asam aspartat 193 (Asp193). Tahap pertama diawali dengan pengikatan substrat dengan Asp294 dan dilanjutkan dengan Glu219 dalam bentuk asam akan mendonorkan proton menuju oksigen pada ikatan glikosida substrat. Produk dari reaksi tersebut akan menghasilkan ion oksokarbonium pada keadaan transisi yang diikuti dengan pembentukan kovalen intermediet. Molekul H<sub>2</sub>O kemudian akan menyerang ikatan kovalen antara oksigen dan residu Asp193. Kemudian asam glutamat akan menerima proton dari molekul H<sub>2</sub>O dan residu Asp193 akan membentuk gugus hidroksil baru pada molekul glukosa. Reaksi degradasi pati oleh enzim amilase ditunjukkan pada gambar berikut (Nangin & Sutrisno, 2015):



Gambar 2. 2 Reaksi hidrolisis pati oleh enzim amilase yang dihasilkan oleh *Pseudomonas stutzeri* (Nangin & Sutrisno, 2015)

Secara spesifik berdasarkan letak reaksinya, enzim amilase dibedakan menjadi tiga jenis enzim amilase:

### **2.2.1 Enzim $\alpha$ -Amilase**

Enzim  $\alpha$ -Amilase (EC: 3.2.1.1) disebut juga sebagai endoenzim yang bekerja dengan cara mendegradasi ikatan glikosida pada pati di sepanjang gugus amilosa bagian dalam dan secara acak memutus ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosida (Nisa dkk., 2020; Savaner & Sohani, 2020). Hasil akhir dari degradasi pati oleh enzim  $\alpha$ -amilase akan menghasilkan produk berupa gula-gula sederhana seperti glukosa, maltosa, dan maltotriosa (Raplong dkk., 2014; Zafer dkk., 2021).

### **2.2.2 Enzim $\beta$ -amilase**

Enzim  $\beta$ -amilase (EC: 3.2.1.2) merupakan eksoenzim yang bekerja dengan cara mendegradasi dua unit glukosa yang terdapat pada ujung molekul pati secara berurutan sehingga menghasilkan maltosa (Oktiarni dkk., 2015; Tazkiah dkk., 2019).

### **2.2.3 Enzim $\gamma$ -amilase**

Enzim  $\gamma$ -amilase bekerja dengan cara memutus ikatan 1,4-glikosida pada gugus amilosa dan 1,6-glikosida pada gugus amilopektin yang dimiliki oleh glikogen. Hasil akhir dari degradasi ini akan menghasilkan molekul glukosa (Tazkiah dkk., 2019).

## **2.3 Produksi dan Pemanfaatan Enzim Amilase**

Enzim amilase secara umum dapat diperoleh dari tanaman, bagian tubuh hewan, dan mikroorganisme seperti jamur dan bakteri. Beberapa sumber isolasi enzim amilase yang telah terbukti oleh penelitian adalah enzim amilase dapat

diisolasi dari biji nangka (Tazkiah dkk., 2019) dan kecambah kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) (Pratantie dkk., 2021) serta spesies jamur seperti *Aspergillus niger* (Behailu & Abebe, 2018). Selain itu, bakteri merupakan sumber komoditas utama dalam produksi enzim amilase dan dapat diisolasi dari golongan *Clostridium* (Su dkk., 2016), *Pseudomonas* (Mulyani dkk., 2018), *Bacillus* (Msarah dkk., 2020), *Lactobacillus* (Istia'nah dkk., 2020), dan *Aspergillus* (Beltagy dkk., 2022).

Produksi enzim amilase menggunakan bakteri dapat dipengaruhi oleh beberapa kondisi lingkungan seperti ketersediaan nutrisi, pH, waktu inkubasi, suhu, serta jenis bakteri yang digunakan. Dalam proses produksi enzim amilase, hanya substrat yang mengandung pati yang dapat digunakan sebagai sumber karbon untuk menstimulus produksi enzim amilase serta mempercepat pertumbuhan dan perkembangan sel bakteri amilolitik (Megahati dkk., 2017). Inkubasi bakteri dari genus *Bacillus* sering kali menggunakan inokulum bakteri yang telah dibiakkan selama 18 jam kemudian dilanjutkan dengan inkubasi lanjutan pada proses produksi enzim amilase selama 24 jam hingga 168 jam (Elmansy dkk., 2018; Luang-In dkk., 2019; Msarah dkk., 2020). Setelah tahap produksi tersebut, ekstraksi enzim amilase dapat dilakukan dengan cara memisahkan komponen padat dan cair menggunakan *centrifuge*. Adapun hasil akhir dari tahap ini adalah ekstrak kasar enzim amilase (Paul dkk., 2020).

Proses purifikasi (pemurnian) ekstrak kasar enzim amilase dapat dilakukan dengan melakukan pengendapan ekstrak kasar enzim amilase dengan senyawa ammonium sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dengan kejenuhan 80% selama 24 jam pada suhu dingin. Setelah itu, proses presipitasi dilakukan dengan menambahkan buffer

asetat 0,1M dengan pH 6. Sedimen yang diperoleh kemudian dilarutkan dan didialisis terhadap 1 L larutan buffer asetat 0,1 M, pH 6 (melalui membran dialysis 10-kDa cut-off) selama 24 jam pada suhu 4<sup>0</sup>C. Proses dialisis dilakukan sebanyak 2 kali dengan menggunakan larutan *fresh* buffer asetat 0,1M, pH 6. Setelah proses purifikasi, aktivitas enzim amilase untuk ekstrak yang terpurifikasi dapat ditentukan (Paul dkk., 2020). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Paul dkk., (2020) terbukti bahwa ekstrak enzim amilase terpurifikasi yang diproduksi oleh *Bacillus tequilensis* memiliki aktivitas enzim yang lebih tinggi yaitu 188,35±0,74 U/mL dengan ekstrak kasar enzim amilasena hanya sebesar 174,27±0,53 U/mL.

Pemanfaatan enzim amilase dapat dijumpai pada industri pembuatan sirup glukosa fungsional. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati & Sutrisno (2015) tahapan pembuatan sirup glukosa fungsional dapat melalui tiga tahapan sebagai berikut:

### **2.3.1 Gelatinisasi**

Gelatinisasi merupakan tahapan awal yang ditandai oleh proses pembengkakan granula pati akibat pemanasan pada suhu tinggi dan menyebabkan terputusnya ikatan hydrogen pada ikatan glikosida. Pembengkakan yang terjadi bersifat *irreversible* (tidak dapat balik). Gelatinisasi adalah tahap awal yang berfungsi untuk mempercepat proses likuifikasi (Rahmawati & Sutrisno, 2015).

### **2.3.2 Likuifikasi**

Likuifikasi merupakan proses hidrolisis pati menjadi komponen gula sederhana seperti maltosa, glukosa, dan dekstrin dengan menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase. Secara umum, proses likuifikasi dapat dilakukan hingga equivalen

dekstrosa yang terbentuk mencapai 15-20% yang ditandai dengan terbentuknya warna merah bata jika direaksikan dengan reagen iodida (Fleischer, 2019). Likuiifikasi amat bergantung pada seberapa besar aktivitas enzim amilase yang dimiliki untuk menentukan cepat lambatnya proses likuiifikasi. Enzim  $\alpha$ -amilase bersifat termostabil sehingga likuiifikasi dapat dilakukan pada suhu  $105^{\circ}\text{C}$  dengan pH 6 selama 5 menit atau pada suhu  $95-97^{\circ}\text{C}$  dengan pH 6 selama 1-3 jam menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase (Rahmawati & Sutrisno, 2015).

### **2.3.3 Sakarifikasi**

Sakarifikasi merupakan tahap lanjut dari proses gelatinisasi dan likuiifikasi dengan menggunakan enzim glukoamilase. Pada tahap sakarifikasi, enzim glukoamilase akan menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosida dan sedikit  $\alpha$ -1,6-glikosida. Hasil akhir pada tahap ini berupa oligosakarida, maltotriosa, maltosa, dan glukosa. Sakarifikasi dapat dilakukan pada suhu  $55-60^{\circ}\text{C}$  dengan pH 4,5 selama 24-72 jam.

Enzim amilase yang dihasilkan oleh mikroorganisme juga telah dimanfaatkan pada proses fermentasi serta proses pembuatan kertas dan tekstil (Divakaran dkk., 2011). Selain itu, seiring dengan kemajuan ilmu bioteknologi, pemanfaatan enzim amilase semakin meluas pada berbagai bidang seperti farmasi, pangan, dan industri kimia yang lainnya (Divakaran dkk., 2011).

## **2.4 Karakteristik Bakteri Genus *Bacillus***

Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang sering dimanfaatkan dalam bidang industri. Bakteri amilolitik adalah salah satu bakteri yang dikenal mampu mendegradasi pati menjadi komponen penyusunnya berupa glukosa (Luang-In dkk., 2019; Paul dkk., 2020). Hal ini disebabkan bakteri amilolitik

mampu menghasilkan enzim amilase sehingga dalam penggunaannya bakteri amilolitik ditumbuhkan pada media pati berlebih guna merangsang produksi enzim amilase oleh bakteri amilolitik (Farias dkk., 2021; Paas Megahati dkk., 2017). Beberapa bakteri dari genus *Bacillus* seperti *Bacillus licheniformis* (Megahati dkk., 2017), *Bacillus megaterium* (Istia'nah dkk., 2020), *Bacillus subtilis* (Al-Johani dkk., 2016), *Bacillus pacificus* (Alonazi dkk., 2020), dan *Bacillus sp.* (Elmansy dkk., 2018) diketahui dapat memproduksi enzim amilase.

Secara umum, *Bacillus* dapat diisolasi dari tanah, batu, makanan, bagian tubuh hewan dan tanaman, serta sisa uraian makhluk hidup baik kotoran atau bangkai sehingga bakteri ini dapat diisolasi dari berbagai sumber yang ada di alam. Selain itu, secara taksonomi bakteri ini masuk kedalam bakteri Gram-positif dengan filum Firmicutes, ordo Bacillales serta memiliki ciri-ciri khusus yaitu sel berbentuk batang lurus serta datar, rizoid, dan aerobik (Sulistiyani dkk., 2021). *Bacillus* juga disebut sebagai bakteri termofilik karena mampu bertahan hidup pada suhu tinggi, dengan suhu tertinggi yang pernah dilaporkan mencapai 80<sup>0</sup>C (Luang-In dkk., 2019). Adapun jumlah spesies *Bacillus* yang telah diketahui hingga Januari 2019 mencapai 379 spesies (Sulistiyani dkk., 2021).

Pertumbuhan *Bacillus* pada tiap spesiesnya memiliki waktu pertumbuhan yang berbeda. Hal ini disebabkan aktivitas pertumbuhan suatu bakteri akan dipengaruhi oleh kelimpahan substrat dan mineral, suhu, tekanan, dan pH tertentu yang ada di lingkungan. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk mengetahui aktivitas pertumbuhan bakteri pada kurun waktu tertentu yang dipengaruhi oleh kondisi media biakannya. Pembuatan kurva pertumbuhan didasarkan pada pengukuran nilai

*Optical Density* (OD) yang didapatkan dari hasil pengukuran jumlah sel hidup dan sel mati pada interval waktu tertentu dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm (Krishnamurthi dkk., 2021). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hasanah dkk., (2020) pertumbuhan suatu bakteri dibagi pada 4 fase berikut:

#### **2.4.1 Fase Adaptasi (*Lag Phase*)**

Fase adaptasi merupakan fase saat bakteri tidak mengalami perubahan jumlah sel karena bakteri dalam kondisi penyesuaian pada lingkungan baru. Hal ini juga dapat disebabkan oleh pemindahan bakteri pada media yang baru (Sjofjan & Ardyati, 2011).

#### **2.4.2 Fase Eksponensial (*Exponential Phase*)**

Fase eksponensial adalah fase pertumbuhan bakteri. Hal ini disebabkan bakteri mulai aktif berkembangbiak dan akan mencapai kondisi optimal pada puncak akhir fase eksponensial (Hasanah dkk., 2020). Fase eksponensial pada bakteri *Bacillus* telah dilaporkan mulai terjadi pada waktu 18 jam setelah penanaman (Msarah dkk., 2020).

#### **2.4.3 Fase Tetap (*Stationary Phase*)**

Fase tetap terjadi ketika pertumbuhan suatu bakteri telah berhenti dan terjadi kesetimbangan populasi sel yang hidup dan jumlah sel yang mati. Hal tersebut dapat disebabkan karena perubahan jumlah nutrisi yang ada di lingkungan media biakan mulai menurun (Hasanah dkk., 2020).

#### **2.4.4 Fase Kematian (*Death Phase*)**

Fase kematian ditandai dengan banyaknya sel bakteri yang mati. Hal ini disebabkan nutrisi yang ada di lingkungan media biakan mulai habis (Mulyani dkk., 2018).

#### **2.5 Metode Analisis Aktivitas Enzim Amilase Bakteri Genus *Bacillus***

Aktivitas enzim amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mengkatalisis pembentukan 1  $\mu\text{mol}$  produk setiap menit (1  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ) pada kondisi pH, suhu, dan konsentrasi substrat tertentu (Wahyuni dkk., 2017). Istia'nah dkk., (2020) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa konsentrasi substrat merupakan salah satu faktor besar yang menyebabkan perbedaan aktivitas enzim yang diperoleh. Hal tersebut dibuktikan bahwa *Bacillus megaterium* memiliki aktivitas enzim amilase tertinggi pada konsentrasi pati 1,5% sebesar 0,548 U/mL dan semakin berkurang menjadi 0,412 U/mL dan 0,342 U/mL pada konsentrasi pati yang lebih tinggi yaitu 1,75% dan 2%. Selain itu pada konsentrasi pati yang terlalu rendah, pati 1% menghasilkan aktivitas enzim amilase terendah sebesar 0,18 U/ml. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, konsentrasi substrat yang berbeda mampu memberikan aktivitas enzim amilase yang berbeda.

Metode analisis aktivitas enzim amilase dapat dilakukan secara analisis kualitatif melalui reaksi dengan reagen iodida dan analisis kuantitatif dengan metode DNS (Al-Johani dkk., 2016; Istia'nah dkk., 2020) atau metode Nelson-Samogy (Megahati dkk., 2017). Akan tetapi, metode DNS adalah metode yang paling banyak digunakan karena sifat dari reagen DNS yang spesifik kepada gula pereduksi hasil degradasi pati oleh enzim amilase. Berbeda dengan metode DNS, metode Nelson-Samogy relatif dihindari karena sifat reagen pereaksinya yang



lebih toksik dan sensitif terhadap faktor pengganggu (Pratiwi dkk., 2018). Penjelasan rinci tentang metode analisis kualitatif dengan reagen iodida dan analisis kuantitatif dengan metode DNS adalah sebagai berikut:

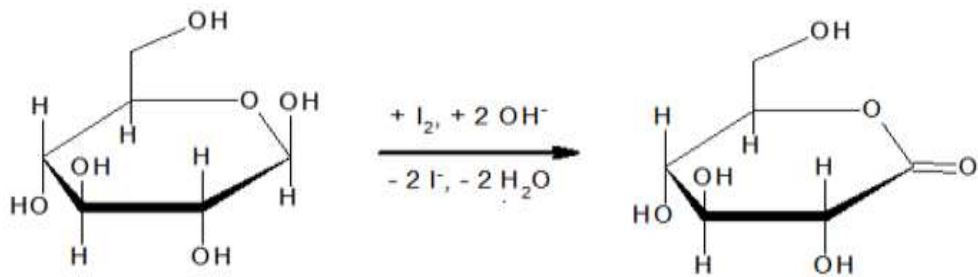
### **2.5.1 Analisis Kualitatif Enzim Amilase dengan Reagen Iodida**

Analisis kualitatif enzim amilase ditentukan berdasarkan pengamatan visual terkait ada tidaknya aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh bakteri amilolitik. Metode ini dilakukan dengan cara meneteskan reagen iodida pada koloni bakteri amilolitik yang telah dikembangbiakkan. Hasil positif akan menghasilkan zona bening disekitar koloni bakteri. Zona bening yang terbentuk merepresentasikan bahwa bakteri amilolitik positif memiliki aktivitas enzim amilase (Ardhi dkk., 2020). Adapun hasil positif pada analisis kualitatif aktivitas enzim amilase dengan reagen iodida ditunjukkan pada gambar berikut:



Gambar 2. 3 Hasil positif (zona bening) pada analisis kualitatif aktivitas enzim amilase (Al-Johani dkk., 2016)

Zona bening yang terbentuk merupakan hasil dari adanya reaksi antara glukosa dengan reagen iodida. Glukosa yang terdapat pada media merupakan hasil dari aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh bakteri saat menghidrolisis pati yang ada pada media. Hal ini menjadi bukti adanya aktivitas enzim amilase yang dihasilkan (Ardhi dkk., 2020). Adapun reaksi antara glukosa dengan reagen iodida adalah sebagai berikut:



Gambar 2. 4 Reaksi glukosa dengan reagen iodida (Fleischer, 2019)

Selain itu, terkadang pada tahap ini juga akan memunculkan warna lain yaitu warna biru tua. Warna biru tua seringkali muncul pada zona media yang tidak ditumbuhi oleh bakteri sebagai akibat tidak adanya aktivitas enzim amilase pada zona tersebut seperti pada gambar berikut:



Gambar 2. 5 Hasil negatif (zona biru tua) pada analisis kualitatif aktivitas enzim amilase (Elmansy dkk., 2018)

Zona biru tua yang dihasilkan merupakan hasil reaksi antara reagen iodida dengan substrat pati menghasilkan senyawa kompleks  $\text{I}_2$ -Pati. Reaksi ini terjadi ketika tidak adanya aktivitas enzim amilase pada zona tersebut dan didukung dengan tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh pada zona tersebut (Elmansy dkk., 2018; Fleischer, 2019).

### 2.5.2 Analisis Kuantitatif Enzim Amilase dengan Metode DNS

Analisis kuantitatif enzim amilase dengan reagen DNS didasarkan pada pengukuran jumlah gula pereduksi yang terbentuk akibat dari aktivitas enzim amilase yang dihasilkan pada proses degradasi pati. Proses analisis dilakukan

dengan menambahkan reagen DNS kedalam campuran reaksi enzimatik pada enzim amilase dengan substrat pati. Hasil dari campuran tersebut ditandai dengan warna larutan berubah menjadi warna kuning seperti pada gambar 2.6 berikut:



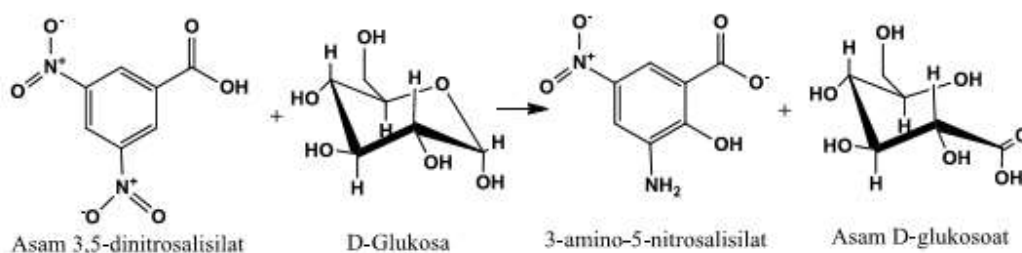
Gambar 2. 6 Larutan kuning hasil penambahan DNS kedalam campuran pati dan enzim amilase (Miksusanti dkk., 2019)

Pemanasan yang dilakukan pada tahap ini dapat mengakibatkan gula pereduksi yang terbentuk akan terikat oleh reagen DNS membentuk senyawa 3-amino-5-dinitrosalisilat yang dapat ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah bata seperti pada gambar 2.7. Adapun senyawa tersebut dapat dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Data yang diperoleh berupa absorbansi larutan yang mengintrepetasikan jumlah konsentrasi gula pereduksi yang terbentuk (Ardhi dkk., 2020; Simair dkk., 2017).



Gambar 2. 7 Larutan merah bata hasil pemanasan campuran DNS, pati, dan enzim amilase (Miksusanti dkk., 2019)

Reaksi reduksi dan oksidasi (redoks) merupakan dasar dari reaksi yang terjadi pada reagen DNS dengan gula-gula pereduksi (Rengasamy & Thangaprakasam, 2018). Gugus gula aldehyd pada gula pereduksi hasil hidrolisis pati oleh enzim amilase akan teroksidasi menjadi gugus karbonil, sedangkan gugus nitro pada reagen DNS akan tereduksi menjadi gugus amina pada kondisi dipanaskan sehingga reaksi yang terjadi akan menghasilkan senyawa 3-amino-5-dinitrosalisilat. Semakin banyak senyawa 3-amino-5-dinitrosalisilat yang terbentuk, maka warna larutan menjadi semakin merah bata dan aktivitas enzim amilase yang dihasilkan juga akan semakin tinggi (Zafer dkk., 2021). Adapun persamaan reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Gambar 2. 8 Reaksi DNS dengan gula pereduksi (Nisa dkk., 2020)

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada Juni-Oktober tahun 2023 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

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

##### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini berupa seperangkat alat gelas, timbangan analitik, bunsen, botol semprot, *hot plate*, penangas air, incubator, jarum *ose*, *vortex*, mikropipet dan tip, *centrifuge*, *shaker*, oven, termometer, dan spektrofotometer UV-Vis sebagai instrument pengukuran aktivitas enzim amilase.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini berupa isolat *Bacillus sp.* koleksi laboratorium Bioteknologi, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Malang yang diisolasi dari ubi jalar kuning (*Ipomoea batatas*). Selain itu, bahan yang dibutuhkan pada pembuatan media terdiri dari 0,5 gram *yeast extract*; 1 gram pepton; 0,5 gram NaCl; 0,1 gram  $K_2HPO_4$ , dan 1 gram *soluble starch* (MERCK). Bahan lain yang dibutuhkan pada penelitian ini berupa media NA, media NB, *aquadest*, alkohol 70% untuk desinfektan, *aquadest* (Msarah dkk., 2020). Reagen DNS, reagen K-Na tartarat,

spiritus, aluminium foil, kapas, plastik tahan panas, kertas label, serta tisu dan kapas.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* dengan variasi konsentrasi substrat pada konsentrasi 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5% pati.

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pengulangan tiga kali dan menggunakan satu faktor yaitu konsentrasi substrat yang terdiri dari 5 variasi konsentrasi substrat pada konsentrasi 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5% pati. Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa aktivitas enzim amilase.

Tabel 3. 1 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase

Konsentrasi Substrat (%)	Aktivitas Enzim Amilase (U/ml)
0,5	...
1	...
1,5	...
2	...
2,5	...

Kondisi substrat optimal ditunjukkan oleh aktivitas enzim amilase tertinggi.

### 3.4 Tahapan Penelitian

1. Preparasi dan Pembuatan Media
2. Peremajaan Bakteri
3. Pembuatan Inokulum *Bacillus sp.*
4. Produksi Enzim Amilase oleh *Bacillus sp.*

5. Uji Kuantitatif Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS
6. Uji Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Amilase
7. Analisis Data

### **3.5 Cara Kerja**

#### **3.4.1 Preparasi dan Pembuatan Media**

Preparasi pertama kali dilakukan dengan menyiapkan seluruh alat dan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian. Preparasi kemudian dilanjutkan dengan sterilisasi alat gelas dan pembuatan reagen yang secara detail tercantum pada lampiran 2.

Media SSB (*Soluble Starch Broth*) untuk media produksi enzim amilase *Bacillus sp.* dibuat dari 0,5 gram *yeast extract*; 1 gram pepton; 0,5 gram NaCl, 0,1 gram  $K_2HPO_4$ , 1 gram *bacteriological agar*, dan 1 gram *soluble starch* (Istia'nah dkk., 2020; Santos & Martins, 2003). Komponen tersebut lalu ditambahkan 100 mL *aquadest*, diaduk hingga larut dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah itu, media dimasukkan dalam Erlenmeyer 250 mL dan ditutup dengan gulungan kapas steril serta disterilisasi dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}C$  selama 15 menit.

#### **3.4.2 Peremajaan Bakteri**

Isolat induk *Bacillus sp.* diambil sebanyak satu *ose* secara aseptis dan diinokulasikan pada media NA miring dengan metode *streak plate* dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}C$  selama 24 jam dan pH netral (Istia'nah dkk., 2020).

### **3.4.3 Pembuatan Inokulum *Bacillus sp.***

Sebanyak satu *ose* isolat *Bacillus sp.* hasil peremajaan dimasukkan dalam 25 mL media NB secara aseptis kemudian *dishaker* dan diinkubasi dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang dan pH netral selama 18 jam. Inokulum yang telah dibiakkan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm (Msarah dkk., 2020).

### **3.4.4 Produksi Enzim Amilase oleh *Bacillus sp.***

Inokulum *Bacillus sp.* sebanyak 10 mL dimasukkan dalam 100 mL media SSB secara *aseptis*. Produksi dilakukan pada suhu ruang selama 24 jam pada pH netral (Elmansy dkk., 2018). Setelah proses inkubasi, ekstraksi enzim dilakukan dengan disentrifugasi media produksi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Filtrat yang diperoleh digunakan sebagai ekstrak kasar enzim amilase (Luang-In dkk., 2019).

## **3.4.5 Uji Kuantitatif Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS**

### **3.4.5.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa**

Larutan standar glukosa dibuat dengan variasi konsentrasi 0; 25; 50; 100; 200; ;dan 400 mg/mL dan secara detail telah tercantum pada lampiran 3. Pembuatan kurva standar dilakukan dengan cara dimasukkan 1 mL masing-masing larutan standar glukosa kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL pereaksi DNS. Larutan kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit dan dibiarkan hingga dingin pada suhu ruang. Ditambahkan 1 mL K-Na tartarat dan ditambahkan *aquadest* hingga volume 5 mL dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.



### 3.4.5.2 Uji Aktivitas Enzim Amilase

Larutan pati 1% (substrat) sebanyak 1 mL direaksikan dengan 1 mL ekstrak kasar enzim amilase dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 60 menit pada pH 7. Hasil inkubasi ditambahkan dengan 1 mL DNS dan dibiarkan hingga dingin pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan K-Na tartarat sebanyak 1 mL. Pelarut *Aquadest* ditambahkan hingga volume total larutan menjadi 10 mL dan *divortex*. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm (Istia'nah dkk., 2020; Megahati dkk., 2017).

Larutan kontrol dibuat dari 1 mL larutan pati 1% direaksikan dengan 1 mL ekstrak kasar enzim amilase serta diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C dan pH 7. Hasil inkubasi ditambahkan dengan 1 mL DNS dan dibiarkan hingga dingin pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan K-Na tartarat sebanyak 1 mL. Pelarut *Aquadest* ditambahkan hingga volume total larutan menjadi 10 mL dan *divortex*. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan persamaan 3.2 berikut:

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{[\text{glukosa}]}{\text{BM glukosa} \times \text{waktu inkubasi}} \times \frac{\text{volume enzim} + \text{volume substrat}}{\text{volume enzim}} \dots (3.2)$$

#### Keterangan:

BM (berat molekul) glukosa	= 180 gram/mol
Konsentrasi glukosa	= Nilai absorbansi glukosa
BM (berat molekul) glukosa	= 180 gram/mol
Waktu inkubasi	= 60 menit
Volume substrat	= 1 mL
Volume enzim	= 1 mL

### 3.4.6 Uji Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Amilase

Larutan pati dibuat dengan variasi konsentrasi sebesar 0,5; 1; 1,5; 2, dan 2,5% pati yang secara detail telah tercantum pada lampiran 3. Selanjutnya, uji pengaruh konsentrasi substrat dilakukan dengan mereaksikan 1 mL ekstrak kasar enzim amilase dengan 1 mL larutan pati dengan konsentrasi 0,5%. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 60 menit (Alonazi dkk., 2020; Istia'nah dkk., 2020). Setelah inkubasi, larutan ditambahkan dengan 1 mL DNS dan dibiarkan dingin pada suhu ruang. Selanjutnya, ditambahkan 1 mL K-Na tartarat dan ditambahkan *aquadest* hingga volume larutan menjadi 10 mL dan *divortex*. Absorbansi larutan kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm (Istia'nah dkk., 2020; Megahati dkk., 2017). Tahapan ini juga diulangi dengan menggunakan konsentrasi substrat sebesar 1; 1,5; 2, dan 2,5% pati.

### 3.4.7 Analisis Data

Hasil aktivitas enzim amilase dari penelitian ini dilakukan uji statistika menggunakan aplikasi *SPSS one way ANOVA* dengan satu faktor yaitu konsentrasi substrat untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase. Apabila terdapat pengaruh perlakuan, maka dilanjutkan dengan analisis Beda Nyata Jujur (BNJ) untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda.

## BAB IV

### PEMBAHASAN

#### 4.1 Kajian Bakteri Amilolitik dalam Pandangan Islam

Bakteri sebagai salah satu makhluk hidup yang memberikan banyak manfaat adalah suatu tanda kebesaran Allah bagi para hamba-Nya dan telah disinggung dalam firman Allah pada surah Al- Jasyah [45]: 4 sebagai berikut:

وَفِي خَلْقِكُمْ وَمَا يَبُتُّ مِنْ دَابَّةٍ آيَاتٌ لِّقَوْمٍ يُوقِنُونَ

**Artinya:**

“Dan pada penciptaan dirimu dan pada makhluk bergerak yang bernyawa yang bertebaran (di bumi) terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) untuk kaum yang meyakini” (Al- Jasyah [45]:4).

Surat Al- Jasyah [45]:4, dilansir dari laman *Pustaka Lajnah Kementrian Agama Republik Indonesia* dalam buku yang berjudul *Jasad Renik dalam Perspektif Al-Qur'an dan Sains* menjelaskan bahwa ayat tersebut mengandung kata دَابَّةٍ (*dabbah*). Kata *dabbah* biasa diterjemahkan sebagai makhluk melata dan semua jenis makhluk hidup ciptaan Allah yang telah diketahui oleh manusia atau yang belum pernah diketahui oleh manusia. *Dabbah* merujuk pada jasad renik, yaitu makhluk hidup yang akan nampak ketika dilihat dengan bantuan alat. Berdasarkan ilmu Bioteknologi, *dabbah* dapat merujuk pada bakteri yang merupakan jasad renik atau mikroorganisme (Pham dkk., 2019). Selain itu, pada penggalan ayat آيَاتٌ لِّقَوْمٍ يُوقِنُونَ yang berarti *terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) untuk kaum yang meyakini* menyiratkan untuk mengajak manusia agar melihat bahwa dalam diri jasad renik terdapat berbagai tanda keagungan kuasa dan kebijaksanaan Allah yang dapat menjadi pembelajaran bagi orang-orang yang

yakin dan mau menerima kebenaran. Sebagai contoh, hal ini telah dibuktikan dan didukung secara ilmiah bahwa salah satu spesies bakteri yaitu *Bacillus sp.* ternyata memiliki kemampuan untuk dapat memproduksi enzim amilase. Enzim amilase yang dihasilkan juga telah terbukti mampu menghidrolisis senyawa gula kompleks menjadi komponen gula yang lebih sederhana serta sering dimanfaatkan pada sektor industri pangan, farmasi, dan industri kimia (Elmansy dkk., 2018).

#### **4.2 Preparasi dan Pembuatan Media**

Penelitian diawali dengan proses preparasi yang meliputi penyiapan bahan-bahan penelitian yang dibutuhkan beserta sterilisasi alat gelas yang digunakan. Sterilisasi alat gelas dilakukan untuk menghindari kontaminasi dari berbagai material kontaminasi baik secara fisik melalui benda padat dan mikroorganisme serta kontaminasi secara kimia melalui spora dan bahan kimia dari lingkungan atau yang diproduksi oleh mikroorganisme. Sterilisasi memiliki tujuan untuk menghilangkan komponen kontaminasi fisik dan kimia dengan cara menghilangkan seluruh komponen mikroorganisme beserta seluruh hasil kontaminasi kimia yang tidak dapat dihilangkan dengan cara disinfeksi. Sterilisasi alat gelas yang digunakan melibatkan instrumen kimia berupa *autoclave* (Yoo, 2018).

Tahapan penelitian kemudian dilanjutkan dengan pembuatan media umum berupa media *Nutrient Agar* (NA) dan media *Nutrient Broth* (NB) komersial oleh *MERCK*. Berdasarkan bentuk fisiknya, media NA merupakan media padat (agar) yang digunakan untuk peremajaan berbagai macam bakteri termasuk pengujian bakteriologis terhadap bakteri yang telah dibudidayakan (Nurhidayanti., 2022;

Pestariati & Mufidah., 2021; Uthayasooriyan dkk., 2016). Berbeda dengan media NA, media NB merupakan media cair (tanpa agar) yang digunakan untuk kultivasi atau pembuatan inokulum berbagai macam bakteri yang telah dibudidayakan (Napitupulu dkk., 2019; Wahyuningsih & Zulaika, 2019). Kedua media umum tersebut memiliki komponen nutrisi dasar yang sama berupa *beef extract* sebagai sumber karbon dan pepton sebagai sumber nitrogen. Masing-masing komponen nutrisi dasar tersebut dapat membantu pertumbuhan dan regenerasi sel bakteri (Nurhidayanti, 2022; Wahyuningsih & Zulaika, 2019).

Selain pembuatan media umum, pembuatan media spesifik amilolitik dibuat sebagai media khusus dalam membantu pertumbuhan bakteri yang dapat memproduksi enzim amilase (Megahati dkk., 2017). Berdasarkan bentuk fisiknya, media SSB (*Soluble Starch Broth*) merupakan media cair (tanpa agar) yang digunakan untuk produksi enzim amilase (Luang-In dkk., 2019). Komponen dasar media disusun oleh *yeast extract* yang tinggi asam nukleat, protein, asam amino, dan vitamin B yang berguna sebagai bahan prekursor dalam metabolisme energi sel bakteri (Tao dkk., 2023). Media juga ditambahkan pepton yang mengandung komponen turunan protein berupa dipeptida dan asam amino yang dapat membantu pertumbuhan dan regenerasi sel bakteri (Davami dkk., 2015). Selain itu, penambahan garam mineral seperti NaCl dan  $K_2HPO_4$  pada media dapat membantu meningkatkan sekresi sel bakteri (Burdette, 2021). Penambahan pati (*soluble starch* oleh *MERCK*) pada media digunakan sebagai substrat untuk menstimulus pertumbuhan sel bakteri serta merangsang produksi enzim amilase (Luang-In dkk., 2019; Megahati dkk., 2017).

Selanjutnya, media umum berupa media NA dan NB serta media khusus berupa SSB yang telah dibuat dapat disterilisasi dengan *autoclave* untuk menghilangkan kontaminasi secara fisik dan kimia (Yoo, 2018).

### 4.3 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri merupakan proses regeneratif yang bertujuan untuk perbaikan serta penumbuhan ulang lapisan sel dan jaringan bakteri yang baru (Díaz-Díaz dkk., 2022). Dalam prosesnya, peremajaan bakteri membutuhkan media nutrisi sebagai syarat pertumbuhannya (Nurhidayanti., 2022) dengan waktu inkubasi 24 jam untuk menghindari tumbuhnya bakteri biakan yang kurang produktif akibat dari jumlah nutrisi dari media yang semakin berkurang (Istia'nah dkk., 2020; Msarah dkk., 2020). Pada penelitian ini, proses peremajaan bakteri melibatkan spesies bakteri *Bacillus sp.* koleksi Laboratorium Biokimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang yang digoreskan pada media NA miring (Pestariati & Mufidah., 2021; Uthayasooryan dkk., 2016). Media NA dipilih berdasarkan kandungan nutrisinya berupa *beef extract* sebagai sumber karbon dan pepton sebagai sumber nitrogen. Masing-masing komponen nutrisi dasar tersebut dapat membantu pertumbuhan dan regenerasi sel bakteri (Nurhidayanti, 2022; Wahyuningsih & Zulaika, 2019).

Waktu inkubasi selama 24 jam dijadikan sebagai syarat utama pada proses peremajaan bakteri berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Msarah dkk., (2020). Dalam penelitiannya, *Bacillus sp.* terbukti mengalami fase pembelahan tertinggi (fase eksponensial) pada 18 jam setelah inokulasi dan mulai mengalami penurunan pertumbuhan pada 24 jam setelah inokulasi. Hal tersebut menurut

Hasanah dkk., (2020) bakteri berada pada fase yang prima dan setimbang (stasioner) sehingga jumlah bakteri yang hidup sebanding dengan jumlah bakteri yang mati.

Peremajaan *Bacillus sp.* dilakukan secara aseptis dengan menggoreskan isolat bakteri kedalam media NA miring secara *streak plate*. Teknik goresan *streak plate* dipilih berdasarkan karakter *Bacillus sp.* yang sudah merupakan biakan bakteri murni sehingga *Bacillus sp.* akan tumbuh sebagai koloni tunggal, terdiri dari jutaan sel identik, dan dapat diamati secara visual (Sanders, 2012; Sulistiyani dkk., 2021).

Isolat *Bacillus sp.* diinkubasi pada suhu optimalnya (37<sup>0</sup>C) berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Istia'nah dkk., (2020) dan diinkubasi selama 24 jam (Msarah dkk., 2020). Hasil peremajaan isolat *Bacillus sp.* pada penelitian ini adalah seperti pada Gambar 4.1 berikut:



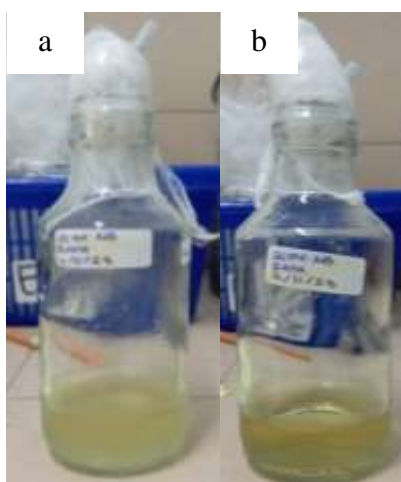
Gambar 4. 1 Hasil peremajaan *Bacillus sp.*

#### 4.4 Pembuatan Inokulum *Bacillus sp.*

Pembuatan inokulum dilakukan untuk memperoleh kultur bakteri yang tumbuh pada fase eksponensial. Hasanah dkk., (2020) menjelaskan bahwa, sifat bakteri yang ada pada fase eksponensial adalah bakteri yang sangat aktif berkembang biak sebelum mencapai kondisi optimal pada fase stasioner. Pada

spesies *Bacillus sp.* Msarah dkk., (2020) berhasil membuktikan bahwa *Bacillus sp.* berada pada fase eksponensial pada waktu inkubasi selama 18 jam dengan nilai *Optical Density* (OD) mencapai 1,5.

Isolat *Bacillus sp.* pada penelitian ini diinokulasikan pada media NB secara aseptis dan diinkubasi pada suhu ruang selama 18 jam. Inokulum yang dihasilkan kemudian diukur nilai *Optical Density* (OD) atau kerapatan bakteri dengan menghitung jumlah total sel bakteri yang hidup dan yang mati menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm (Krishnamurthi dkk., 2021). Inokulum stok yang telah diinkubasi selama 18 jam (Gambar a) dan media NB murni (Gambar b) adalah sebagai berikut:



Gambar 4. 2 Media NB berisi inokulum stok *Bacillus sp.* setelah 18 jam inkubasi (a) dan media NB murni setelah 18 jam inkubasi (b)

Hasil pengukuran nilai OD inokulum *Bacillus sp.* yang dibiakkan adalah 0,718. Berdasarkan hasil tersebut, inokulum *Bacillus sp.* OD 0,5 perlu dibuat untuk memenuhi standar nilai perkiraan jumlah bakteri yang digunakan untuk melakukan percobaan hasil biakan bakteri. Adapun standar nilai perkiraan jumlah bakteri yang digunakan untuk melakukan percobaan hasil biakan bakteri yaitu  $1 \times 10^7$  sel/ml untuk inokulum OD 0,5 (Aviany & Pujiyanto., 2020). Sebanyak 25



mL Inokulum OD 0,5 *Bacillus sp.* yang berhasil dibuat pada penelitian ini ditunjukkan pada gambar berikut:



Gambar 4. 3 Inokulum *Bacillus sp.* OD 0,5 sebanyak 25 mL

#### **4.5 Produksi Enzim Amilase oleh *Bacillus sp.***

Produksi enzim amilase pada penelitian ini melibatkan inokulum *Bacillus sp.* OD 0,5 dengan syarat menggunakan media SSB sebagai sumber nutrisi. Media SSB (*Soluble Starch Broth*) merupakan media cair (tanpa agar) kaya akan kandungan pati yang bertindak sebagai substrat untuk menstimulus produksi enzim amilase oleh *Bacillus sp.* (Luang-In dkk., 2019). Selain itu, pati yang terdapat pada SSB juga dapat membantu pertumbuhan sel *Bacillus sp.* dengan proses produksi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang. Pertumbuhan inokulum *Bacillus sp.* pada media SSB dapat ditandai dengan warna media yang lebih keruh (Gambar a) dari warna media sebelum inokulasi (Gambar b) seperti pada gambar berikut:



Gambar 4. 4 Media SSB setelah penambahan 10 ml inokulum *Bacillus sp.* OD 0,5 dan inkubasi 24 jam (a) serta media SSB murni setelah 24 jam inkubasi (b)

Proses ekstraksi digunakan untuk memisahkan komponen cair yang mengandung ekstrak kasar enzim amilase dengan komponen padat yang merupakan sel bakteri. Ekstraksi enzim amilase dilakukan selama 15 menit dan terjadi pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  untuk menghindari denaturasi enzim selama proses ekstraksi serta melibatkan instrumen kimia berupa *centrifuge* dengan kecepatan 5000 *rpm* sehingga dalam prosesnya, fase padat (sel bakteri yang terekstraksi) akan berada di dasar tabung *centrifuge* dan akan terpisah dari ekstrak kasar enzim yang berada pada fase cair (filtrat) (Elmansy dkk., 2018; Luang-In dkk., 2019; Paul dkk., 2020). Ekstrak kasar enzim yang berhasil dipisahkan dari komponen padatnya adalah seperti pada Gambar 4.10 berikut:



Gambar 4. 5 Enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.*

#### **4.6 Uji Kuantitatif Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS**

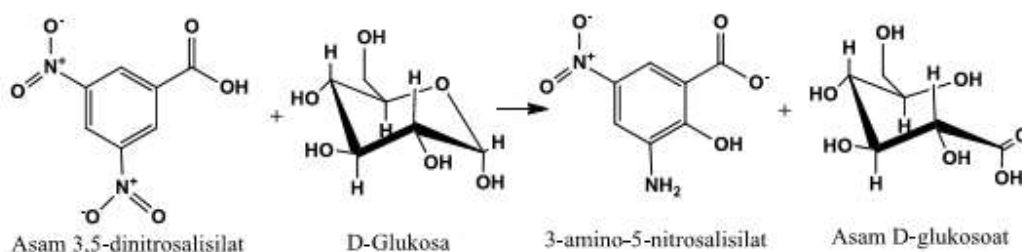
Uji kuantitatif aktivitas enzim amilase dengan metode DNS berdasarkan oleh hasil pengukuran nilai aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.*, uji kuantitatif meliputi tahapan berikut:

##### **4.6.1 Kurva Standar Glukosa**

Kurva standar glukosa digunakan untuk menentukan kadar glukosa yang terkandung dalam sampel akibat hasil hidrolisis pati oleh enzim amilase. Kurva standar glukosa diperoleh dari hasil pengujian nilai absorbansi variasi konsentrasi larutan standar glukosa pada konsentrasi 25, 50, 100, 200, dan 400 mg/mL sehingga kurva standar glukosa menyatakan hubungan antara konsentrasi glukosa dengan absorbansinya. Dari hasil pengujian diperoleh kurva standar glukosa serta nilai regresinya yang dapat digunakan untuk menentukan seberapa banyak konsentrasi glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis pati oleh enzim amilase (Satioko, 2013; Yuliana & Rahmanto, 2009).

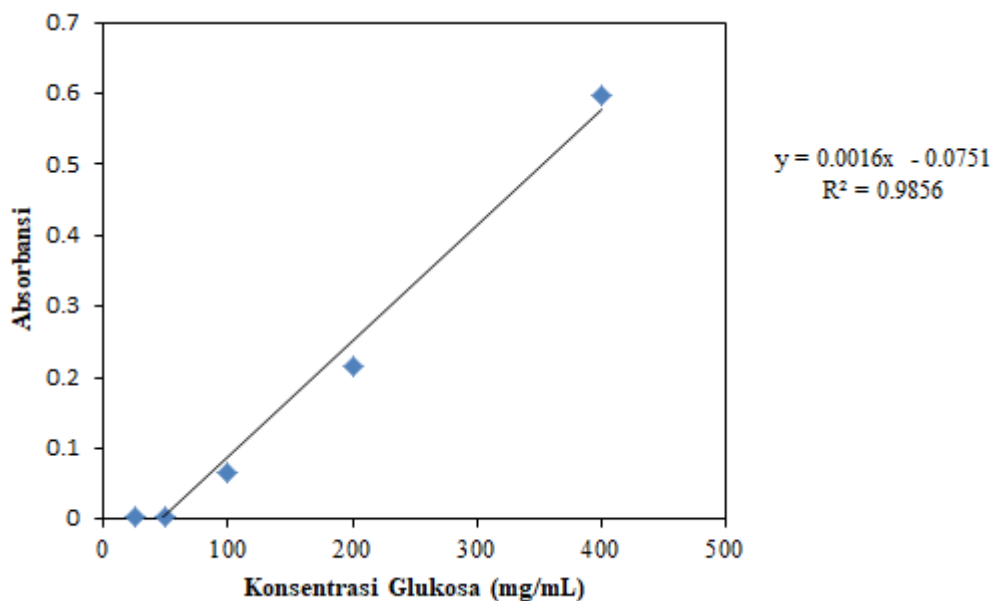
Proses analisis dilakukan dengan menambahkan reagen DNS kedalam campuran reaksi enzimatik pada enzim amilase dengan larutan standar glukosa.

Reaksi reduksi dan oksidasi (redoks) merupakan dasar dari reaksi yang terjadi pada reagen DNS dengan gula-gula pereduksi (Rengasamy & Thangaprakasam, 2018). Gugus gula aldehyd pada gula pereduksi hasil hidrolisis pati oleh enzim amilase akan teroksidasi menjadi gugus karbonil, sedangkan gugus nitro pada reagen DNS akan tereduksi menjadi gugus amina pada kondisi dipanaskan sehingga reaksi yang terjadi akan menghasilkan senyawa 3-amino-5-dinitrosalisilat. Semakin banyak senyawa 3-amino-5-dinitrosalisilat yang terbentuk, maka warna larutan menjadi semakin merah bata dan aktivitas enzim amilase yang dihasilkan juga akan semakin tinggi (Zafer dkk., 2021). Adanya senyawa 3-amino-5-dinitrosalisilat dalam sampel dapat dianalisis dengan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm (Satioko, 2013; Yuliana & Rahmanto, 2009). Adapun persamaan reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Gambar 4. 6 Reaksi DNS dengan gula pereduksi (Nisa dkk., 2020)

Hasil kurva standar pada penelitian ini memiliki persamaan regresi dengan  $y = 0,0016x - 0,0751$ . Penentuan konsentrasi glukosa yang terbentuk dapat dilakukan dengan persamaan regresi tersebut dengan nilai  $x$  sebagai konsentrasi larutan standar glukosa dan nilai  $y$  adalah absorbansi. Kurva standar glukosa dengan persamaan  $y = 0,0016x - 0,0751$  adalah sebagai berikut:



Gambar 4. 7 Kurva standar glukosa

#### 4.6.2 Uji Aktivitas Enzim Amilase

Uji aktivitas enzim amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim amilase yang mengkatalisis pembentukan 1  $\mu\text{mol}$  gula-gula pereduksi setiap menit (1  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ) (Wahyuni dkk., 2017). Pada penelitian ini, enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* direaksikan dengan 1% pati.

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini adalah dalam 1% substrat pati, aktivitas enzim yang dihasilkan sebesar 12,665 U/mL. Hal ini menunjukkan bahwa, enzim amilase yang diproduksi oleh *Bacillus sp.* pada penelitian ini memiliki aktivitas enzim amilase sebesar 12,665 U/mL pada saat konsentrasi pati sebesar 1%. Pada konsentrasi yang sama, penelitian yang dilakukan oleh Istia'nah dkk., (2020) membuktikan bahwa bakteri lain seperti *Bacillus megaterium* memiliki aktivitas enzim amilase terendah sebesar 0,18 U/mL. Megahati dkk., (2017) juga membuktikan bahwa *Bacillus licheniformis* pada konsentrasi pati 1% memiliki aktivitas enzim yang tinggi yaitu sebesar 71,14 U/mL. Berdasarkan

ketiga hasil tersebut, setiap bakteri mampu menghasilkan aktivitas enzim amilase yang berbeda.

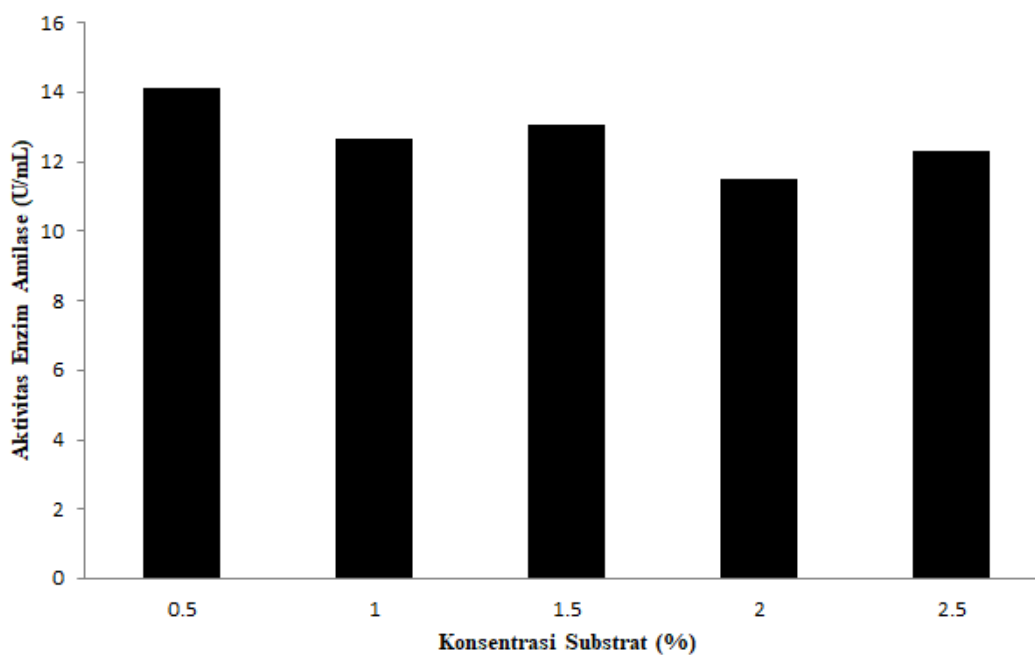
Reaksi hidrolisis pati oleh enzim amilase terjadi pada sisi aktifnya. Proses hidrolisis pati terjadi saat sisi aktif enzim terikat pada substrat pati (Istia'nah dkk., 2020). Hal ini menyebabkan enzim  $\alpha$ -Amilase (EC: 3.2.1.1) akan bekerja dengan cara mendegradasi ikatan glikosida pada pati di sepanjang gugus amilosa bagian dalam dan secara acak memutus ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosida (Nisa dkk., 2020; Savaner & Sohani, 2020). Hasil akhir dari degradasi pati oleh enzim  $\alpha$ -amilase akan menghasilkan produk berupa gula-gula sederhana seperti glukosa, maltosa, dan maltotriosa (Raplong dkk., 2014; Zafer dkk., 2021).

#### **4.7 Uji Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Amilase**

Enzim amilase merupakan enzim yang bekerja spesifik pada substrat pati dan aktivitas hidrolisisnya dapat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat (Elmansy dkk., 2018; Istia'nah dkk., 2020). Proses hidrolisis pati terjadi saat sisi aktif enzim terikat pada substrat pati, semakin banyak substrat yang terikat maka semakin banyak jumlah substrat yang akan terdegradasi. Akan tetapi saat jumlah substrat terlalu tinggi, substrat tidak dapat terikat pada sisi aktif enzim sehingga enzim amilase tidak dapat menghidrolisis pati (Elmansy dkk., 2018; Istia'nah dkk., 2020; Megahati dkk., 2017). Hal tersebut menyebabkan perlu adanya evaluasi yang tepat dalam penggunaan konsentrasi substrat yang sesuai untuk menghindari penggunaan substrat yang terlalu tinggi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa, aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* memiliki hasil yang bervariasi pada setiap konsentrasi

substrat yang berbeda. Aktivitas enzim amilase tertinggi ditunjukkan pada konsentrasi substrat sebesar 0,5%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi pati yang paling sedikit, aktivitas enzim yang dihasilkan sangat tinggi disebabkan oleh banyaknya sisi aktif enzim amilase yang mengikat pati yaitu sebesar 14,108 U/mL (Megahati dkk., 2017). Berbeda dengan hasil tersebut, pada konsentrasi pati 2%, aktivitas enzim amilase yang dihasilkan berada pada nilai terbawah sebesar 11, 512 U/mL. Menurut Megahati dkk., (2017) hal tersebut dapat terjadi disebabkan oleh tingginya konsentrasi substrat yang dapat menyebabkan banyaknya substrat yang tidak terikat pada sisi aktif enzim amilase. Pada pati 1% dan 2,5% terdapat sedikit kemiripan hasil aktivitas amilase berturut-turut yaitu 12,665 U/mL dan 12,307 U/mL sedangkan pada konsentrasi 1,5% aktivitas enzim amilase yang dihasilkan cukup tinggi yaitu sebesar 13,078U/mL. Diagram hasil pengukuran aktivitas enzim amilase pada penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 4. 8 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase

Analisis data menggunakan *software* SPSS ditujukan untuk melakukan analisis variasi (ANOVA) dan menghasilkan statistik uji F sebesar 1,3116 dengan nilai probabilitas sebesar 0,329 >alfa ( $\alpha= 0,05$ ). Berdasarkan hasil tersebut, konsentrasi substrat tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.*



## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan dari penelitian ini adalah konsentrasi substrat tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* Aktivitas enzim amilase berada pada titik tertinggi saat konsentrasi substrat sebesar 0,5% dengan nilai aktivitas enzim sebesar 14,108 U/mL, sedangkan aktivitas enzim amilase berada pada titik terendah saat konsentrasi substrat sebesar 2% dengan nilai aktivitas enzim sebesar 11,512 U/mL.

#### **5.2 Saran**

Saran dari penelitian ini adalah diperlukan evaluasi lanjutan dengan melakukan metode ekstraksi lain serta pemurnian terhadap ekstrak kasar enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* agar hasil aktivitas enzim yang didapatkan lebih optimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Johani, N., Al-seeni, M. N., & Ahmed, Y. M. (2016). Optimization of Alkaline  $\alpha$ -Amylase Production by Thermophilic *Bacillus subtilis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14 (1), 288–301. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.31>
- Alonazi, M., Karray, A., Badjah-Hadj-Ahmed, A. Y., & Ben Bacha, A. (2020). Alpha Amylase from *Bacillus pacificus* Associated with Brown Algae *Turbinaria ornata*: Cultural Conditions, Purification, and Biochemical Characterization. *Processes*, 9(1), 16. <https://doi.org/10.3390/pr9010016>
- Ardhi, A., Sidauruk, A. N., Suraya, N., Pratiwi, N. W., Pato, U., & Saryono. (2020). Molecular Identification of Amylase Producing Thermophilic Bacteria Isolated from Bukit Gadang Hot Spring, West Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(3). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210319>
- Aviany, H. B., & Pujiyanto, S. (2020). Analisis Efektivitas Probiotik di Dalam Produk Kecantikan sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Berkala Bioteknologi*, 3(2), 24-30.
- Bashir, K., & Aggarwal, M. (2019). Physicochemical, Structural and Functional Properties of Native and Irradiated Starch: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 513–523. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3530-2>
- Behailu, A., & Abebe, G. (2018). Isolation, Production and Characterization of Amylase Enzyme using The Isolate *Aspergillus niger* FAB-211. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 9(2), 7–14. <https://doi.org/10.5897/IJBMBR2018.0289>
- Beltagy, E. A., Abouelwafa, A., & Barakat, K. M. (2022). Bioethanol Production from Immobilized Amylase Produced by Marine *Aspergillus flavus* AUMC10636. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, S1687428522000097. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2022.02.003>
- Cornejo-Ramírez, Y. I., Martínez-Cruz, O., Del Toro-Sánchez, C. L., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., & Cinco-Moroyoqui, F. J. (2018). The Structural Characteristics of Starches and Their Functional Properties. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 1003–1017. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1518343>
- Divakaran, D., Chandran, A., & Pratap Chandran, R. (2011). Comparative Study on Production of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* Strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1397–1404. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400022>

- Elmansy, E. A., Asker, M. S., El-Kady, E. M., Hassanein, S. M., & El-Beih, F. M. (2018). Production and Optimization of  $\alpha$ -Amylase from Thermo-Halophilic Bacteria Isolated from Different Local Marine Environments. *Bulletin of the National Research Centre*, 42(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s42269-018-0033-2>
- Farias, T. C., Kawaguti, H. Y., & Bello Koblitz, M. G. (2021). Microbial Amylolytic Enzymes in Foods: Technological Importance of The *Bacillus* Genus. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102054. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102054>
- Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and Industrial Applications of  $\alpha$ -Amylase: A Review. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1281–1292. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>
- Fleischer, H. (2019). The Iodine Test for Reducing Sugars – A Safe, Quick and Easy Alternative to Copper(II) and Silver(I) Based Reagents. *World Journal of Chemical Education*, 7(2), 45–52. <https://doi.org/10.12691/wjce-7-2-3>
- Golachowski, A., Drożdż, W., Golachowska, M., Kapelko-Żeberska, M., & Raszewski, B. (2020). Production and Properties of Starch Citrates— Current Research. *Foods*, 9(9), 1311. <https://doi.org/10.3390/foods9091311>
- Hartati, H.-, & Hartati, N. S. (2019). Potential of Yields and Starch Production from Several Local Cassava Genotypes. *Bioscience*, 3(1), 31. <https://doi.org/10.24036/0201931103944-0-00>
- Hasanah, U., Ardyati, T., & Fitriasari, P. D. (2020). Amylolytic Activity of Bacterial Strains Isolated from Sago Pulp of The Traditional Sago Industry in Palopo, South Sulawesi. 040073. <https://doi.org/10.1063/5.0002487>
- Istia'nah, D., Utami, U., & Barizi, A. (2020). Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri *Bacillus megaterium* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat. *Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya*, 2(1), 11. <https://doi.org/10.26740/jrba.v2n1.p11-17>
- Krishnamurthi, V. R., Niyonshuti, I. I., Chen, J., & Wang, Y. (2021). A New Analysis Method for Evaluating Bacterial Growth with Microplate Readers. *PLOS ONE*, 16(1), e0245205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245205>
- Lin, X., Xiao, C., Ling, L., Guo, L., & Guo, X. (2021). A Dual-Mode Reactive Matrix for Sensitive and Quantitative Analysis of Carbohydrates by MALDI-TOF MS. *Talanta*, 235, 122792. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122792>
- Luang-In, V., Yotchaisarn, M., Saengha, W., Udomwong, P., Deeseenthum, S., & Maneewan, K. (2019). Isolation and Identification of Amylase-Producing Bacteria from Soil in Nasinuan Community Forest, Maha Sarakham,

- Thailand. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 12(3), 1061–1068. <https://doi.org/10.13005/bpj/1735>
- Masrukan, M. (2020). Potensi Modifikasi Pate dengan Esterifikasi sebagai Prebiotik. *AGROTECH: JURNAL ILMIAH TEKNOLOGI PERTANIAN*, 3(1). <https://doi.org/10.37631/agrotech.v3i1.174>
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2022). Parameter Reliability and Understanding Enzyme Function. *Molecules*, 27(1), 263. <https://doi.org/10.3390/molecules27010263>
- MSarah, M. J., Ibrahim, I., Hamid, A. A., & Aqma, W. S. (2020). Optimisation and Production of Alpha Amylase from Thermophilic *Bacillus spp.* and its Application in Food Waste Biodegradation. *Heliyon*, 6(6), e04183. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04183>
- Miksusanti, Herlina, Fithri, A. N., Yuniar, Novalin, V., & Julinar. (2019). Film (patch) based on starch compound hydrolise by amylase from saliva and bacteria. *Journal of Physics: Conference Series*, 1282(1), 012073. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1282/1/012073>
- Mulyani, P. D., Hamid, R. M., Janatunaim, R. Z., & Purwestri, Y. A. (2018). Amylolytic Ability of Bacteria Isolated from Termite (*Coptotermes sp.*) Gut. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 23(1), 14. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.32445>
- Megahati, R. R. P., urdin, M., Agustien, A., & Hon Tjong, D. (2017). Optimization of Bacteria Amylase Activity from *Bacillus licheniformis* Strain SEM11. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 2938–2946. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.345>
- Munegumi, T., Inutsuka, M., & Hayafuji, Y. (2016). Investigating the Hydrolysis of Starch Using  $\alpha$ -Amylase Contained in Dishwashing Detergent and Human Saliva. *Journal of Chemical Education*, 93(8), 1401–1405. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00545>
- Nurhidayanti, N. (2022). Perbandingan Media Alternatif Kacang Kedelai dan Media Nutrient Agar Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Indobiosains*, 47-53.
- Napitupulu, H. G., Rumengan, I. F., Wullur, S., Ginting, E. L., Rimper, J. R. T. S. L., & Toloh, B. H. (2019). *Bacillus sp.* sebagai Agensia Pengurai dalam Pemeliharaan *Brachionus rotundiformis* yang Menggunakan Ikan Mentah sebagai Sumber Nutrisi. *Jurnal Ilmiah Platax*, 7(1), 158-169.
- Nangin, D., & Sutrisno, A. (2015). *Enzim Amilase Pemecah Pati Mentah dari Mikroba: Kajian Pustaka*. 3(3), 8.
- Nisa, I. K., Sitoresmi, P., Lukiati, B., Saptawati, R. T., & Rodiansyah, A. (2020). The Potential of Amylase Enzyme Activity Against Bacteria Isolated from

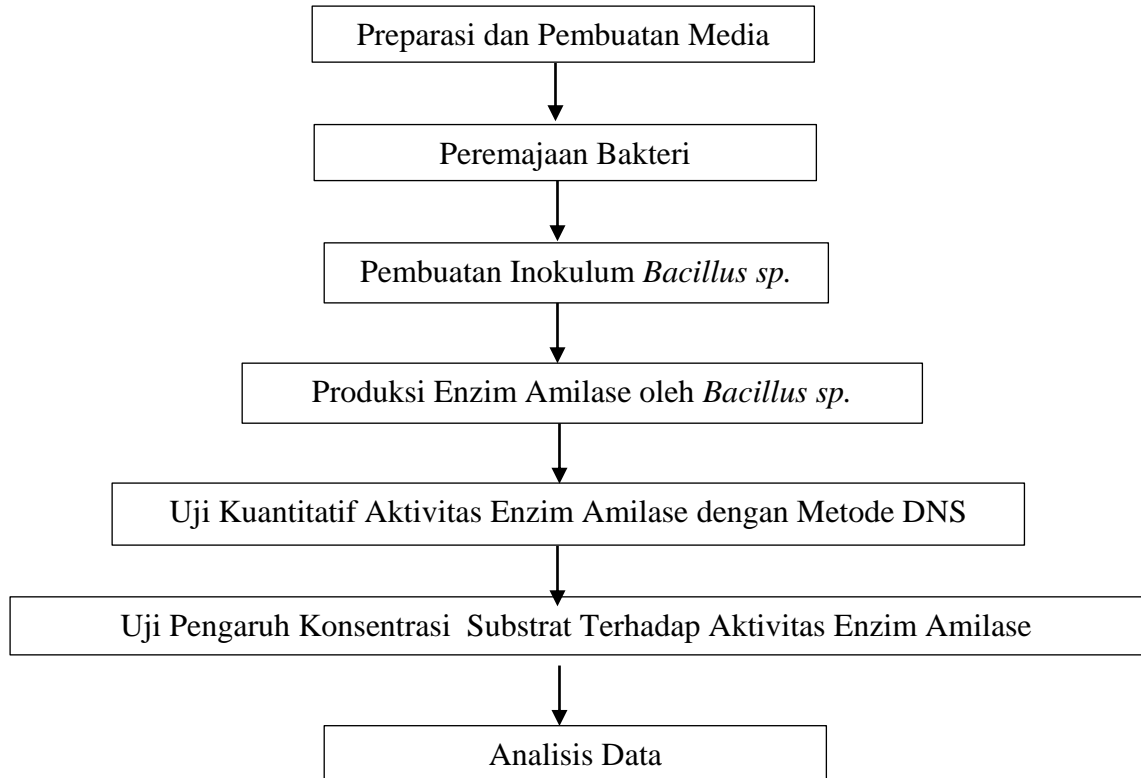
- Several Lakes in East Java, Indonesia: *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(1). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220106>
- Oktiarni, D., Lusiana, Simamora, F. Y., & Gaol, J. M. L. (2015). *Isolation, purification and characterization of  $\beta$ -amylase from Dioscorea hispida Dennst.* 090004. <https://doi.org/10.1063/1.4930749>
- Omoregie, Egharevba. (2020). Chemical Properties of Starch and Its Application in the Food Industry. *Chemical Properties of Starch*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87777>
- Pestariati, P., & Mufidah, M. (2021). Sorghum Agar (*Sorghum bicolor*) as Substitute Nutrient Agar Media for Cultivation *Escherichia coli*. *Health Notions*, 5(07), 258-261.
- Papoutsis, K., Zhang, J., Bowyer, M. C., Brunton, N., Gibney, E. R., & Lyng, J. (2021). Fruit, Vegetables, and Mushrooms for The Preparation of Extracts with  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition Properties: A review. *Food Chemistry*, 338, 128119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128119>
- Paul, J. S., Beliya, E., Tiwari, S., Patel, K., Gupta, N., & Jadhav, S. K. (2020). Production of Biocatalyst  $\alpha$ -Amylase from Agro-waste 'Rice Bran' by using *Bacillus tequilensis* TB5 and Standardizing its Production Process. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101648. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101648>
- Pham, J. V., Yilma, M. A., Feliz, A., Majid, M. T., Maffetone, N., Walker, J. R., Kim, E., Cho, H. J., Reynolds, J. M., Song, M. C., Park, S. R., & Yoon, Y. J. (2019). A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1404. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404>
- Pratantie, E. M., Bintoro, V. P., & Dwiloka, B. (2021). Isolasi Enzim Amilase dari Kecambah Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*). *Jurnal Ilmiah Teknosains*, 7(1/Mei), 29–35. <https://doi.org/10.26877/jitek.v7i1/Mei.8359>
- Pratiwi, Y. H., Ratnayani, O., & Wirajana, I. N. (2018). Perbandingan Metode Uji Gula Pereduksi dalam Penentuan Aktivitas  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase dengan Substrat Janur Kelapa (*Cocos nucifera*). *Jurnal Kimia*, 134. <https://doi.org/10.24843/JCHEM.2018.v12.i02.p07>
- Rahmawati, A. Y., & Sutrisno, A. (2015). Hidrolisis Tepung Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.*) Secara Enzimatis Menjadi Sirup Glukosa Fungsional: *KAJIAN PUSTAKA*. 3(3).
- Raplong, H. H., Odeleye, P. O., Hammuel, C., Idoko, M. O., Asanato, J. I., & Odeke, E. H. (2014). Production of Alpha Amylase by *Bacillus cereus* in Submerged Fermentation. *Aceh International Journal of Science and Technology*, 3(3). <https://doi.org/10.13170/aijst.3.3.1592>

- Rengasamy, S., & Thangaprakasam, U. (2018). Isolation, Screening and Deetermination of  $\alpha$ -Amylase Activity from Marine Streptomyces Species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10(4), 122. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2018v10i4.24447>
- Shihab, M. Q., & Shihab, M. Q. (2012). *Surah al-Ankabût, Surah ar-Rûm, Surah Luqmân, Surah as-Sajdah, Surah al-Ahzâb, Surah Saba'* (Cetakan V). Lentera Haiti.
- Shihab, M. Q. (2005a). *Tafsir al-Mishbâh: Pesan, kesan, dan keserasian al-Qur'an* (Cet. 6). Lentera Hati.
- Shihab, M. Q. (2005b). *Tafsir al-Mishbâh: Pesan, kesan, dan keserasian al-Qur'an* (Cet. 6). Lentera Hati.
- Saleh, F., Hussain, A., Younis, T., Ali, S., Rashid, M., Ali, A., Mustafa, G., Jabeen, F., AL-Surhanee, A. A., Alnoman, M. M., & Qamer, S. (2020). Comparative Growth Potential of Thermophilic Amylolytic *Bacillus sp.* on Unconventional Media Food Wastes and its Industrial Application. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3499–3504. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.045>
- Santos, E. de Oliveira., & Martins, M. L. L. (2003). Effect of The Medium Composition on Formation of Amylase by *Bacillus sp.*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(1), 129–134. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000100018>
- Savaner, S., & Sohani, D. S. (2020). Review on Microbial  $\alpha$ -Amylase Types & Their Industrial Application. 23,9.
- Simair, A. A., Qureshi, A. S., Khushk, I., Ali, C. H., Lashari, S., Bhutto, M. A., Mangrio, G. S., & Lu, C. (2017). Production and Partial Characterization of  $\alpha$  -Amylase Enzyme from *Bacillus sp.* BCC 01-50 and Potential Applications. *BioMed Research International*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/9173040>
- Sjofjan, O., & Ardyati, T. (2011). Extracellular Amylase Activity of Amylolytic Bacteria Isolated from Quail's (*Coturnix japonica*) Intestinal Tract in Corn Flour Medium. *International Journal of Poultry Science*, 10(5), 411–415. <https://doi.org/10.3923/ijps.2011.411.415>
- Su, H., Zhu, J., Liu, G., & Tan, F. (2016). Investigation of Availability of a High Throughput Screening Method for Predicting Butanol Solvent -Producing Ability of *Clostridium beijerinckii*. *BMC Microbiology*, 16(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0776-6>
- Sulistiyan, T. R., Kusmiati, M., & Putri, G. A. (2021). The 16S rRNA Analysis and Enzyme Screening of *Bacillus* from Rhizosphere Soil of Lombok Island. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 26(4), 582–590. <https://doi.org/10.18343/jipi.26.4.582>

- Tazkiah, N. P., Rosahdi, T. D., & Supriadin, A. (2019). Isolasi dan Karakterisasi Enzim Amilase dari Biji Nangka (*Artocarpus heterophyllus*). *al-Kimiya*, 4(1), 17–22. <https://doi.org/10.15575/ak.v4i1.5079>
- Uthayasooriyan, M., Pathmanathan, S., Ravimannan, N., & Sathyaruban, S. (2016). Formulation of alternative culture media for bacterial and fungal growth.
- Wahyuni, S., Suarya, P., & Saputra, I. M. A. (2017). Isolasi Enzim Amilase dari Kecambah Biji Jagung Lokal Seraya (*Zea mays L.*) untuk Hidrolisis Pati. *Jurnal Kimia*, 122. <https://doi.org/10.24843/JCHEM.2017.v11.i02.p04>
- Wahyuningsih, N., & Zulaika, E. (2019). Perbandingan pertumbuhan bakteri selulolitik pada media nutrient broth dan carboxy methyl cellulose. *Jurnal sains dan Seni ITS*, 7(2), 36-38.
- Zafer, J. B., Dede, S., & Karakuş, E. (2021).  $\alpha$ -Amylase Assay with Starch–Iodine–Sodium Fluorescein-based Fluorometric Method in Human Serum Samples. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(6), 599–606. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1843177>

## LAMPIRAN

### Lampiran 1 Rancangan Penelitian

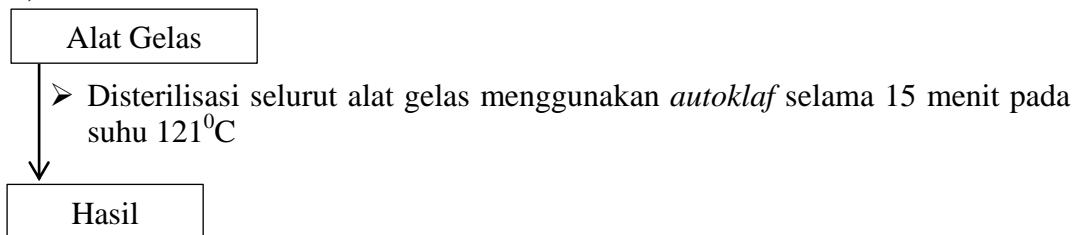




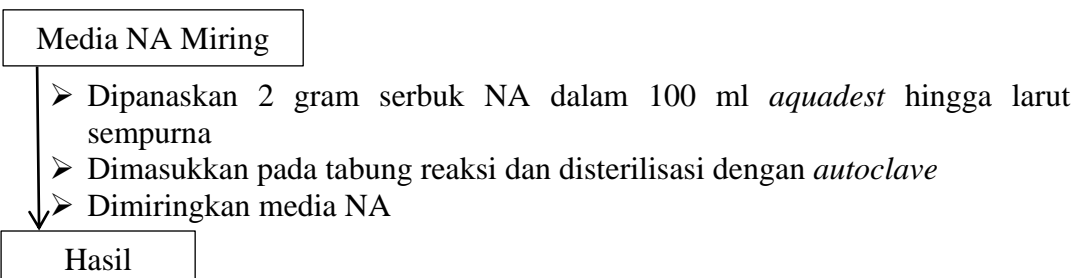
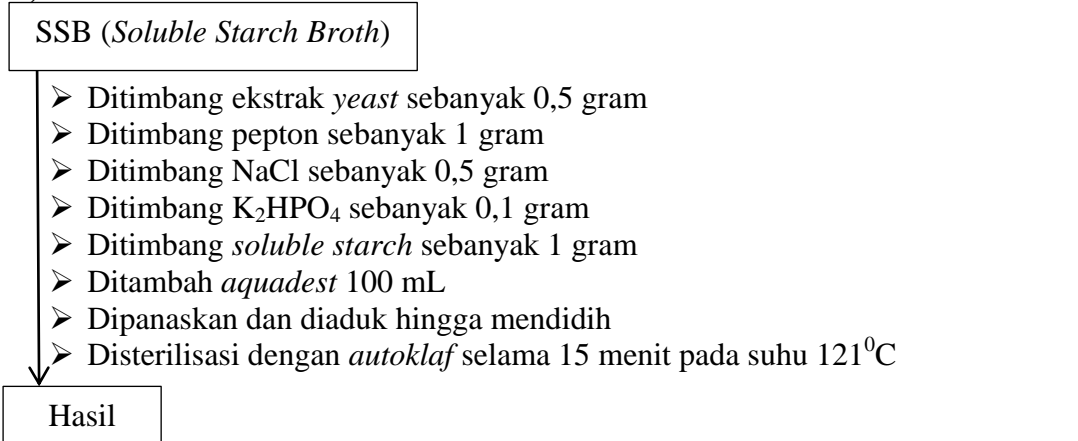
## Lampiran 2 Diagram Alir Penelitian

### L 2. 1 Preparasi dan Pembuatan Media

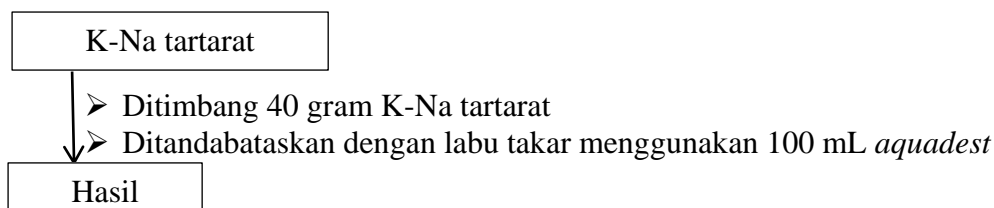
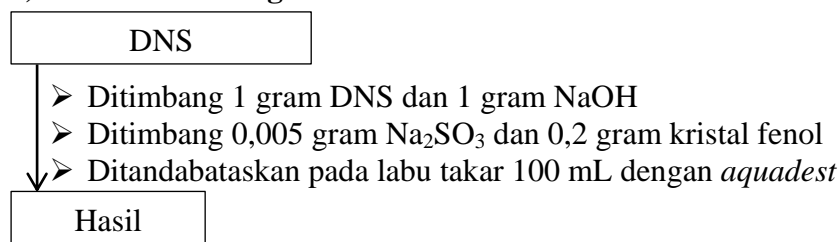
#### a) Sterilisasi Alat



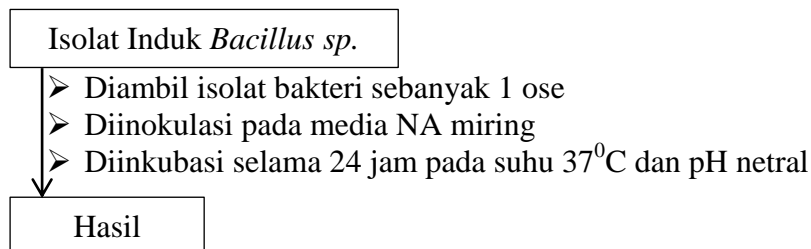
#### b) Pembuatan Media



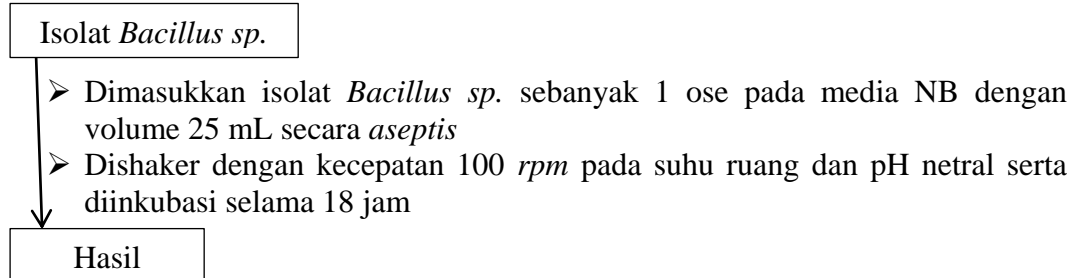
#### c) Pembuatan Reagen



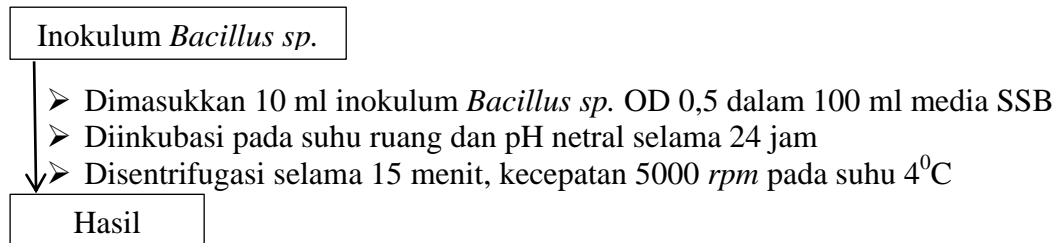
### L 2. 2 Peremajaan Bakteri



### L 2. 3 Pembuatan Inokulum *Bacillus sp.*

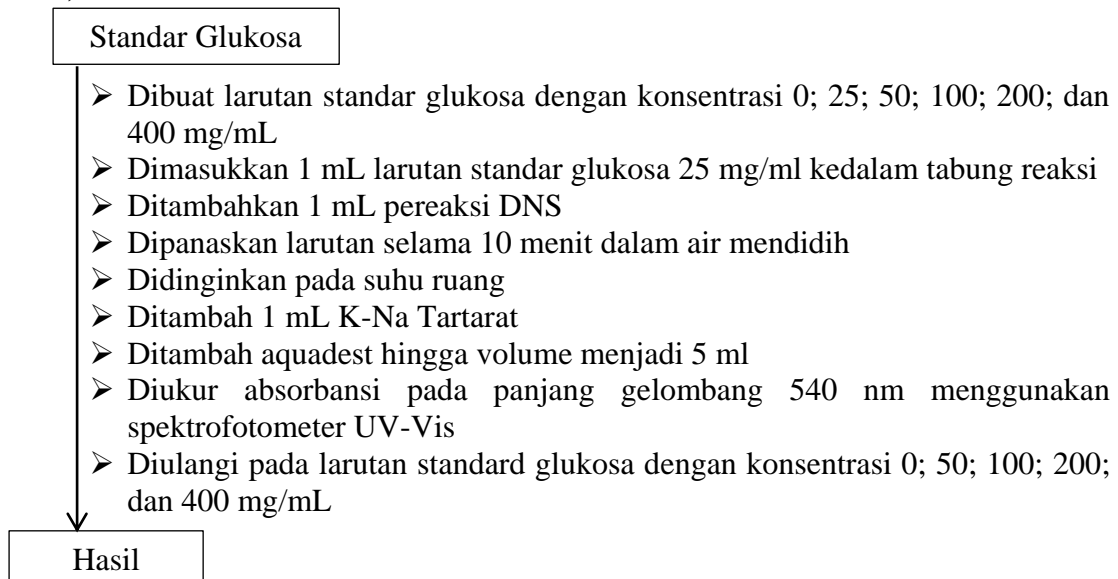


### L 2. 4 Produksi Enzim Amilase oleh *Bacillus sp.*



### L 2. 5 Uji Kuantitatif Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS

#### a) Pembuatan Kurva Standar Glukosa



### b) Uji Aktivitas Enzim Amilase

#### Larutan Pati dan Ekstrak Kasar Enzim Amilase

- Direaksikan 1 mL larutan pati 1% dengan 1 mL ekstrak kasar enzim amilase
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit
- Ditambahkan 1 mL pereaksi DNS
- Didinginkan pada suhu ruang
- Ditambah 1 mL K-Na Tartrat
- Ditambah aquades hingga volume 10 mL dan di *vortex*
- Diukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis
- Dihitung aktivitas enzim amilase dengan persamaan 3.2

Hasil

### L 2. 6 Uji Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Amilase

#### Larutan Pati dan Ekstrak Kasar Enzim Amilase

- Dibuat larutan pati dengan konsentrasi 0; 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5%
- Direaksikan 1 mL ekstrak kasar enzim dengan 1 mL pati 0,5%
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit dan pH netral
- Direaksikan dengan 1 mL pereaksi DNS
- Didinginkan pada suhu ruang
- Ditambah K-Na Tartarat
- Ditambah aquadest hingga volume menjadi 10 mL dan *divortex*
- Diukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis
- Diulangi semua proses dengan konsentrasi pati 0; 1; 1,5; 2; dan 2,5%

Hasil

### Lampiran 3. Perhitungan

#### L 3. 1 Pembuatan Inokulum *Bacillus sp.* OD 0,5

##### a) Volume Inokulum Stok

Sebanyak 25 mL inokulum stok OD 0,718 diencerkan menjadi OD 0,5 sebanyak 25 mL dengan cara:

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 0,718 \times V_1 &= 0,5 \times 25 \text{ mL} \\ V_1 &= 17,40 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, sebanyak 17,40 ml inokulum stok *Bacillus sp.* harus ditambahkan kedalam media NB murni sebanyak 7,60 mL.

#### L 3. 2 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Larutan standar glukosa sebanyak 500 ppm dijadikan larutan stok, sehingga:

$$500 \text{ ppm} = \frac{500 \text{ mg glukosa}}{1000 \text{ ml aquadest}} = \frac{50 \text{ mg glukosa}}{100 \text{ ml aquadest}}$$

Jadi, sebanyak 0,05 gram glukosa harus ditandabatkan dalam labu takar 100 mL dengan aquadest. Setelah itu, larutan standar glukosa dengan konsentrasi 0, 25, 50, 100, 200, dan 400 mg/mL sebanyak 10 mL dapat dibuat dengan rincian komposisi sebagai berikut:

a) **Konsentrasi 25 mg/mL**

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 500 \text{ ppm} &= 10 \text{ mL} \times 25 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

b) **Konsentrasi 50 mg/mL**

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 500 \text{ ppm} &= 10 \text{ mL} \times 50 \text{ ppm} \\ V_1 &= 1 \text{ mL} \end{aligned}$$

c) **Konsentrasi 100 mg/mL**

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 500 \text{ ppm} &= 10 \text{ mL} \times 100 \text{ ppm} \\ V_1 &= 2 \text{ mL} \end{aligned}$$

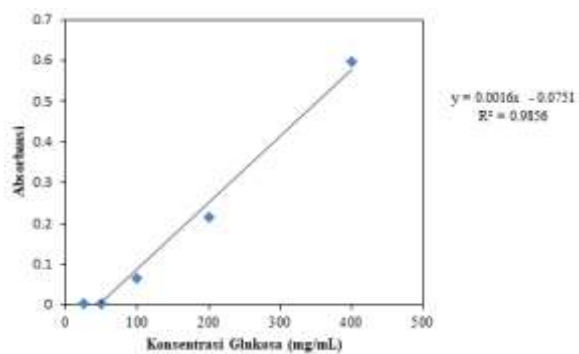
d) **Konsentrasi 200 mg/mL**

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 500 \text{ ppm} &= 10 \text{ mL} \times 200 \text{ ppm} \\ V_1 &= 4 \text{ mL} \end{aligned}$$

e) **Konsentrasi 400 mg/mL**

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 500 \text{ ppm} &= 10 \text{ mL} \times 400 \text{ ppm} \\ V_1 &= 8 \text{ mL} \end{aligned}$$

#### Lampiran 4 Kurva Standar Glukosa



Konsentrasi Glukosa (mg/ml)	Absorbansi
25	0,0039
50	0,0041
100	0,0659
200	0,2158
400	0,5972

Tabel 5. 1 Absorbansi Larutan Standar Glukosa

## Lampiran 5 Absorbansi Sampel dan Aktivitas Enzim Amilase

### L5. 1 Absorbansi Sampel

Konsentrasi Pati (%)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
0,5	0,0632	0,0944	0,0648
1	0,0797	0,0943	0,0858
1,5	0,1182	0,1016	0,1072
2	0,1234	0,1298	0,1311
2,5	0,1607	0,1648	0,1808

### L5. 2 Absorbansi Kontrol

Konsentrasi Pati (%)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
0,5	0,0293	0,0227	0,0300
1	0,0590	0,0501	0,0477
1,5	0,0817	0,0628	0,0688
2	0,1046	0,1021	0,1045
2,5	0,1295	0,1456	0,1375

### L5. 3 Absorbansi Aktivitas Enzim Amilase

Konsentrasi Pati (%)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
0.5	0,0339	0,0717	0,0348
1	0,0207	0,0442	0,0381
1.5	0,0365	0,0388	0,0384
2	0,0188	0,0277	0,0266
2.5	0,0312	0,0192	0,0433

## Lampiran 6 Konsentrasi Glukosa

Konsentrasi glukosa dihitung menggunakan persamaan kurva standar dengan y adalah nilai absorbansi aktivitas enzim amilase dan x merupakan konsentrasi glukosa. Sebagai contoh saat konsentrasi substrat 0,5%, pada ulangan pertama absorbansi aktivitas enzim sebesar 0,0339 sehingga:

$$\begin{aligned}
 y &= 0,0016x - 0,0751 \\
 0,0339 &= 0,0016x - 0,0751 \\
 x &= 68,125
 \end{aligned}$$

Konsentrasi Pati %	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
0.5	68,1250	91,7500	68,6875
1	59,8750	74,5625	70,7500
1.5	69,7500	71,1875	70,9375
2	58,6875	64,2500	63,5625
2.5	66,4375	58,9375	74,0000

## Lampiran 7 Aktivitas Enzim Amilase

Aktivitas enzim amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim amilase yang mengkatalisis pembentukan 1  $\mu\text{mol}$  glukosa setiap menit (1  $\mu\text{mol}/\text{menit}$ ) dan dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{[\text{glukosa}]}{\text{BM glukosa} \times \text{waktu inkubasi}} \times \frac{\text{volume enzim} + \text{volume substrat}}{\text{volume enzim}}$$

Sebagai contoh saat konsentrasi substrat 0,5%, pada ulangan pertama konsentrasi glukosa yang dihasilkan sebesar 68,1250 sehingga:




$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{68,125 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 1000}{180 \frac{\text{gram}}{\text{mol}} \times 60 \text{menit}} \times \frac{1 \text{ ml} + 1 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = 12,615 \text{ U/ml}$$













Konsentrasi Pati (%)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
0.5	12,6157407	16,9907407	12,7199074
1	11,0879630	13,8078704	13,1018519
1.5	12,9166667	13,1828704	13,1365741
2	10,8680556	11,8981481	11,7708333
2.5	12,3032407	10,9143519	13,7037037

### Lampiran 8 Analisis Statistika

ANOVA					
AKTIVITAS ENZIM AMILASE					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11,061	4	2,765	1,316	0,329
Within Groups	21,009	10	2,101		
Total	32,069	14			

### Lampiran 9 Dokumentasi

Peremajaan Bakteri	Media NB Inokulum Stok <i>Bacillus sp.</i>	Media NB Murni
		

<p>Pengukuran Nilai <i>Optical Density</i> (OD) dengan Spektrofotometer Visible</p> 	<p>Inokulum <i>Bacillus sp.</i> OD 0,5</p> 	<p>Media SSB Murni</p> 
<p>Produksi Enzim Amilase</p> 	<p>Media SSB Berisi 10 ml Inokulum <i>Bacillus sp.</i> OD 0,5</p> 	<p>Sentrifugasi</p> 
<p>Ekstrak Kasar Enzim Amilase</p> 	<p>Ekstrak Kasar Enzim dan Kontrol</p> 	<p>Ekstrak Kasar Enzim Setelah Penambahan DNS</p> 
<p>Ekstrak Kasar Enzim Setelah Penambahan K-Na Tartrat</p> 	<p>Pembuatan Kurva Standart</p> 	<p>Pemanasan Sampel Kurva Standar Setelah Ditambah DNS</p> 

Sampel Kurva Standar Setelah Pemanasan



Sampel Kurva Standar Setelah Penambahan K-Na Tartrat

